

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

REPERCUSSÕES DA RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO APÓS
RESTABELECIMENTO DA ALIMENTAÇÃO *AD LIBITUM* SOBRE PARÂMETROS
NUTRICIONAIS E FISIO-METABÓLICOS DE RATOS *WISTAR*

RECIFE-PE

2022

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

REPERCUSSÕES DA RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO APÓS
RESTABELECIMENTO DA ALIMENTAÇÃO *AD LIBITUM* SOBRE PARÂMETROS
NUTRICIONAIS E FISIO-METABÓLICOS DE RATOS *WISTAR*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Bases Experimentais da Nutrição, para a obtenção do título de Doutora em Nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Elizabeth do Nascimento

RECIFE-PE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

A474r Alves, Eryka Maria dos Santos.
Repercussões da restrição temporal do alimento após restabelecimento da
alimentação *ad libitum* sobre parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos de ratos
wistar / Eryka Maria dos Santos Alves. – 2022.
125 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Elizabeth do Nascimento.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências
da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Ritmo Circadiano. 2. Ingestão de Alimentos. 3. Crononutrição.
4. Obesidade Abdominal. I. Nascimento, Elizabeth do (Orientadora). II. Título.

613

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2023-090)

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

REPERCUSSÕES DA RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO APÓS
RESTABELECIMENTO DA ALIMENTAÇÃO *AD LIBITUM* SOBRE PARÂMETROS
NUTRICIONAIS E FISIO-METABÓLICOS DE RATOS *Wistar*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Bases Experimentais da Nutrição, para a obtenção do título de Doutora em Nutrição.

Tese aprovada em: 04 de novembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Gisélia de Santana Muniz
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof.^a Dr. Omar Guzmán Quevedo
Higher Technological Institute of Tacambaro Tecario (TecNM)

Prof.^a Dr.^a Amanda Alves Marcelino da Silva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof.^a Dr.^a Julliet Araújo de Souza
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof.^a Dr.^a Tássia Karin Ferreira Borba
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

RECIFE

2022

*À minha família, meu alicerce e
porto seguro ao longo desses anos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que sempre me amparou concedendo sabedoria, discernimento e força para enfrentar as inúmeras e mais diversas dificuldades ao longo do doutorado.

A minha mãe, **Maria das Dôres dos Santos Alves**, por todo incentivo e apoio incondicional dispensados desde o momento que decidi cursar a graduação até a conclusão do doutorado. Obrigada, mãe, por de tantas formas me ajudar a lutar e realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos, **Lúcia e Ednaldo**, pelo carinho e torcida de sempre, e de modo especial, a **Edna Alves**, pelo apoio constante e irmandade incondicional.

Ao meu namorado, **Rafael Alves**, pelo amor, carinho, cuidado, compreensão, apoio, incentivo, paciência e auxílio nos meus experimentos. Obrigada por sua presença em minha vida e por ter abraçado como seu um sonho que era meu.

A minha orientadora, a **Prof.^a Dr.^a Elizabeth do Nascimento**, pela oportunidade concedida, pela orientação e por sua confiança.

À **Laura Ramos**, mestranda e parceira de experimentos, que se tornou uma grande amiga.

À **July Emanuele**, estudante de iniciação científica, pelo apoio com os animais e análises realizadas ao longo do período experimental.

Aos companheiros do doutorado, **Humberto Barbosa, Nathália Cavalcanti e Nathália Melo**, pelos momentos científicos, mas também de descontração e desabafo.

Aos **membros do grupo de pesquisa em Nutrição Experimental e Metabolismo**, pelas ricas discussões científicas proporcionadas nos nossos encontros quinzenais.

À **Prof.^a Dr.^a Gisélia Santana Muniz**, por intermediar a obtenção dos animais experimentais e auxiliar durante a realização do estágio docência.

Ao **Sr. Edones França**, pelo cuidado e disponibilização dos animais sempre que solicitado.

Ao **Prof. Dr. Marconi Rodrigues**, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFPE), pela instalação e auxílio com o sistema para investigação do ritmo de atividade locomotora dos animais.

A **Mírian Celly** e **Júlio César Leal**, pelo apoio na utilização dos programas relacionados à atividade locomotora dos animais experimentais.

À **Karen Pugliane**, pelo auxílio constante na construção dos actogramas e palavras de conforto nos momentos de dificuldade.

Ao **Prof. Dr. Pierre Castro Soares** e ao doutorando **Daniel Nunes de Araújo Gonçalves**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por conduzir as análises de dosagens hormonais no soro dos meus animais experimentais.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição** da Universidade Federal de Pernambuco (PPGN/UFPE) pelos conhecimentos repassados nas disciplinas do curso.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro instituído pela concessão de bolsa de doutorado.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
Muitíssimo obrigada!

RESUMO

Alterações em parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos têm sido continuamente destacadas na literatura em função de protocolos de restrição temporal do alimento (RTA) em ratos. Porém, tem-se pouco conhecimento se o restabelecimento da alimentação *ad libitum* restaura os parâmetros modificados. Assim, objetivou-se avaliar o impacto da restrição temporal do alimento associada ou não ao restabelecimento da alimentação *ad libitum* sobre parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos em ratos *Wistar*. O estudo foi desenvolvido com 48 ratos machos recém desmamados mantidos em biotério de ciclo invertido (8:00-20:00hs/escuro e de 20:00h-8:00hs/claro) com temperatura e umidade controladas. Inicialmente, os animais compuseram os grupos Controle (C/n=24) e Restrito (R/n=24). Em seguida, cada grupo foi aleatoriamente subdividido nos grupos Controle 1 (C1/n=12), Controle 2 (C2/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Os grupos controles receberam dieta padrão de biotério *ad libitum* por todo experimento. Os grupos restritos comeram *ad libitum* durante três semanas pós-desmame; em seguida, ficaram em jejum durante 8hs na fase escura e se alimentaram por 16hs (4h na fase escura e 12hs na fase clara do ciclo) durante seis semanas. Posterior a restrição alimentar, os animais do grupo RR voltaram a se alimentar *ad libitum*, durante seis semanas, sendo eutanasiados ao final do experimento. Os parâmetros avaliados foram: peso corporal, gordura visceral, ingestão alimentar, glicemia circadiana, tolerância à glicose, perfil glicêmico e lipêmico, níveis hormonais e ritmo de atividade locomotora. A normalidade foi verificada a partir do teste de Shapiro-Wilk e comparações foram realizadas através do T-Student e da ANOVA seguida dos Testes de Bonferroni ou Holm Sidak. A significância adotada foi de $p < 0,05$ sendo os dados analisados no GraphPad Prism®9 com os resultados expressos em média e desvio padrão. Os resultados demonstraram que os animais restritos reduziram o peso corporal e a ingestão alimentar total em 24h, porém, apresentaram aumento em torno de 60% da quantidade de gordura visceral comparado ao C1. A restrição também causou alteração no ritmo de ingestão alimentar; na glicemia circadiana, melhora da tolerância à glicose aos 60 min, redução nos níveis de insulina e aumento de leptina no ZT (*zeitgeber*) 20, menor percentual de ritmicidade da atividade locomotora, com menor atividade e atraso no pico de atividade, mas maior estabilidade interdiária. Após

restabelecimento da alimentação *ad libitum*, os animais do grupo RR apresentaram, comparado ao C2, semelhante quantidade de gordura na região abdominal, normalização do ritmo e padrão de ingestão alimentar, da glicemia circadiana, da tolerância à glicose e dos níveis de insulina e leptina no ZT20. Contudo, permaneceram com menor percentual de ritmicidade, menor atividade e atraso no pico de atividade, sendo também menor a estabilidade interdiária. Conclui-se que a restrição temporal do alimento provoca alterações fisio-metabólicas em ratos. E, que após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* ocorre restauração dos parâmetros nutricionais e metabólicos, mas continuidade de alterações no ritmo de atividade locomotora caracterizando uma dessincronização circadiana que pode em longo prazo associar-se à predisposição para surgimento de doenças metabólicas.

Palavras-chave: ritmo circadiano; ingestão alimentar; crononutrição; obesidade abdominal.

ABSTRACT

Metabolic and physiological alterations have been continuously highlighted in the literature as a function of timed restriction feeding protocols in rats. However, there is little knowledge of whether restoring the ad libitum food intake restores the modified parameters. Therefore, this study aims to evaluate the impact of the timed restriction feeding followed, or not, by the restoring of the ad libitum diet on the nutritional and physic-metabolic parameters in adult Wistar rats. The study was conducted with 48 male weaned rats, acclimatized in a reversed 12h dark/light cycle (8:00-20:00/dark and 20:00-8:00 light), whose temperature and humidity was controlled. The animals were divided into the Control group (C/n=24) and Restricted (R/n=24). Afterwards, each group was arbitrarily subdivided into groups Control 1 (C1/n=12), Control 2 (C2/n=12), timed restriction feeding (R/n=12) and timed restricted feeding followed by restoring the ad libitum food intake (RR/n=12). Both control groups received ad libitum diet throughout the experiment. The restricted groups received ad libitum for three weeks after weaning; after, they fastened through 8 h in the dark phase and feed for 16 h (4 h in the dark phase and 12 h in the light phase) for six weeks. After the timed restriction feeding, the animals of RR group returned to ad libitum diet, for six weeks, being euthanized at the end of the experiment. The parameters evaluated were: body weight, visceral fat, food intake, circadian blood glucose, glucose tolerance, glycemic and lipid profile, hormonal levels and locomotor activity rhythms. The data normality was tested employing the Shapiro-Wilk test and the comparisons were performed through t-student and ANOVA tests, followed by Bonferroni or Holm-Sidak post-hoc test. The significance was set at $p < 0.05$ as the data was analyzed in GraphPad Prism® 9.0. The results are expressed in mean and standard deviation. The results reveal the restricted animals reduce their body weight and the total food intake in 24 h. However, they presented an increase in abdominal fat compared to C1. The restriction also altered the food intake rhythm, the circadian blood glucose, increased glucose tolerance in 60 min, and decreased insulin levels and increase of leptin in ZT (*zeitgeber*) 20, lower percentage of the locomotor activity rhythm, presenting lower activity and delay in the activity peak, with higher inter daily stability. After re-establishing the *ad libitum* diet, the RR group animals presented, compared to C2, similar abdominal fat, normalization of the rhythm and food intake pattern, circadian blood glucose, glucose tolerance, insulin and leptin levels in ZT 20. However, remained

with lower rhythm, lower activity and delay in activity peak. It is concluded that the timed restriction feeding provokes physio-metabolic alteration in rats. And after re-establishing the ad libitum food intake, the physio-metabolic parameters are restored, however, the alterations in the locomotor activity remain, characterizing a circadian desynchronizing that in long term can be associated with the surge of metabolic diseases.

Keywords: circadian rhythm; food intake; chrononutrition; abdominal obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Organização molecular do sistema de temporização circadiano.....	24
Figura 2 -	Cronadores do sistema circadiano e alinhamento do NSQ e osciladores periféricos	27
Figura 3 -	Esquema de organização temporal da restrição temporal do alimento e da avaliação do padrão circadiano da ingestão alimentar, da curva da glicemia e do ritmo de atividade locomotora dos animais experimentais.....	42
Figura 4 -	Desenho experimental do estudo segundo as fases do experimento.....	44
Figura 5 -	Distribuição dos grupos segundo o padrão de alimentação a partir do fim da restrição temporal do alimento.....	45
Figura 6 -	Representação gráfica de parâmetros rítmicos ajustados pelo método COSINOR.....	48
Figura 7 -	Cabines de Registro de Atividade.....	51
Figura 8 -	Sistema de Registro de Atividade.....	52
Figura 9 -	Peso corporal de ratos antes da restrição alimentar, na restrição temporal do alimento e no restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	55
Figura 10 -	Ganho de peso absoluto (g) do desmame ao final da restrição temporal do alimento (A) e ao final do período de restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (B).....	56
Figura 11 -	Coefficiente de Eficiência Alimentar do desmame ao final da restrição temporal do alimento (A) e ao final do período de restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	57
Figura 12 -	Gordura visceral de ratos adultos submetidos a restrição temporal do alimento (A) e restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (B).....	58
Figura 13 -	Ritmo circadiano da alimentação (g/100g) antes da restrição alimentar (A), na restrição temporal do alimento (B) e no período de restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (C).....	60

Figura 14 -	Ingestão alimentar média (g/100g) de ração por fases (escura e clara) e ao longo do ciclo de 24 horas antes da restrição alimentar (A, B, C), na restrição temporal do alimento (D, E, F) e no restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (G, H, I)	61
Figura 15 -	Curva glicêmica circadiana realizada antes da restrição alimentar (A), na restrição temporal do alimento (B) e no restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (C).....	63
Figura 16 -	Tolerância à glicose (A, C, E) e área sob a curva de glicose (B, D, F) antes da restrição alimentar (A e B), na restrição temporal do alimento (C e D) e no restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (E e F)	65
Figura 17 -	Perfil hormonal no soro de ratos adultos nos Zt12 e Zt 20 submetidos a restrição temporal do alimento.....	67
Figura 18 -	Análise hormonal por zeitgeber (12 e 20) intragrupos em função da restrição temporal do alimento.....	68
Figura 19 -	Perfil hormonal no soro de ratos adultos nos ZT12 e ZT20 submetidos a restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	69
Figura 20 -	Análise hormonal por zeitgeber (12 e 20) intragrupos em função da restrição temporal do alimento associada ou não ao restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	70
Figura 21 -	Actogramas representativos.....	73
Figura 22 -	Perfil do ritmo de atividade locomotora em 24h.....	74
Figura 23 -	Ritmo circadiano e média da atividade locomotora em função da restrição temporal do alimento (A e B) e do restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (C e D)	76
Figura 24 -	Perfil de atividade locomotora de animais controles e submetidos a restrição temporal do alimento analisados pelo método Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase.....	77
Figura 25 -	Perfil de atividade locomotora de animais controles e submetidos a restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> analisados pelo método Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil glicêmico e lipêmico no soro de ratos adultos submetidos ou não à restrição temporal do alimento seguida ou não do restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	71
Tabela 2 - Variáveis paramétricas e não paramétricas do ritmo de atividade locomotora de ratos submetidos ou não a restrição temporal do alimento seguida ou não do restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA	Atividade Antecipatória ao Alimento
AgRP	Proteína Relacionada ao Agouti
AHL	Área Hipotalâmica Lateral
ARC	Núcleo Arqueado
BMAL1	<i>Brain and Muscle ARNT-like Protein-1</i>
CART	Fator Transcrito Relacionado à Cocaína
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CRY1	<i>Cryptochrome 1</i>
CRY2	<i>Cryptochrome 2</i>
DMN	Núcleo Dorsomedial
FAA	<i>Food Anticipatory Activity</i>
FEO	<i>Food-Entrainable Oscillator</i>
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
ipRGCs	Células Ganglionares Da Retina Intrinsecamente Fotossensíveis
LEO	<i>Light-Entrainable Oscillator</i>
NPY	Neuropeptídeo Y
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
ORX	Orexina
PER1	<i>Period 1</i>
PER2	<i>Period 2</i>
PER3	<i>Period 3</i>
POMC	Pró-Opiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular
REV-ERB α	<i>Reverse Erythroblastosis Vírus α</i>
REV-ERB β	<i>Reverse Erythroblastosis Vírus β</i>
ROR α	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor α</i>
ROR β	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor β</i>
ROR γ	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γ</i>
RTA	Restrição Temporal do Alimento
SNC	Sistema Nervoso Central
TRH	Trato retino hipotalâmico

VTM

Núcleo Ventromedial

ZSPV

Zona Subparaventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANO.....	21
2.2	ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA CIRCADIANO.....	22
2.3	CRONADORES AMBIENTAIS DO SISTEMA CIRCADIANO.....	25
2.4	RITMOS CIRCADIANOS E ALIMENTAÇÃO.....	28
2.5	RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO (RTA).....	33
2.6	RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	36
3	HIPÓTESES.....	39
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	GERAL.....	40
4.2	ESPECÍFICOS.....	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
5.2	PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO E RESTABELECIMENTO DA ALIMENTAÇÃO <i>AD LIBITUM</i>	43
5.3	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL, GANHO DE PESO E COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR.....	45
5.4	INGESTÃO ALIMENTAR E CURVA GLICÊMICA.....	45
5.5	TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	46
5.6	ANÁLISE DO RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA (RITMO DE ATIVIDADE-REPOUSO)	46
5.7	EUTANÁSIA.....	52
5.8	AVALIAÇÃO <i>POST-MORTEM</i>	53
5.8.1	Determinação do perfil glicêmico, lipêmico e hormonal.....	53
5.8.2	Avaliação do peso úmido da gordura abdominal e fígado.....	53
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	EVOLUÇÃO PONDERAL.....	55
6.2	GORDURA VISCERAL E PESO DO FÍGADO ÚMIDO.....	57
6.3	PADRÃO CIRCADIANO DE ALIMENTAÇÃO.....	58

6.4	GLICEMIA CIRCADIANA.....	61
6.5	TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE.....	64
6.6	PERFIL HORMONAL.....	66
6.7	PERFIL BIOQUÍMICO.....	71
6.8	RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	72
6.8.1	Actogramas, perfil de atividade em 24 horas, análises cosinor e não paramétricas.....	72
7	DISCUSSÃO.....	80
8	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE A - ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: OFERTA AD LIBITUM DA ALIMENTAÇÃO.....	112
	APÊNDICE B – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: RAÇÃO RETIRADA DURANTE AS PRIMEIRAS OITO HORAS DA FASE ESCURA (ZT12/08:00H À ZT20/16:00H) E OFERTADA ENTRE ZT20 (16:00 HORAS DA TARDE, OITO HORAS APÓS INÍCIO DA FOTOFASE ESCURA) E ZT12 (08:00 HORAS DO DIA SEGUINTE) ..	113
	APÊNDICE C – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 75: OFERTA AD LIBITUM DA ALIMENTAÇÃO.....	114
	APÊNDICE D – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: RAÇÃO RETIRADA DURANTE AS PRIMEIRAS OITO HORAS DA FASE ESCURA (ZT12/08:00H À ZT20/16:00H) E OFERTADA ENTRE ZT20 (16:00 HORAS DA TARDE, OITO HORAS APÓS INÍCIO DA FOTOFASE ESCURA) E ZT12 (08:00 HORAS DO DIA SEGUINTE). DIA 45 A 75: OFERTA AD LIBITUM DA ALIMENTAÇÃO.....	115
	APÊNDICE E – ARTIGO ORIGINAL “TIME-RESTRICTED FEEDING IN DARK PHASE OF CIRCADIAN CYCLE AND/OR WESTERNIZED DIET CAUSE MIXED HYPERLIPIDEMIA IN RATS”	116
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE	125

1 INTRODUÇÃO

O funcionamento diário dos processos fisio-metabólicos e comportamentais nos organismos é regulado por um sistema circadiano que gera ritmos intrínsecos com uma periodicidade de, aproximadamente, 24 horas. O sistema circadiano consiste numa rede hierárquica de múltiplos osciladores com o núcleo supraquiasmático (NSQ) ocupando a centralidade e regulando os osciladores periféricos localizados em todo o corpo (HONMA, 2018; ZHANG et al., 2020). No aspecto molecular, os osciladores mantêm a ritmicidade devido a ocorrência de ciclos de *feedback* de transcrição e tradução autorregulatórios (TAKAHASHI, 2017) que ocorrem por meio de um conjunto de genes, os “genes circadianos”, que incluem *Clock*, *Bmal1*, *Per (1, 2, 3)*, *Cry (1, 2)*, *Rev-erb (α e β)* e *Ror (α , β , γ)* (STENVERS et al., 2019).

Embora intrinsecamente gerados, os ritmos endógenos são também modulados por fatores ambientais (POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018). “*Zeitgebers*”, do Alemão, doadores de tempo, é o termo utilizado para denominar as pistas ambientais capazes de arrastar os osciladores circadianos (FLANAGAN et al., 2020; KIEHN et al., 2017). O alinhamento entre as pistas ambientais e o ritmo endógeno é denominado sincronização. Dessincronização é o termo utilizado para caracterizar o desalinhamento entre os *zeitgebers* e os ritmos circadianos (HONMA, 2018; POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018) sendo esta uma condição que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de diversas doenças.

A luz é o principal *zeitgeber* para o sistema circadiano. Ela exerce sua influência sobre o NSQ permitindo que este se ajuste ao ciclo claro-escuro e seja, além de oscilador central, considerado um elemento do sistema sincronizado pela luz (do inglês, *Light-Entrainable Oscillator* ou LEO) (CAVALCANTE et al., 2008; CHOU et al., 2003; LU et al., 2001). Além da informação luminosa, a alimentação é também um potente sincronizador ambiental para os osciladores circadianos, particularmente os osciladores periféricos, como o sangue, o tecido adiposo, o pâncreas e o fígado (ALBRECHT, 2012). A modulação da atividade das células do oscilador pela alimentação, que continua a influenciar estruturas periféricas mesmo quando o NSQ está lesionado, é um fenômeno conhecido como oscilador sincronizado por alimento (do inglês, *Food-Entrainable Oscillator* ou FEO) (CAVALCANTE, 2008; DÍAZ-MUÑOZ et al, 2010; KRIEGER; HAUSER; KREY, 1977; STEPHAN; SWANN; SISK, 1979).

O ritmo fisiológico da ingestão alimentar é um comportamento regulado por vias neurais juntamente com órgãos periféricos, que sinalizam o estado energético do corpo nos períodos de fome e saciedade, e pode ser modulado por fatores ambientais (ROSSI; STUBER, 2018). Sabendo que os processos fisiológicos estão sob o controle circadiano, o consumo de alimentos deve ser regulado no tempo. Assim, as variações cíclicas no ritmo alimentar são sincronizadas com o ciclo claro-escuro através do NSQ, que coordena o horário de ingestão de alimentos através das projeções que nele se originam e alcançam as áreas cerebrais envolvidas com a regulação do comportamento alimentar (MENDOZA, 2019a; PATTON; MISTLBERGER, 2013). A grande questão, porém, é que o horário de ingestão dos alimentos parece afetar de maneira positiva (sincronizado) ou negativa (dessincronizado) o sistema circadiano (MENDOZA, 2019b).

Alterações no padrão de alimentação, a exemplo do que ocorre com indivíduos que não costumam realizar as refeições em horários regulares, mas sim no período biologicamente destinado ao seu descanso, podem causar desalinhamento entre os osciladores do sistema circadiano e as pistas ambientais (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003). A “restrição temporal do alimento (RTA)” é uma estratégia alimentar relacionada a jejum intermitente, na qual a ingestão de alimentos ocorre numa janela temporal específica durante o ciclo diurno/noturno (DE GOEDE et al., 2020). Em modelos animais, a alimentação restrita ao período de luz (fase inativa ou período de repouso do animal) é um modelo utilizado para mimetizar os padrões alimentares de indivíduos que costumam se alimentar no momento destinado ao sono (OPPERHUIZEN et al., 2015) sendo, por isso, um protocolo que permite avaliar as repercussões de um padrão alimentar alterado, pois se concentra num horário incomum de alimentação, sobre as condições de saúde.

Em roedores, a RTA durante o período inativo provoca um desalinhamento entre o período de ingestão alimentar e o ciclo sono/vigília (DE GOEDE et al., 2020) resultando em alteração do ritmo endógeno da ingestão de alimentos (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2010) assim como em disfunções metabólicas e fisiológicas que desencadeiam os sintomas de doenças como a obesidade e doenças correlacionadas (diabetes tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemias e doenças cardiovasculares). O uso desses protocolos também induz uma atividade excitatória específica em roedores conhecida como “atividade antecipatória ao alimento (AAA)” (do inglês, *food anticipatory activity* ou FAA), que se caracteriza pelo aumento da atividade locomotora do animal, dentre

outros parâmetros, momentos antes da oferta de alimento (TAHARA; SHIBATA, 2013). Estudos com AAA identificaram essa antecipação como uma forma comportamental do FEO, ou seja, a disponibilidade do alimento altera o comportamento alimentar dos animais (CARNEIRO; ARAUJO, 2012).

As evidências entre restrição temporal do alimento para algumas horas do ciclo circadiano e alterações na ingestão de alimentos, secreção hormonal, metabolismo celular e ritmo da atividade locomotora já foram documentadas em alguns estudos (CHAIX et al., 2014; COSTA et al., 2021; DE GOEDE et al., 2020; HATORI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2021). Contudo, são escassos os que questionam se as alterações provocadas pela restrição alimentar permanecem após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* (DE GOEDE et al., 2020).

O presente estudo traz a hipótese de que a RTA durante 16 horas, mimetizando hábitos alimentares de indivíduos que não costumam realizar as refeições em horários regulares, mas sim no período destinado ao descanso, provocará distúrbios em parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos em ratos *wistar*, que permanecerão mesmo após o restabelecimento da alimentação *ad libitum*.

Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da restrição temporal do alimento durante 16 horas seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum* sobre parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos em ratos *Wistar*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANO

O termo “circadiano” provém da palavra latina “*circa diem*” que significa “cerca de um dia” (do latim, “*circa*” cerca /ao redor e “*diem*” dia), e como todos os ritmos diários ou diurnos, “ritmo circadiano” refere-se aos ciclos ou padrões periódicos que se repetem, aproximadamente, a cada 24 horas (POGGIOPALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018; TAHARA; SHIBATA, 2013). Os ritmos circadianos são distribuídos nos reinos biológicos, nas bactérias (OUYANG et al., 1998), fungos (GARDNER; FELDMAN, 1980), insetos, plantas (KONOPKA; BENZER, 1971) e vertebrados (VITATERNA et al., 1994). Além dos ritmos com periodicidade em torno de 24 hs (circadianos), há aqueles que têm períodos mais longos que os ritmos circadianos, denominados infradianos, a exemplo do ciclo menstrual, e os ritmos que possuem períodos mais curtos, chamados ultradianos, como a frequência cardíaca e respiratória (ROBERTO REFINETTI, 2019).

A maior parte dos processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais dos mamíferos, a exemplo da secreção hormonal, atividade locomotora, metabolismo energético, ciclo sono e vigília, ingestão alimentar (GOOLEY, 2016), entre outros, apresentam oscilações diárias (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Estes processos rítmicos são endogenamente gerados e controlados pelo sistema de temporização circadiano que confere a vantagem adaptativa da regulação homeostática preditiva (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003), isto é, a capacidade do organismo antecipar e se adaptar às mudanças rítmicas previsíveis no ambiente (GARAULET et al., 2020). Uma das características mais importantes do nosso sistema de temporização é que os ritmos circadianos são gerados endogenamente e perpetuam-se mesmo na ausência de informações externas (POGGIOPALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018; TAHARA; SHIBATA, 2013) o que sugere que nosso corpo tem seu próprio oscilador interno (TAHARA; SHIBATA, 2013).

Nos mamíferos, o sistema circadiano consiste numa rede hierárquica multi-oscilatória composta por um oscilador central situado no cérebro e osciladores periféricos distribuídos em quase todas as células do corpo (ALBRECHT, 2012; BROWN; PENDERGAST; YAMAZAKI, 2019; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; STRATMANN; SCHIBLER, 2006; TAKAHASHI, 2017). Com o objetivo de

investigar estruturas cerebrais que poderiam servir como osciladores, estudos de lesão (COOMANS et al., 2013; LEHMAN, 1987) e transplante (LEHMAN, 1987) no encéfalo de animais levaram à identificação do núcleo supraquiasmático (NSQ), uma estrutura pareada no hipotálamo localizada logo acima do quiasma óptico (ALBRECHT, 2012; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). No sistema circadiano, o NSQ representa o topo da organização hierárquica atuando como oscilador, relógio ou marcapasso central (TAKAHASHI, 2017; TAKAHASHI et al., 2008) necessário para a geração dos ritmos circadianos no comportamento e na fisiologia (BROWN; PENDERGAST; YAMAZAKI, 2019).

Os osciladores circadianos também existem em outras regiões cerebrais e na maioria, senão em todos, órgãos e tecidos periféricos (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; PATTON; MISTLBERGER, 2013). No interior de cada tecido, as células do oscilador devem ser acopladas umas às outras para que a organização circadiana surja a nível tecidual (PATTON; MISTLBERGER, 2013). Em nível de comunicação periférica e central no sistema circadiano, os osciladores periféricos são normalmente acoplados ao oscilador central, o NSQ, através de vias nervosas centrais e autônomas e sinais neuroendócrinos (hipotálamo-hipófise) (CHALLET, 2015; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Os osciladores periféricos podem ser observados em órgãos e tecidos periféricos, a exemplo do coração, pulmão, fígado, intestino, adrenal e tecido adiposo (GARAULET; ORDOVÁS; MADRID, 2010; LEVI; SCHIBLER, 2007).

O sistema circadiano, além da organização hierárquica composta pelos osciladores central e periféricos, também apresenta uma organização molecular que é responsável, por meio dos ciclos de expressão autorregulatórios dos chamados genes circadianos, pela manutenção da ritmicidade do sistema de temporização.

2.2 ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA CIRCADIANO

O mecanismo molecular do sistema de temporização circadiano, que impulsiona as oscilações circadianas em células de mamíferos mantendo a organização do sistema, acontece através da ocorrência de ciclos de expressão gênica (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003; TAKAHASHI, 2017). O mecanismo dos osciladores consiste num *feedback* transcricional-traducional autorregulatório envolvendo um conjunto de genes específicos, denominados genes circadianos, que

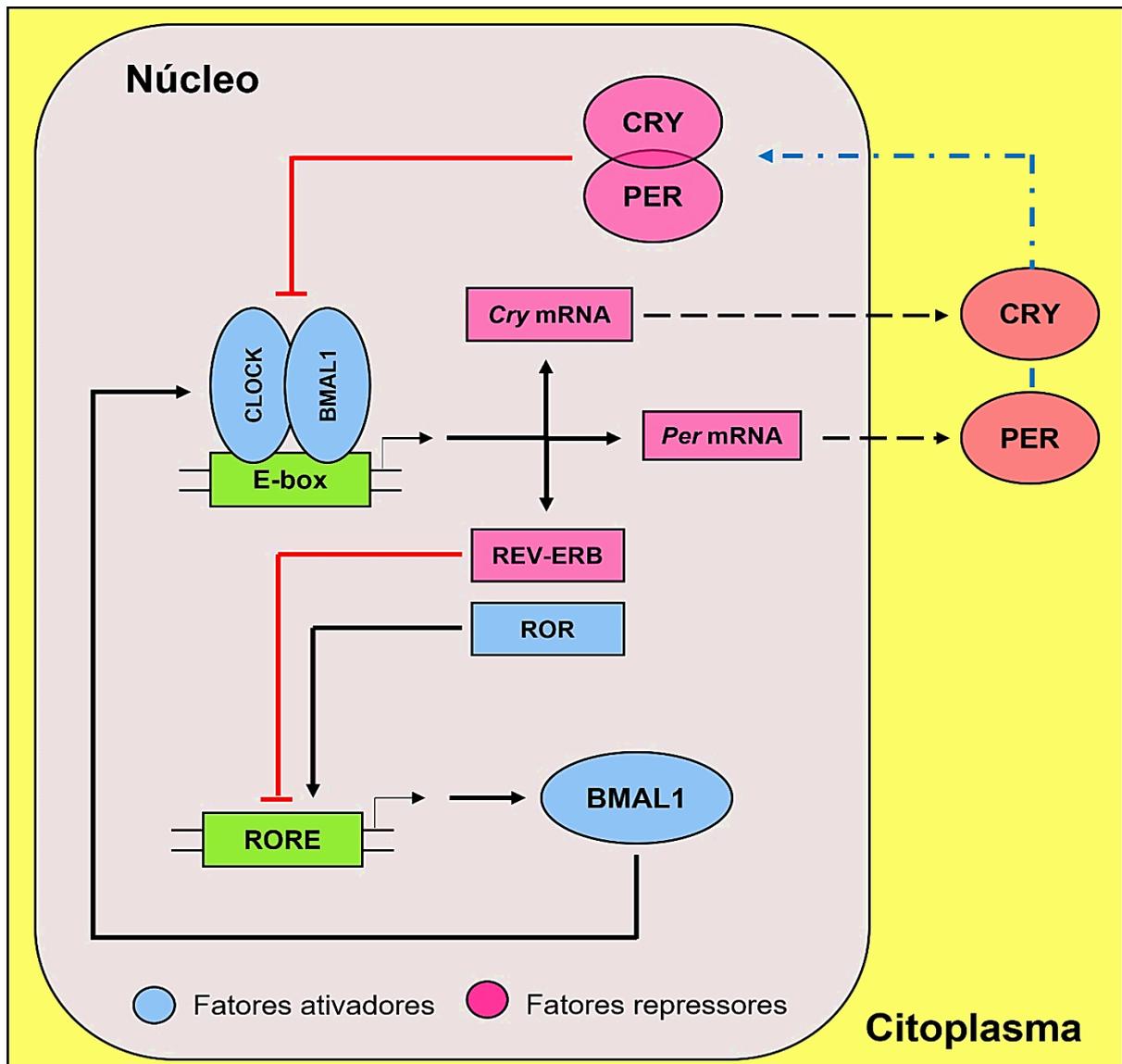
são expressos em quase todas as células e fazem com que determinadas proteínas e fatores de transcrição sejam expressos e transcritos em um ciclo circadiano (KIEHN et al., 2017; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; TAKAHASHI, 2017). Os genes circadianos podem funcionar como fatores ativadores ou repressores de suas próprias transcrições. Proteínas ativadoras se unem e iniciam a produção de proteínas repressoras que, após determinado período, também se unem e inibem as ativadoras, diminuindo a própria produção e atividade (SOUZA, 2014).

Os genes cuja codificação está envolvida nos mecanismos de ritmicidade circadiana são: *circadian locomotor output cycles kaput* (*Clock* ou seu ortólogo *Npas2*), os genes do período - do inglês *period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*), os genes cripto-monocromáticos - do inglês *cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*), o *Arntl* - do inglês *brain and muscle ARNT-like protein-1* (*Bmal1*), os genes que codificam os receptores nucleares - do inglês *reverse rythroblastosis vírus* (*Rev-erba* e *Rev-erbb*) e o receptor órfão relacionado ao ácido-retinóico - do inglês *retinoic acid-related orphan receptor* (*Rora*, *Rorb* e *Rory*) (STENVERS et al., 2019). Os eventos moleculares dos osciladores começam a ocorrer no início do dia circadiano onde, no núcleo das células, os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 formam um heterodímero (CLOCK/BMAL1) que se liga à região promotora, denominada E-box, de alguns genes alvo e conduz a transcrição dos genes: período (*Per1*, *Per2*, *Per3*), cripto-monocromáticos (*Cry1*, *Cry2*) e fator de transcrição reversa (*Rev-erba*), ambos genes repressores; e do gene promotor, o receptor órfão relacionado ao ácido-retinóico (*Rora*). Ao longo do dia circadiano, no citoplasma das células, os genes *Per* e *Cry* são traduzidos em proteínas e formam dímeros. Esses dímeros, no final do dia circadiano, são translocados de volta ao núcleo onde seu acúmulo neutraliza o efeito positivo do heterodímero CLOCK/BMAL1 culminando com o bloqueio da sua própria transcrição (GARAULET; ORDOVÁS; MADRID, 2010; TAHARA; SHIBATA, 2013). A ocorrência desse evento finda um ciclo circadiano de expressão gênica sendo o ciclo subsequente iniciado quando os níveis nucleares do heterodímero PER/CRY diminuem (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003).

Embora haja algum entendimento a respeito da regulação da expressão dos genes repressores *Per* e *Cry*, o mecanismo responsável pela regulação da expressão dos genes ativadores, *Clock* e *Bmal1*, ainda é pouco conhecido (AKASHI; TAKUMI, 2005). O gene *Clock*, que codifica a proteína de mesmo nome, possui expressão

constitutiva, isto é, não apresenta variações diárias significativas na sua expressão (BALMFORTH et al., 2007). Quanto ao *Bmal1*, sua expressão é regulada negativamente pelo fator de transcrição *Rev-erba* (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003) e positivamente pelo *Rora*, os quais competem pela região promotora (RORE) do gene *Bmal1* (AKASHI; TAKUMI, 2005; GUILLAUMOND et al., 2005). Tanto o *Rev-erba*, quanto o *Rora* têm sua expressão aumentada pelo heterodímero CLOCK/BMAL1 (DUEZ; STAELS, 2008). A Figura 1 demonstra o mecanismo molecular do sistema de temporização circadiano.

Figura 1: Organização molecular do sistema de temporização circadiano. No núcleo o heterodímero CLOCK/BMAL1 se liga à região E-box de genes alvos e ativa a transcrição dos genes circadianos *Per*, *Cry*, *Rev-erba* e *Rora*. *Per* e *Cry* mRNAs são traduzidos no citoplasma e unem-se formando um dímero, que entra no núcleo da célula e se liga a CLOCK/BMAL1 para bloquear a transcrição de *Per*. REV-ERB e ROR agem sobre a região promotora RORE bloqueando ou ativando a transcrição de BMAL1, respectivamente.



Fonte: Yao e colaboradores (2022) e Guan; Lazar (2021)

Os ritmos biológicos são endogenamente gerados pelo sistema de temporização circadiano, porém, variáveis presentes no ambiente denominadas cronadores ambientais podem arrastar os osciladores circadianos influenciando a forma como o sistema de temporização funciona.

2.3 CRONADORES AMBIENTAIS DO SISTEMA CIRCADIANO

Como mencionado, por ser gerado endogenamente o sistema circadiano pode manter a ocorrência de ritmos circadianos mesmo na ausência de estímulos ambientais. Contudo, as oscilações endógenas que geram os ritmos biológicos se ajustam a variações cíclicas do ambiente externo a fim de manter uma relação de fase estável do ritmo com a variável ambiental (COSTA, 2017; POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018). O tempo (fase) de cada ritmo circadiano é determinado por fatores externos e internos em um processo conhecido como arrastamento (POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018).

Os *zeitgebers*, do Alemão “doador de tempo”, ou cronadores são pistas/variáveis externas/ambientais capazes de arrastar os osciladores circadianos e redefinir a fase reduzindo ou prolongando temporariamente o período endógeno dos ritmos circadianos (FLANAGAN et al., 2020; KIEHN et al., 2017). As variáveis ambientais sincronizadoras dos relógios biológicos referem-se aos estímulos fóticos, isto é, mediados pela luz, e não fóticos, não mediados pela luz (SOUZA, 2014). Na natureza, a ocorrência dos ritmos biológicos nos animais pode se apresentar de formas diferentes sempre que os osciladores circadianos se apresentem de duas maneiras. Assim, existe a relação de fase estável com a respectiva variável ambiental, processo denominado sincronização, ou de fase divergente ao seu respectivo *zeitgeber*, processo denominado dessincronização (POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018).

A luz, um potente sincronizador externo, é o principal cronador que impulsiona o ritmo do oscilador central, o NSQ, permitindo que ele se ajuste à pista temporal geofísica, o ciclo claro-escuro, que surge pelo movimento de rotação da terra sob seu próprio eixo (POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018; SOUZA, 2014). Além de oscilador central, o NSQ é considerado um elemento do sistema de sincronização pela luz (do inglês, *Light-Entrainable Oscillator* ou LEO). Para ser capaz de ajustar a organização interna com as pistas ambientais, as células ganglionares da retina

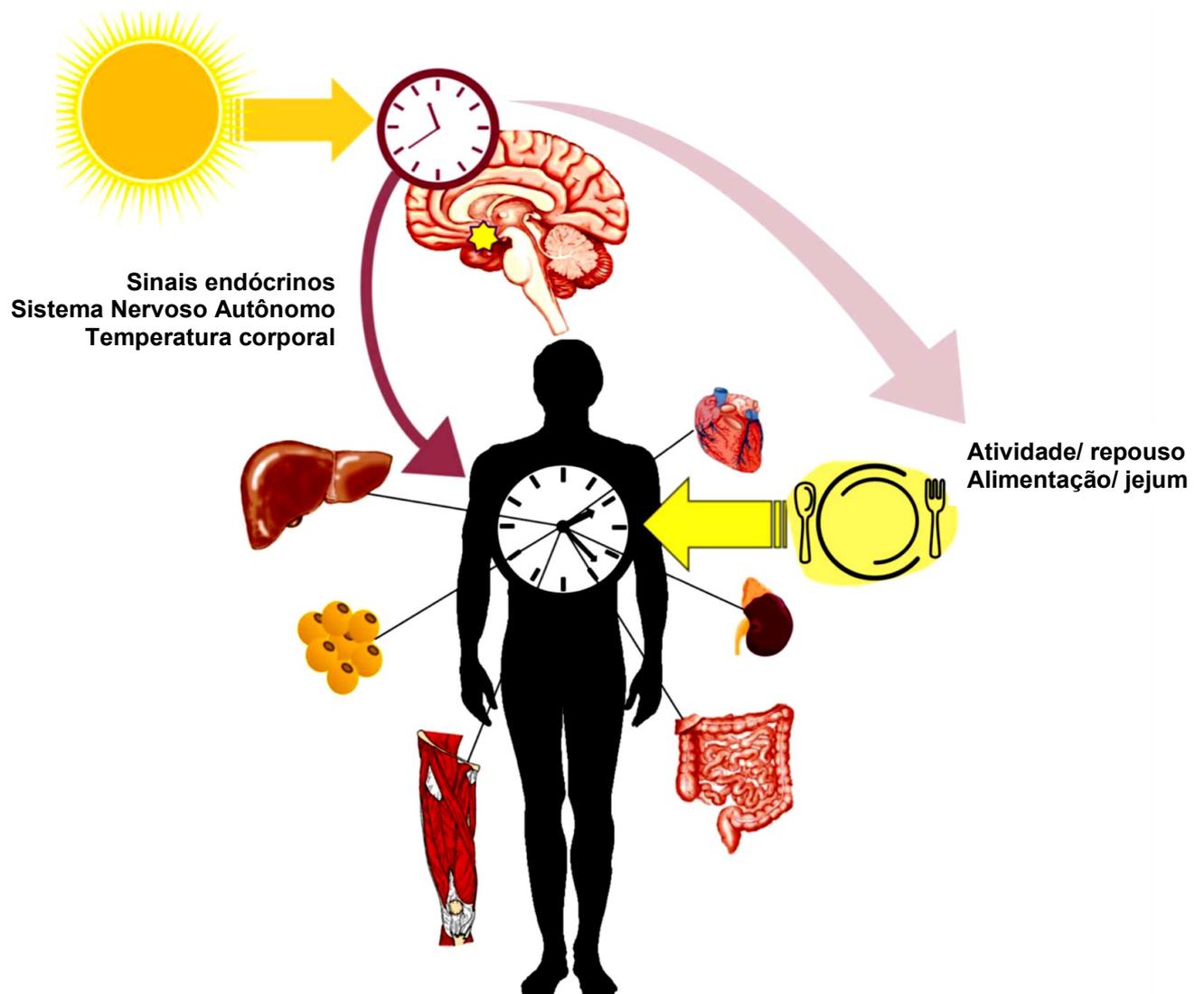
intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) captam a informação luminosa externa e a transmite para o núcleo supraquiasmático via transmissão sináptica através dos axônios do trato retino hipotalâmico (TRH) (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; KIEHN et al., 2017). Em seguida, o NSQ transmite, através de uma variedade de saídas, sua informação rítmica para células calizadas em outras regiões cerebrais e órgãos periféricos (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; FULLER; LU; SAPER, 2008). O NSQ regula, além de outros sistemas, o metabolismo energético, influenciando processos como a ingestão alimentar e a expressão, secreção e atividade de hormônios e enzimas metabólicas através de sinais neuronais e endócrinos (BARCLAY et al., 2012; CHALLET, 2015; OISHI; ITOH, 2013). O NSQ é necessário para a expressão de ritmos circadianos endógenos e é sincronizado pela luz; e sua lesão causa perda destes ritmos (VAN ESSEVELDT; LEHMAN; BOER, 2000).

Os ritmos circadianos nos tecidos periféricos, além da integração de entradas provenientes do oscilador central, sofrem influência de fatores externos não-fóticos, como a alimentação e metabólitos (BARCLAY et al., 2012; FLANAGAN et al., 2020). Assim, no sistema circadiano, admite-se que além do oscilador sincronizado pela luz (LEO), há um outro sistema que depende do alimento para ocorrer. Dessa forma, o alimento, mais precisamente a disponibilidade cíclica deste, pode ser um sincronizador não fótico para os osciladores circadianos dos mamíferos tão potente quanto o ciclo claro-escuro, especialmente para os osciladores periféricos (ALBRECHT, 2012; TAHARA; SHIBATA, 2013). A modulação da atividade das células do oscilador pela alimentação, e, por conseguinte, da expressão gênica, é conhecida como oscilador sincronizado ou arrastado por alimento (do inglês, *Food-Entrainable Oscillator* ou FEO) (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2010). Nos mamíferos, o oscilador sincronizado por alimento não possui seus componentes e localização totalmente caracterizados; diferente do oscilador arrastado pela luz (do inglês, *Light-Entrainable Oscillator* ou LEO) que tem o hipotálamo como localização e o núcleo supraquiasmático como principal elemento (CARNEIRO; ARAUJO, 2012).

Nos últimos anos, o horário de ingestão das refeições emergiu como um dos cronadores ou pistas ambientais que definem a fase dos osciladores periféricos (ALMOOSAWI et al., 2019; JOHNSTON et al., 2016). Existem diferentes fatores que definem as fases dos osciladores central e periféricos. Estes dois sistemas de

osciladores ficam dessincronizados sempre que ocorre falta de sincronia entre o ritmo endógeno e as pistas ambientais ou seus respectivos *zeitgebers*. Esta dessincronização compromete o metabolismo, uma vez que os dois sistemas de osciladores coordenam em conjunto as vias metabólicas interdependentes (POGGIOGALLE; JAMSHED; PETERSON, 2018), que apresenta ruptura dos seus processos e conseqüente desenvolvimento de desordens metabólicas (PAGE et al., 2020). Na Figura 2 é demonstrada a influência dos cronadores ambientais sobre o sistema circadiano assim como o alinhamento entre os osciladores central e periféricos.

Figura 2: Cronadores do sistema circadiano e alinhamento do NSQ e osciladores periféricos. O zeitgeber primário do oscilador central, o NSQ, é a luz, enquanto os osciladores periféricos são fortemente arrastados por ritmos de alimentação e jejum. O NSQ sincroniza os ritmos periféricos diretamente através de sinais endócrinos e do sistema nervoso autônomo (SNA) e a regulação da temperatura corporal central, bem como indiretamente através de feedback comportamental dos ritmos de atividade e alimentação.



É notável a importância do sistema circadiano para a geração e controle dos diversos ritmos biológicos, porém, a manipulação de cronadores ambientais, a exemplo do horário de ingestão de alimentos, pode impactar, de modo positivo ou negativo, o funcionamento desse sistema de osciladores, especialmente quando se trata dos osciladores localizados nos órgãos periféricos.

2.4 RITMOS CIRCADIANOS E ALIMENTAÇÃO

A ingestão alimentar envolve um comportamento que conta com a participação de substratos neurais que funcionam, de forma interativa e equilibrada, em conjunto com órgãos periféricos que indicam o estado energético do organismo, sinalizando condições de fome e de saciedade (MENDOZA, 2019a). A regulação da ingestão alimentar envolve dois principais mecanismos cerebrais distintos, porém relacionados: os mecanismos homeostático e não homeostático ou hedônico; este conhecido como sistema de recompensa/prazer (LUTTER; NESTLER, 2009; MENDOZA, 2019a; ROSSI; STUBER, 2018).

O mecanismo homeostático consiste no sistema metabólico que regula a quantidade de alimento baseado no estado energético do organismo (ROSSI; STUBER, 2018). Ele compreende reguladores hormonais da fome, saciedade e dos níveis de adiposidade (EGECIOGLU et al., 2011; LUTTER; NESTLER, 2009). O mecanismo hedônico, por outro lado, regula a ingestão de alimentos baseado no prazer (ROSSI; STUBER, 2018). De modo geral, alimentos pouco palatáveis, a exemplo das frutas e vegetais, não são excessivamente consumidos, enquanto os alimentos considerados saborosos, como os alimentos ultraprocessados, que são ricos em açúcares e gorduras, são frequentemente ingeridos, mesmo após as necessidades energéticas terem sido atingidas (KENNY, 2011).

Em adição à regulação central, a ingestão alimentar é regulada por sinais humorais periféricos que possuem papel fundamental na transmissão de informações sobre o estado nutricional e adiposidade para o sistema nervoso central (MITCHELL; BEGG, 2021a). Os hormônios periféricos, sendo alguns relacionados com alimentos, possuem a capacidade de atuarem em circuitos cerebrais, por meio de receptores específicos, e modular a expressão de neuropeptídeos que regulam a ingestão alimentar e o peso corporal o que contribui para a manutenção de um balanço energético adequado (ALBRECHT, 2012; KENNY, 2011; LUTTER; NESTLER, 2009;

MENDOZA, 2019a). Dentre os hormônios periféricos com ação central sobre a ingestão alimentar estão a leptina e insulina, sinais de adiposidade além de principais reguladores da homeostase energética (KULLMANN et al., 2020).

A leptina é um sinal humoral de saciedade secretada pelos adipócitos em proporção à quantidade total de tecido adiposo do corpo. Ela é transportada pela barreira hematoencefálica e exerce seus efeitos anorexígenos por meio do núcleo ARC do hipotálamo, onde há neurônios que expressam receptores de leptina. Assim, a leptina estimula a ativação de neurônios anorexígenos (relacionados à saciedade) que expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART), e suprime os neurônios orexígenos (ligados ao estímulo do apetite) que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AgRP) resultando em redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético. Por outro lado, níveis reduzidos de leptina ativam vias anabólicas e inibem vias catabólicas, aumentando a expressão de neurônios NPY/AgRP e bloqueando a atividade dos neurônios POMC/CART, o que resulta em aumento do tamanho da refeição e redução do gasto energético (MOYNIHAN RAMSEY et al., 2007).

Outro sinal periférico que desempenha uma importante função na regulação da ingestão alimentar é o hormônio pancreático insulina. Um aumento no nível de insulina circulante após a realização de uma refeição está associado ao estado de saciedade que decorre da ação da insulina em regiões do cérebro, especialmente núcleos hipotalâmicos, que regulam a ingestão de alimentos. No núcleo ARC do hipotálamo, a insulina diminui a expressão dos peptídeos orexígenos NPY/AgRP ao mesmo tempo que regula positivamente a expressão dos neurônios que expressam os peptídeos anorexígenos POMC/CART resultando em redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (KULLMANN et al., 2020; MITCHELL; BEGG, 2021b).

A ingestão alimentar também pode ser regulada por hormônios secretados em situação de estresse, como o cortisol, quando referido em humanos, e corticosterona, em roedores. Os glicocorticoides podem atuar diretamente nas regiões hipotalâmicas envolvidas com o controle da ingestão alimentar, mas também indiretamente através de interações com reguladores do apetite que circulam na corrente sanguínea (KUCKUCK et al., 2022). Os glicocorticoides têm efeitos pronunciados sob a expressão no neuropeptídeo Y e proteína relacionada ao agouti (AgRP) no núcleo arqueado (SHIMIZU et al., 2008; YI et al., 2012) onde sua elevada concentração

promoveu aumento da ingestão alimentar e do peso corporal de ratos machos adultos afetando a homeostase energética nesses animais (IZZI-ENGBEAYA et al., 2020).

A adiponectina é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo branco estando diretamente ligada ao aumento da sensibilidade dos tecidos à insulina (BERG; COMBS; SCHERER, 2002; NIGRO et al., 2014). O papel dessa adipocina no controle da ingestão alimentar permanece por ser elucidado, pois estudos indicam ações orexígenas e anorexígenas no hipotálamo, possivelmente dependentes do nível de glicose no sangue (SUYAMA et al., 2016). Contudo, embora não completamente esclarecidas, as ações orexígenas da adiponectina parecem decorrer do aumento da atividade da AMPK no núcleo arqueado, por meio do seu receptor AdipoR1, para estimular a ingestão de alimentos e reduzir o gasto de energia (KADOWAKI; YAMAUCHI; KUBOTA, 2008). Já as ações anorexígenas estariam relacionadas ao aumento da expressão da POMC o que reduz a ingestão alimentar e aumenta o gasto energético (SUYAMA et al., 2016).

Há a hipótese de que a adiponectina regula a ingestão alimentar em associação com a leptina. Assim, no jejum, a concentração de adiponectina no ARC aumenta; conseqüentemente a AMPK hipotalâmica é ativada, o que estimula a ingestão alimentar. Após o consumo de alimentos, porém, o sinal de leptina no ARC aumenta; conseqüentemente, a atividade hipotalâmica da AMPK diminui, resultando em redução da ingestão de alimentos. Assim, o sinal da leptina no hipotálamo é regulado de forma inversa ao sinal da adiponectina, que aumenta a atividade da AMPK hipotalâmica e a ingestão alimentar, ao contrário da ação da leptina (KADOWAKI; YAMAUCHI; KUBOTA, 2008).

Além da interação entre a centralidade e os sinais periféricos para controle da ingestão alimentar, o consumo de alimentos é coordenado temporalmente pelo cérebro ao longo do dia (CHALLET, 2019). O ciclo de ingestão alimentar, portanto, é considerado uma variável biológica de recorrência periódica, ou seja, um ritmo biológico que segue um padrão fortemente circadiano (COSTA, 2017; FLANAGAN et al., 2020; MENDOZA, 2019b, 2019a). O sistema de temporização coordena o horário da ingestão alimentar influenciando a qualidade e quantidade de alimentos a serem ingeridos em um determinado horário do dia (MENDOZA, 2019b; WHITTON et al., 2018). Os osciladores cerebrais que asseguram o controle circadiano da ingestão de

alimentos incluem o NSQ do hipotálamo e osciladores secundários em áreas hipotalâmicas e do tronco cerebral (CHALLET, 2019).

De modo geral, os osciladores centrais do sistema circadiano impulsionam os ritmos comportamentais nas diferentes espécies animais de modo que a alimentação, por exemplo, ocorra durante a sua fase ativa enquanto o jejum aconteça durante a sua fase de repouso (CARNEIRO; ARAUJO, 2012). Assim, os humanos, espécie de hábitos diurnos, distribuem a ingestão de alimentos ao longo do dia ou fase clara do ciclo claro-escuro (DE CASTRO, 1987; MENDOZA et al., 2012; PICKEL; SUNG, 2020). Por outro lado, animais de hábitos noturnos, como ratos e camundongos, normalmente consomem mais de 70% da sua alimentação durante a noite ou fase escura do ciclo de 24 horas (grandes quantidades de comida são ingeridas no início da noite, com um segundo pico de alimentação na madrugada) (FLANAGAN et al., 2020; MANOOGIAN; PANDA, 2017; POSSIDENTE; BIRNBAUM, 1979).

As variações cíclicas no ritmo alimentar são sincronizadas com o ciclo claro-escuro por meio do NSQ, que recebe informações luminosas por meio do trato retino-hipotalâmico e as transmite, em seguida, às estruturas cerebrais que regulam a ingestão de alimentos (MENDOZA, 2019b; PATTON; MISTLBERGER, 2013). Existem muitas regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo, cérebro posterior e o sistema cortico-límbico, que desempenham um papel no controle da ingestão alimentar (LENARD; BERTHOUD, 2008) e homeostase energética (FROY, 2010). Em particular, o hipotálamo está envolvido em diversas atividades ligadas a alimentação, tais como: autosseleção de alimentos, estresse alimentar, detecção do paladar e aprendizagem aversiva (BERNARDIS; BELLINGER, 1996).

No hipotálamo, vários núcleos possuem claros e profundos impactos sobre o controle do comportamento alimentar e da manutenção do equilíbrio energético (BERTHOUD, 2002; FLANAGAN et al., 2020). O hipotálamo lateral está associado aos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico, e participa do controle circadiano da alimentação (CAMBRAIA, 2004). Já o hipotálamo basomedial, relacionado com a expressão do neuropeptídeo Y, mostra-se responsivo ao decréscimo de proteínas na dieta com aumento na ingestão de alimentos (WHITE; DEAN; MARTIN, 1998). Dentre as regiões hipotalâmicas relacionadas à ingestão alimentar, destacam-se o núcleo arqueado (ARC), a paraventricular (PVN), a ventromedial (VTM), a dorsomedial (DMN) e a área hipotalâmica lateral (AHL) (PAGE et al., 2020).

Para promover a geração do ritmo circadiano no comportamento alimentar, o NSQ utiliza mecanismos de comunicação direta e indireta com as áreas hipotalâmicas citadas e com o tronco cerebral. Existem também mecanismos de retroalimentação que permitem o arrastamento não fótico do NSQ em resposta à alimentação (HIRAYAMA; MURE; PANDA, 2018). Após captação da informação fótica, o NSQ projeta-se para a zona subparaventricular (ZSPV), local de retransmissão, que se projeta amplamente através do hipotálamo e núcleo dorsomedial (DMN), local-chave de integração das pistas temporais circadianas em vários processos fisiológicos incluindo o sono, alimentação e gasto energético (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; WATTS; SWANSON, 1987).

Projeções do NSQ para o PVN também foram demonstradas em ratos e humanos (CUI; DYBALL, 1996; DAI; SWAAB; BUIJS, 1997) por meio das quais os neurônios do oscilador central fornecem modulação temporal sobre as atividades das vias pré-autonômicas e neuroendócrinas (BUIJS et al., 2017; PAUL et al., 2020). Alvos adicionais incluem células da AHL que expressam o neuropeptídeo orexina (ORX), envolvidos na locomoção e nos comportamentos alimentares (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; MENDOZA, 2019a), e neurônios do núcleo ARC, que expressam os neuropeptídeos orexigênicos [neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP)] e anorexigênicos [pró-opiomelanocortina (POMC) e o fator transcrito relacionado a cocaína (CART)] que estimulam e inibem, respectivamente, a ingestão alimentar (FLANAGAN et al., 2020).

Os ritmos na ingestão alimentar são reforçados pelo *feedback* relacionado ao alimento presente no trato gastrointestinal. Os nutrientes, hormônios, metabólitos circulantes e os processos sensoriais relacionados ao alimento percebidos pelo trato gastrointestinal, que seguem os padrões de alimentação, envolvem respostas homeostáticas agudas de modo rítmico (devido os ciclos normais de alimentação/jejum). Igualmente, influenciam diretamente os osciladores circadianos centrais, através da capacidade de resposta do oscilador molecular ao estado metabólico. Esta sensibilidade do mecanismo molecular do oscilador, especialmente os periféricos, aos metabólitos relacionados aos alimentos é exemplificada pelo forte arrastamento comportamental e fisiológico observado em animais de laboratório quando submetidos a protocolos de alimentação programada (MISTLBERGER, 2011).

2.5 RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO (RTA)

Já foi relatado que as variações cíclicas no ritmo de ingestão de alimentos são sincronizadas com o ciclo claro-escuro por meio do NSQ (MENDOZA, 2019b; PATTON; MISTLBERGER, 2013) que, em condições normais, coordena o comportamento alimentar para que a maior e menor ingestão de alimentos ocorra, respectivamente, na fase ativa e de repouso da espécie considerada. Porém, alterações nesse padrão alimentar podem comprometer o funcionamento do sistema circadiano o que conduz à ideia de que o momento da ingestão de alimentos pode afetar positivamente (alinhamento/sincronização) ou negativamente (desalinhamento/dessincronização) o sistema de temporização (MENDOZA, 2019a). A ingestão de alimentos e o metabolismo dos nutrientes neles contidos são controlados por estruturas neurais, sistemas neuroquímicos e neuroendócrinos específicos; e alterações em tais sistemas, como os provocados por mudanças no padrão alimentar, podem associar-se a modificações comportamentais e fisiológicas (CAMBRAIA, 2004; MISTLBERGER, 2011).

O tempo normal entre o oscilador principal e os periféricos pode ser interrompido quando o padrão de alimentação, por exemplo, é alterado (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003; OOSTERMAN et al., 2015). Como mencionado, animais de laboratório com acesso *ad libitum* a uma dieta padrão consomem, normalmente, a maioria (60-80%) de sua ingestão diária de alimentos à noite. “Restrição temporal do alimento” (RTA) ou “alimentação com restrição” é um protocolo experimental frequentemente utilizado para avaliar o impacto do horário de ingestão de alimentos sobre o sistema circadiano. Nele, há uma janela temporal específica durante o ciclo de 24 horas na qual ocorre a ingestão de alimentos (DE GOEDE et al., 2020; MANOOGIAN; PANDA, 2017). O acesso aos alimentos pode ser restrito a várias horas durante a fotofase escura (fase ativa do animal), condição que favorece a sincronização/alinhamento entre o comportamento alimentar e a condição natural do comportamento de sono/vigília do animal, ou várias horas durante a fotofase clara (fase inativa de roedores noturnos), situação na qual a restrição alimentar resulta em uma dessincronização/desalinhamento entre a ingestão dos alimentos pelo roedores e a condição natural do seu comportamento de sono/vigília (MANOOGIAN; PANDA, 2017).

A alimentação restrita a curtos períodos, especialmente em modelos experimentais nos quais o alimento é oferecido durante o dia para os roedores noturnos (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2010) provoca, nos animais, alteração no ritmo endógeno de ingestão alimentar. Diante dessa situação, os relógios periféricos tornam-se independentes da ritmicidade do NSQ, e o sistema circadiano não é mais arrastado pela luz, mas, principalmente pelos efeitos da programação da alimentação das refeições. Em modelos experimentais animais, a restrição temporal do alimento a fase clara do ciclo de 24 horas mimetiza a condição observada em trabalhadores noturnos, indivíduos da sociedade moderna que tendem a concentrar sua atividade e ingestão alimentar ao período de repouso, sendo, portanto, utilizada para avaliar o impacto desse padrão alimentar alterado sobre o sistema circadiano e no desenvolvimento de doenças.

A restrição temporal do alimento à fase inativa de camundongos promoveu hiperfagia e ganho de peso nesses animais em apenas nove dias, menor flexibilidade metabólica com maior dependência de carboidratos, inversão quase completa na fase de expressão de genes circadianos em osciladores periféricos localizados no fígado e menor amplitude dos ritmos biológicos no tecido adiposo epididimal, músculo esquelético e coração (BRAY et al., 2013). Em ratos, a alimentação restrita à fase ativa melhorou a tolerância dos tecidos à glicose, enquanto a restrição do alimento à fase de descanso promoveu piora (DE GOEDE et al., 2019) assim como dessincronização dos osciladores do músculo e fígado (OPPERHUIZEN et al., 2016). Em humanos, a dessincronização entre os osciladores central e periféricos provocada pela alteração do tempo de ingestão de alimentos pode conduzir ao desacoplamento dos osciladores periféricos do precursor central levando ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, incluindo a obesidade e o diabetes tipo 2 (LONGO et al., 2017; MANOOGIAN; PANDA, 2017; OOSTERMAN et al., 2015).

A execução normal do padrão diário de ingestão alimentar envolve também a expressão de genes circadianos nos osciladores central e periféricos do sistema circadiano que podem ter igualmente sua fase de expressão modificada pelo horário de ingestão de alimentos. A restrição do acesso alimentar está associada a mudanças na expressão gênica do sistema do relógio circadiano (DE ARAUJO et al., 2016). O NSQ, sensível às informações fóticas, dificilmente é perturbado pelos padrões de alimentação. Contudo, os osciladores periféricos, especialmente os localizados no

fígado, são insensíveis a mudanças relacionadas às pistas fóticas, mas sua fase e amplitude são influenciadas pela alimentação (DAMIOLA et al., 2000; VOLLMERS et al., 2009). Estudos em ratos relataram que os ritmos de expressão de genes circadianos são afetados pelo horário de ingestão de alimentos. Um estudo demonstrou que a alimentação restrita durante o período inativo dos animais induz os ritmos de expressão dos genes circadianos em órgãos periféricos e regiões cerebrais diferentes do NSQ (DAMIOLA et al., 2000; FEILLET et al., 2008).

A influência do horário da alimentação como um sincronizador periférico foi investigada através da expressão diária dos genes circadianos (*Per1*, *Per2* e *Bmal1*) em várias regiões hipotalâmicas, com a finalidade de determinar se o horário da restrição de alimento afeta os genes circadianos em osciladores externos ao SNC de forma uniforme. Ratos Wistar foram mantidos em restrição alimentar (duas horas de acesso diário ao alimento) ou com alimentação *ad libitum* durante 3 semanas. O horário de restrição alimentar afetou a expressão dos genes provocando uma mudança de fase, ou seja, uma modificação de acordo com a combinação de núcleos hipotalâmicos e genes direcionados. Esses dados reforçam que os sinais metabólicos ou temporais provocados pela restrição da alimentação modificam a organização temporal no hipotálamo (MIÑANA-SOLIS et al., 2010).

Estudo semelhante avaliou o impacto de diferentes padrões de restrição alimentar sob a modulação da expressão de genes circadianos no NSQ e em osciladores extra-NSQ localizados nos núcleos hipotalâmicos PVN e ARC. O padrão de expressão dos genes circadianos em resposta a alimentação restrita à noite (durante duas horas), alimentação restrita ao dia (duas horas) e alimentação durante o dia (12 horas de disponibilidade alimentar) foi afetado de forma distinta no NSQ e nos diferentes núcleos hipotalâmicos. Estes resultados sugerem que o oscilador central bem como o oscilador no PVN e ARC, áreas envolvidas com a ingestão de alimentos, respondem de forma tecido específica à restrição alimentar (DE ARAUJO et al., 2016). Em conjunto, as evidências indicam que tanto o conjunto de osciladores quanto os ritmos de expressão dos genes circadianos do sistema de temporização são afetados pelo horário de ingestão dos alimentos, que quando concentrada em horários incomuns conduzem a alterações metabólicas que contribuem para o desenvolvimento e instalação de doenças.

2.6 RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA

A ingestão alimentar é um ritmo diário robusto que é acompanhado pelo aumento da atividade locomotora em torno do evento (MENDOZA, 2019a). Em roedores, uma das consequências da alteração do padrão alimentar, especialmente em protocolos de alimentação programada como na restrição temporal do alimento, é a modificação do ritmo de atividade locomotora. Normalmente, o ritmo locomotor (atividade/reposo) está sincronizado com o ritmo de ingestão de alimentos (alimentação/jejum). No caso de animais de hábitos noturnos ambos se mostram mais pronunciados durante a noite (locomoção e alimentação). Contudo, alimentações diárias programadas, restritas a apenas algumas horas ao longo do dia, com destaque para as que apresentam concentração da ingestão alimentar durante a fotofase clara do fotoperíodo claro-escuro, alteram o ritmo diário de atividade locomotora por induzir uma atividade excitatória específica em roedores conhecida como “atividade antecipatória ao alimento (AAA)” (TAHARA; SHIBATA, 2013).

A AAA é definida como a excitação diária ou o comportamento de busca pelo alimento aproximadamente 2 a 3 horas antes da alimentação ou horário de disponibilidade do alimento (CARNEIRO; ARAUJO, 2012, 2009; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; FEILLET et al., 2006; TAHARA; SHIBATA, 2013). Ela é caracterizada pelo aumento do comportamento exploratório e de forrageio (STEPHAN, 2002), aumento da temperatura corporal, níveis de glicocorticoides plasmáticos, motilidade gastrointestinal e atividade de enzimas digestivas e atividade locomotora, que permanecem mesmo na ausência de qualquer sincronizador externo (HONMA; HONMA; HIROSHIGE, 1987). A AAA é identificada como a saída comportamental de um oscilador arrastado por alimento (FEO), que está separado do oscilador arrastado pela luz (LEO), localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (CARNEIRO; ARAUJO, 2012). Acredita-se que os roedores procuram por comida quando o horário de alimentação se aproxima e que eles podem aprender e lembrar o tempo de alimentação regular por meio do seu oscilador interno sincronizado pelo alimento (TAHARA; SHIBATA, 2013). Vale destacar que a atividade antecipatória controlada pelo FEO ocorrerá mesmo na ausência do núcleo supraquiasmático (TAHARA; SHIBATA, 2013). A ablação do oscilador central em camundongos resulta na interrupção dos ritmos relacionados à atividade locomotora; no entanto, a AAA surge antes das refeições em caso de alimentação diurna programada (BOULOS; TERMAN, 1980; STEPHAN; SWANN; SISK, 1979).

Estudos utilizando animais com deleção, mutantes ou com lesão específica de parte do cérebro foram conduzidos com o objetivo de investigar o local ou mecanismo do oscilador sincronizado pelo alimento. Para estudos de lesão, experimentos sugerem que a integridade do hipotálamo dorsomedial é importante na regulação do comportamento alimentar em roedores. Lesões nessa região podem afetar a expressão comportamental da AAA, cuja formação fica significativamente reduzida, (GOOLEY; SCHOMER; SAPER, 2006; MORIYA et al., 2009; TAHARA et al., 2010) levando a acreditar que esta pode ser uma das possíveis localizações do FEO. Contudo, a atividade antecipatória ao alimento não esteve ausente, mas apenas reduzida em camundongos com lesão do núcleo DMN (LANDRY et al., 2006) e aumentada em animais com lesão do DMH e NSQ quando comparados aos que apresentavam apenas lesão do DMH (ACOSTA-GALVAN et al., 2011). Tal resultado sugere que o DMH faz parte do FEO, mas, ele não é um requisito para a indução da AAA (TAHARA; SHIBATA, 2013).

As informações expostas demonstram que a ingestão de alimentos segue um ritmo circadiano que é controlado, dentre outros fatores, pelas projeções que surgem no NSQ. O NSQ mantém uma sincronia entre a alimentação e o ciclo claro-escuro prevenindo o desenvolvimento de patologias. Contudo, modificações no horário de ingestão alimentar, com destaque para a restrição temporal do alimento à fase inativa da espécie considerada, pode resultar em dessincronia entre uma pista ambiental (alimentação) e os ritmos biológicos, bem como, entre os osciladores central e periféricos do sistema de temporização, com estes últimos tornando-se independentes da sincronização estabelecida pelo oscilador central. Como resultado, pode-se observar mudanças comportamentais (comportamento alimentar e ritmo de atividade locomotora, este último em animais), em parâmetros fisiológicos, metabólicos e na fase de expressão de genes circadianos e genes controlados pelos osciladores que favorecem o desenvolvimento de doenças como a obesidade e patologias correlatas.

A verificação das repercussões da RTA na fase clara do ciclo, fase inativa de roedores, sobre os parâmetros acima citados é objeto de estudo de muitos trabalhos. Porém, pouco se sabe a respeito do que ocorre com tais indicadores quando a alimentação volta a ser oferecida livremente (*ad libitum*) ao animal após o período de restrição alimentar. Tal conhecimento é relevante tendo em vista o aumento no número de indivíduos com padrão alimentar alterado, onde predomina a ingestão alimentar realizada no período biologicamente destinado ao descanso, e os distúrbios

nutricionais e fisio-metabólicos já relatados decorrentes desse comportamento. Diante da possibilidade de retorno pelo indivíduo ao padrão alimentar habitual, torna-se importante saber se os distúrbios provocados pelo padrão alterado nos parâmetros citados permanecem.

3 HIPÓTESES

A restrição temporal do alimento durante 16 horas provocará distúrbios em parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos em ratos *Wistar*.

Distúrbios em parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos em ratos *Wistar* provocados pela restrição temporal do alimento durante 16 horas não são revertidos após retorno à alimentação *ad libitum*.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os efeitos da restrição temporal do alimento durante 16 horas seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum* sobre parâmetros nutricionais e fisiometabólicos em ratos *Wistar*.

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da restrição temporal do alimento durante 16 horas seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum* sobre:

- O peso corporal ao longo do período experimental;
- A quantidade de gordura visceral;
- O padrão circadiano da alimentação;
- A curva circadiana da glicose e tolerância oral à glicose (TOTG);
- O perfil glicêmico e lipêmico;
- O perfil hormonal (corticosterona, insulina, adiponectina, insulina);
- O ritmo de atividade locomotora durante todo o período experimental;

5 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Biotério Naíde Regueira Teodósio, no Laboratório de Bioquímica da Nutrição e na Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica do Departamento de Nutrição (DN) 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 Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Processo nº 0010/2019 - Anexo A) e estão de acordo com as resoluções e diretrizes determinadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal). Os animais foram mantidos em condições padrão para biotério sob temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa em torno de 60% e ciclo luz invertido 12/12h [fase clara (20h00min às 08h00min) e fase escura (08h00min às 20h00min)]. A água foi oferecida *ad libitum* e a alimentação como descrito no item 5.2.

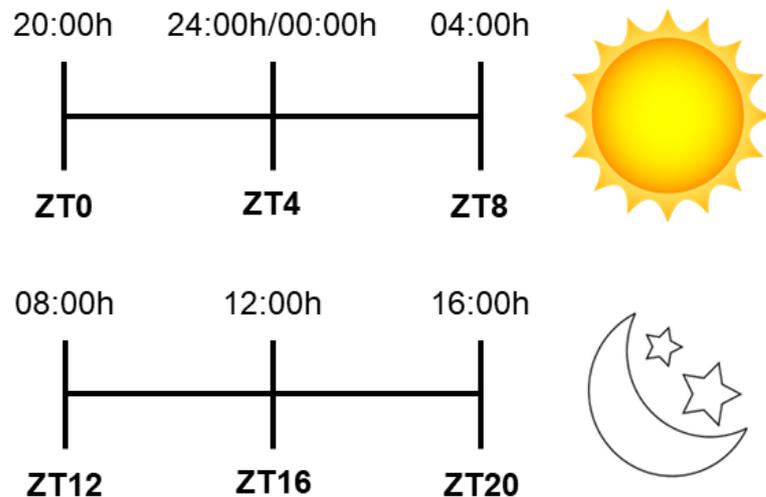
5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 48 ratos machos, da linhagem *Wistar (Rattus Novergicus Albinus)* nascidos de matrizes da colônia do Departamento de Nutrição (DN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sendo quatro filhotes procedentes de doze mães, recebidos do biotério de criação aos 21 dias de vida, pesando entre 45 e 55g. Após desmame (21 dias de vida) os filhotes foram aleatoriamente alojados em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola) e receberam dieta comercial de biotério *ad libitum* (Presence®: PTN: 26%; CHO: 63%; LIP: 11%, VET 3,6 kcal/g). Aos 28 dias de vida, os filhotes foram separados em gaiolas individuais para se adaptarem (antes do início do período experimental). Aos 40 dias de vida, as gaiolas foram colocadas dentro de caixas específicas dotadas de material e equipamento próprio para o monitoramento da locomoção do animal, realizado como descrito no item 5.6. Assim, houve uma adaptação do animal ao novo habitat antes do início do período experimental, que se deu aos 45 dias de vida do roedor.

Antes de proceder com a discriminação dos grupos experimentais, ressalta-se que a organização temporal da RTA bem como a avaliação da ritmicidade da ingestão alimentar, curva glicêmica e atividade locomotora foi medida através de um ciclo ambiental (*zeitgeber*) que pode corresponder ao horário que as luzes acendem ou apagam durante o período de 24 horas. Para fins de compreensão do temporizador

externo, os *Zeitgebers* foram denominados segundo os fusos horários dos ciclos, começando ZT0 no primeiro intervalo da fase clara do ciclo (Figura 3).

Figura 3: Esquema de organização temporal da restrição temporal do alimento e da avaliação do padrão circadiano da ingestão alimentar, da curva da glicemia e do ritmo de atividade locomotora dos animais experimentais



Fonte: A autora, 2022

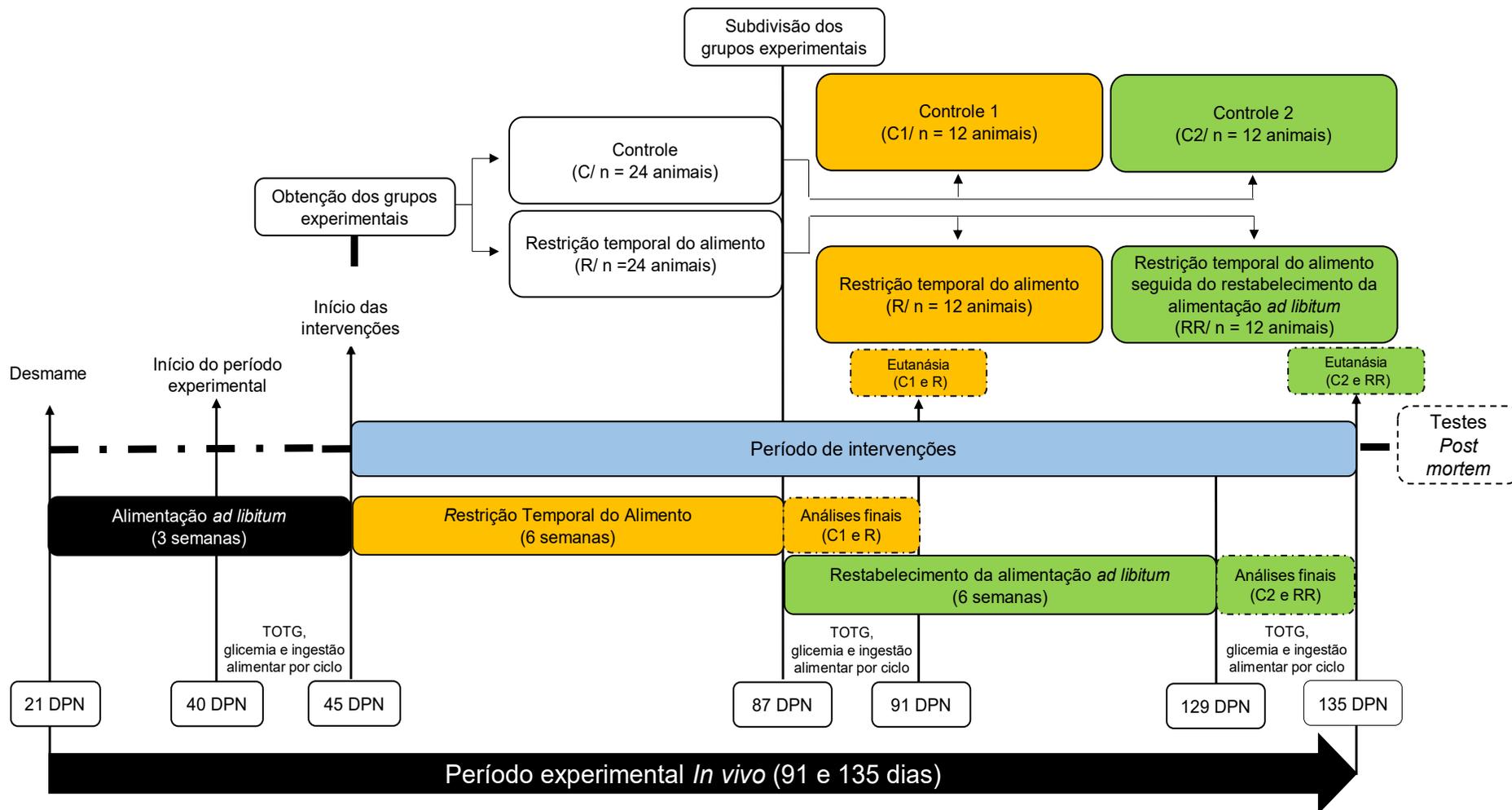
Aos 45 dias de vida deu-se início a fase experimental com restrição ou não no tempo de alimentação dos animais associada ou não ao restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Dessa forma, inicialmente, os animais (n=48) foram distribuídos em dois grupos: C (n=24): Controle - dieta oferecida *ad libitum* no ciclo de 24 horas e R (n=24): Restrição temporal do alimento - dieta retirada nas primeiras oito horas da fase escura do ciclo (ZT [*zeitgeber* time] 12, das 08:00 horas da manhã às 16:00 horas da tarde - ZT20) e ofertada por dezesseis horas no período entre ZT20 (16:00 h - oito horas após início da fase escura) e ZT12 (08:00 h da manhã do dia seguinte), durante seis semanas. Ao final da restrição alimentar (87 dias de vida), de forma aleatória, metade dos animais de ambos os grupos, C1/ n=12 e R/ n=12, seguiu para análises finais sendo eutanasiados ao término delas e a outra metade teve a alimentação *ad libitum* restabelecida (grupo restrito com restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n =12) ou seguiu com oferta *ad libitum* da alimentação (C2/n=12), ambos por seis semanas. Assim, ao final da restrição temporal do alimento foram obtidos quatro grupos: C1 (n=12)/ Controle 1 - dieta ofertada *ad libitum* no ciclo 24h do desmame até, aproximadamente, 87 dias de vida; R (n=12)/ Restrição Temporal do Alimento - dieta retirada nas primeiras oito horas da fase escura do ciclo (ZT12 à ZT20, 08:00 horas da manhã às 16:00 horas da tarde) e ofertada por

dezesseis horas no período entre ZT20 (16:00h - oito horas após início da fotofase escura) e ZT12 (08:00h da manhã do dia seguinte), por seis semanas (45 ao 87 dias de vida); C2 (n=12)/ Controle 2 - dieta disponível *ad libitum* no ciclo de 24 horas do desmame até, aproximadamente, 129 dias de vida; RR (n=12)/ Restrição temporal do alimento com restabelecimento da alimentação *ad libitum* - dieta retirada nas primeiras oito horas da fase escura do ciclo (ZT12 à ZT20, 08:00 horas da manhã às 16:00 horas da tarde) e ofertada por dezesseis horas no período entre ZT20 (16:00 h - oito horas após iniciado a fotofase escura) e ZT12 (08:00 h da manhã do dia seguinte) por seis semanas (45 ao 87 dias de vida do animal) seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum*, por seis semanas (87 aos 129 dias de vida do animal). O desenho esquemático experimental se encontra descrito na Figura 4. Na Figura 5 é demonstrado o esquema de alimentação utilizado para os grupos.

5.2 PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO E RESTABELECIMENTO DA ALIMENTAÇÃO *AD LIBITUM*

Os animais receberam dieta padrão comercial (Presence® 26% de proteína, 63% de carboidrato, 11% de lipídio e 3,6 calorias/g) durante todo o período experimental. A partir do 45º dia de vida os animais dos grupos controle (C1) e controle 2 (C2) se alimentaram *ad libitum* por todo o ciclo de 24 horas ao longo de todo período experimental, aproximadamente 91 e 135 dias de vida, respectivamente. Já os grupos restrição temporal do alimento (R) e restrição temporal do alimento com restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR), apesar de terem a dieta disponibilizada, tiveram uma restrição temporal alimentar, isto é, a dieta foi ofertada ao animal apenas após oito horas do início da fase escura (ZT20/ 16:00 horas), sendo oferecida à vontade até o horário de oito horas da manhã do dia seguinte (ZT12/ 08:00h), durante seis semanas. Para o grupo RR, após a restrição temporal do alimento a alimentação *ad libitum* foi restabelecida por um período de seis semanas. A quantidade de ração ofertada aos grupos restritos foi a mesma dos grupos controle. A ingestão alimentar (g) foi obtida pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a rejeitada. Os valores foram expressos como consumo alimentar relativo [Consumo (gramas)/Peso corporal (gramas) x 100].

Figura 4: Desenho experimental do estudo segundo as fases do experimento



Fonte: A autora, 2022

Figura 5: Distribuição dos grupos segundo o padrão de alimentação a partir do fim da restrição temporal do alimento. Grupos: C1/n=12: Controle 1; R/n=12: Restrição temporal do alimento; C2/n=12: Controle 2; RR/n=12: Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum*

Grupos	Do desmame (21) aos 44 dias de vida	Dos 45 aos 87 dias de vida	Dos 88 aos 129 dias de vida
C1	Alimentação <i>ad libitum</i> (3 semanas)	Alimentação <i>ad libitum</i> (6 semanas)	
R	Alimentação <i>ad libitum</i> (3 semanas)	Restrição Temporal do Alimento (6 semanas)	
C2	Alimentação <i>ad libitum</i> (3 semanas)	Alimentação <i>ad libitum</i> (6 semanas)	Alimentação <i>ad libitum</i> (6 semanas)
RR	Alimentação <i>ad libitum</i> (3 semanas)	Restrição Temporal do Alimento (6 semanas)	Restabelecimento da alimentação <i>ad libitum</i> (6 semanas)

Fonte: A autora, 2022

5.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL, GANHO DE PESO E COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR

O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente no mesmo dia da semana (segunda-feira), em ZT11 (07:00 horas fase clara do ciclo 24 horas), até o final do período experimental (aos 91 e 135 dias de vida), através da utilização da balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (0,001g de precisão). O ganho de peso foi obtido utilizando-se o peso corporal final e inicial do animal, conforme a equação: $GP = PF (g) - PI (g)$, em que: GP = ganho de peso; PF = peso corporal final (g) durante o período de acompanhamento (RTA apenas ou RR); PI = peso corporal (g) do animal no início do experimento (PI). O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi mensurado considerando-se o ganho de peso e a quantidade de alimento ingerido, segundo a equação: $CEA = GP(g) / TA(g)$, em que: GP = ganho de peso; TA = quantidade total (g) de ração ingerida no período (NERY et al., 2011).

5.4 INGESTÃO ALIMENTAR E CURVA GLICÊMICA

Antes do início (entre o 40º e 45º dias de vida do animal) e ao final das fases experimentais (entre o 87º-91º dias de vida do animal, para àqueles submetidos à restrição temporal do alimento, e ente o 129º-135º, para àqueles submetidos a restrição alimentar e restabelecimento da alimentação *ad libitum*) foi realizada a quantificação da ingestão alimentar a cada 4 horas (ZT0; ZT4; ZT8; ZT12; ZT16; ZT20)

do ciclo de 24 horas. O animal, previamente ambientado, foi acompanhado durante três dias e a média do registro de três dias consecutivos foi analisada. Dessa forma, o padrão de consumo circadiano foi obtido bem como o total de ração consumida em cada período pelos grupos com dieta *ad libitum* e/ou com restrição temporal do alimento seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Em paralelo, foi realizada a curva circadiana da glicose durante um dia em todos os grupos nos mesmos intervalos de tempo (a cada 4 horas, ZT0; ZT4; ZT8; ZT12; ZT16; ZT20) de controle do consumo alimentar antes do período de restrição do alimento, ao final da restrição alimentar e/ou ao final do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. A ingestão circadiana da alimentação e a curva glicêmica a cada 4 horas foram utilizadas para observar a associação entre a ritmicidade alimentar e glicêmica (NASCIMENTO et al., 2013) em função do ciclo, da restrição do alimento antes e após o período de restrição e/ou restabelecimento da alimentação *ad libitum*.

5.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG), conduzido na fase escura do ciclo circadiano, foi realizado em três momentos ao longo do período experimental: antes da RTA, entre os dias 40 e 45 de vida do animal; ao final da RTA, entre os dias 87 e 91 de vida do animal, e ao final do período de restabelecimento da alimentação *ad libitum*, entre os dias 129 e 135 de vida do animal, em todos os grupos experimentais. O animal foi submetido a um jejum de 6 horas (iniciado em ZT12, 08:00 h da manhã, durante a fase escura do ciclo) (ANDRIKOPOULOS et al., 2008) e, após esse período, foi coletada a primeira amostra de sangue (tempo 0, ZT18 – 14:00h) para dosagem da glicose basal com uso do aparelho Accu-Check Active®. Posteriormente, foi administrada por gavagem uma solução de glicose a 50% na dosagem de 2 mg/g de peso do animal para o teste de tolerância à glicose (ANDRIKOPOULOS et al., 2008) e a glicemia obtida nos tempos 30, 60, 90 e 120 min. Foi calculada a área sob a curva de glicose (ΔG), obtida pelos valores de glicemia nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, por meio do método trapezoidal (LE FLOCH et al., 1990).

5.6 ANÁLISE DO RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA (RITMO DE ATIVIDADE-REPOUSO)

O ritmo de atividade-reposo dos animais foi investigado por meio da utilização do Sistema para Acionamento Programado e Monitoramento de Atividade (SAP)

desenvolvido pelo laboratório de cronobiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. O SAP é composto por software e hardware que controla o ambiente e detecta atividade de animais de forma clara e fácil. O software é composto por portas de entrada que analisam o estado de sensores de movimento. Os dados analisados a partir dos sensores são apresentados na tela do computador uma vez por segundo, mostrando os seus estados (se o movimento foi detectado ou não). No SAP, o arquivo de dados é salvo automaticamente e contém informações como data, hora e números que representam a quantidade de segundo que o sensor detectou o movimento do animal.

Este software controla dois acionadores que podem ser programados de forma independente. Para cada acionador define-se o período de claro (acionado) e o período de escuro (desligado), e esses estados ficam sendo gerados de forma cíclica até que o usuário deseje finalizar o programa. O software possibilita também a programação diferenciada da primeira transição, ou seja, o usuário pode informar o momento do dia que pretende iniciar o ciclo claro-escuro, podendo modificar os períodos a qualquer momento. O hardware é composto, basicamente, por uma placa de aquisição de dados e equipamentos eletroeletrônicos, além dos sensores e suas respectivas fontes de energia (CARNEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2017) que se conecta a um computador onde ocorre a leitura e compilação dos dados fornecidos pelo SAP.

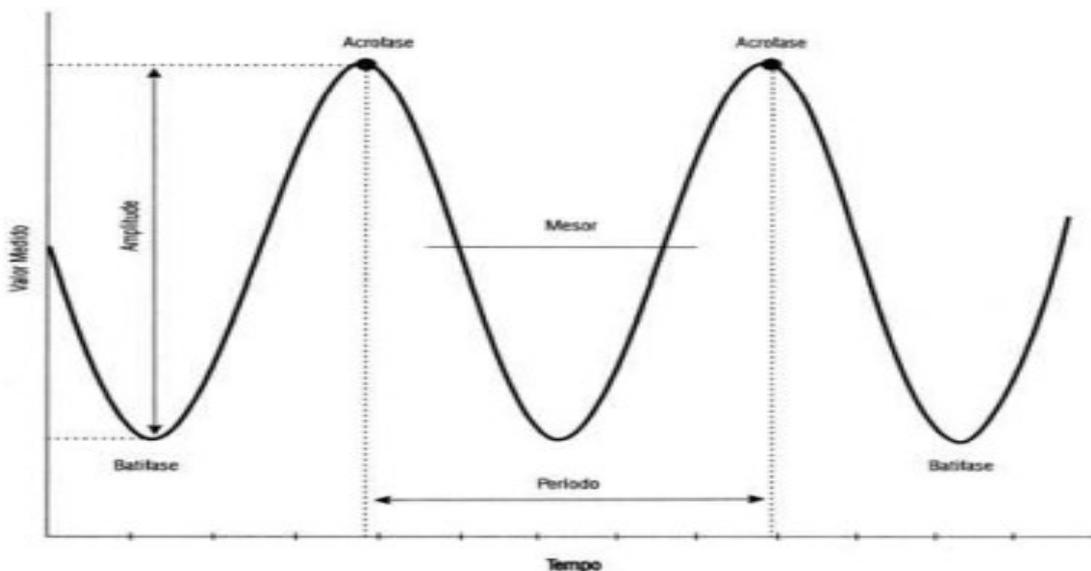
O sistema possibilitou a inserção de ciclos claro/escuro de forma simplificada e inerente ao mesmo, sendo os sensores programados para registrar períodos de 5 minutos durante o período de intervenção (45 a 87 dias de vida, equivalente à restrição alimentar, e 45 a 130 dias de vida, relativo à restrição seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum*). Após os 42 dias de monitoramento para os grupos C1 e R, e 84 para os grupos C2 e RR, os animais foram retirados das cabines de registro e os dados colhidos através do SAP organizados no software *El temps* (DÍEZ-NOGUERA, 2013). Por meio do *El temps* pode-se construir actogramas, gráficos em forma de onda, e adquirir variáveis pertinentes ao estudo por meio do método COSINOR, de acordo com o exposto abaixo (ROBERTO REFINETTI, 2019):

- Actograma: consiste em uma representação gráfica dos dados obtidos por meio do SAP que permite observar as fases do ritmo. Os dados são separados em dias e alongados em uma linha. O alinhamento vertical das informações sugere o comportamento do ritmo. Em caso de desvios para a esquerda, entende-se que o

ciclo é inferior a 24 horas (as atividades têm início precoce com o passar dos dias), enquanto desvios para a direita denotam um ciclo mais longo que 24 horas (com o passar dos dias o início das atividades ocorre cada vez mais tarde);

- Gráficos em forma de onda: aplicação dos dados em uma onda sinusoidal;
- COSINOR: os ritmos circadianos poderiam ser considerados ritmos suaves e bem definidos, porém com ruído adicional. Se ajustados a uma curva sinusoidal de 24hs, os ritmos exibem uma sequência de ondas que alternam altos e baixos durante esse período. Esta curva sinusoidal permite a determinação dos parâmetros representados na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6: Representação gráfica de parâmetros rítmicos ajustados pelo método COSINOR. Mesor, valor médio ajustado; acrofase, momento do ponto de máximo valor da curva; amplitude, diferença entre mesor e valor máximo da curva ajustada.



Fonte: Refinetti (2019)

A definição de cada um dos parâmetros é exposta

- Curva sinusoidal e seus parâmetros paramétricos: curva ajustada a maioria dos ritmos circadianos representada por: acrofase, batifase, amplitude, mesor e período
- Mesor (*mean estimated statistic over rhythm*): média ajustada ao ritmo ou valor médio da função cosseno de todos os valores de oscilação; corresponde à média dos valores de acrofase e batifase. Valores maiores indicam maior atividade;

- Amplitude (diferença entre o maior valor e o mesor): medida da metade da extensão da variação previsível dentro de um ciclo ou a diferença entre a acrofase e batifase. Valores maiores indicam maior atividade;
- Acrofase (fase mais alta ou o pico obtido na oscilação): medida do tempo dos valores gerais mais altos recorrentes em cada ciclo. Quanto maior o valor, mais tarde o indivíduo apresenta seu pico de atividade;
- Batifase: momento dos menores valores da curva estimada
- Período: diferença em horas entre as duas acrofases
- Porcentagem rítmica (%V, grau de ajuste do ritmo à curva cosseno): quanto maior o valor, mais rítmico o indivíduo apresenta-se. Refere-se ao grau de ajuste do ritmo de atividade-reposo à curva cosseno. De acordo com a seguinte função: $f(t) = M + A \cos(\omega t + \phi)$, onde, “f(t)” seria o valor da função para o tempo “t”; “M” corresponde ao mesor; “A” à amplitude; “ ω ” à frequência angular (360°, caso o ciclo seja de 24 horas e o “t” seja calculado em horas); e “ ϕ ” corresponderia ao valor da acrofase (em graus).

O método Cosinor, embora largamente empregado em Cronobiologia, é útil para ritmos que seguem uma função sinusoidal, o que não ocorre como ritmo de atividade-reposo. Dessa forma, por não seguir uma função cosseno, as variáveis mesor, amplitude, acrofase e porcentagem rítmica poderiam ser consideradas não paramétricas (GONÇALVES et al., 2014). Partindo desse pressuposto, observou-se a necessidade de utilizar o *software nparACT-package* para realização de análises não paramétricas relativas ao ritmo de atividade-reposo. Assim, 4 variáveis não paramétricas foram propostas por Witting et al (1990) para medir a fragmentação do ritmo, que segundo o autor, são variáveis mais eficientes para detectarem mudanças no ritmo de atividade e reposo. (WITTING et al., 1990). Tais variáveis, abaixo discriminadas, estão de acordo com o estudo de (GONÇALVES et al., 2015a):

- Nível máximo de atividade (M10): média das 10 horas contínuas com maior atividade. Quanto maior M10, mais intensa a atividade, isto é, os indivíduos são mais ativos;
- Nível mínimo de atividade (L5): relativo à média de atividade das cinco horas contínuas menos ativas. Quanto menor L5, maior a eficiência do reposo. Maiores

valores indicam agitação do sono, e, baixos valores indicam período de repouso eficiente.

- Amplitude relativa (*Relative Amplitude* - RA): diferença entre M10 e L5 dividida pela soma de M10 e L5. Valores elevados indicam maior diferença entre os períodos de atividade e de repouso, com ritmo mais expressivo;
- Variabilidade Intradiária (*Intradaily variability* - IV): representa a fragmentação do ritmo com flutuações entre momentos de atividade e repouso em 24 horas (como frequência e extensão de transições entre períodos de repouso e atividade). Razão entre a média dos quadrados da diferença entre intervalos de tempos consecutivos e a média dos quadrados da variância geral. Quanto mais elevado o valor, mais fragmentado o ritmo;

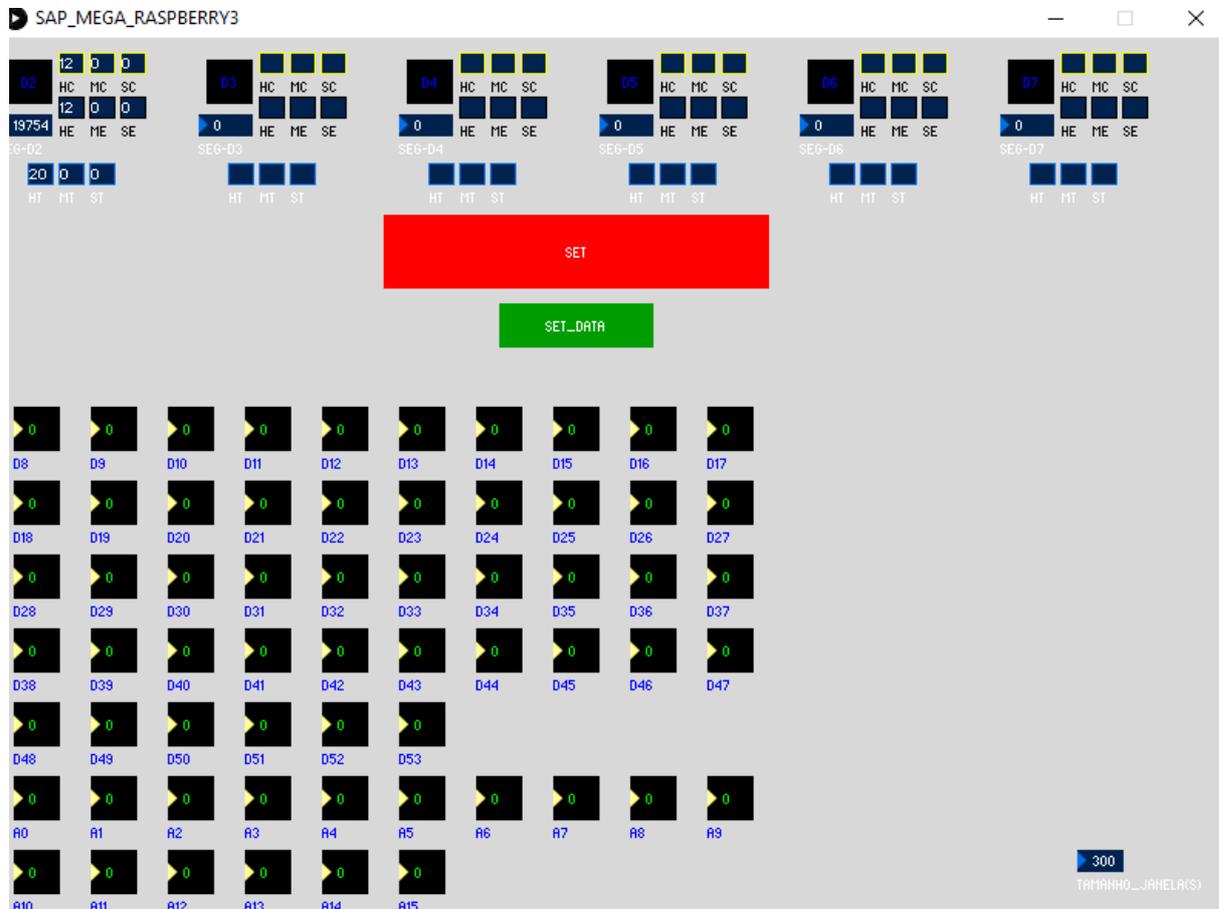
Estabilidade Interdiária (*Interdaily stability* - IS): relativo à constância do ritmo em períodos de 24 horas. Consiste na razão entre a variância da média-padrão de 24 horas em torno da média e da variância geral. Isto é, demonstra a estabilidade da atividade através dos dias e indica a sincronia entre o ritmo atividade-repouso e *zeitgebers* (ou seja, quantifica o grau de sincronização ao *zeitgeber* externo ou a constância do ritmo em 24hs). Quanto maiores os valores, mais estável o ritmo através dos dias.

Na Figura 7 é apresentada a cabine de registro de atividade locomotora. O sistema de registro da atividade é demonstrado na Figura 8.

Figura 7: Cabines de Registro de Atividade. A cabine apresenta três níveis (superior, intermediário e inferior) onde é possível registrar, em cada um deles, a atividade de quatro animais. Os anteparos verticais, localizados entre as gaiolas, asseguram que o sensor detecte a atividade de apenas um animal



Figura 8: Sistema de Registro de Atividade. Imagem do software responsável pela captação dos dados de atividade. As luzes pretas representam os canais para registro individual de atividade. O animal, ao se movimentar, ativa o sensor (localizado dentro dos níveis, na parte superior das gaiolas) que emite um sinal para o software (a cor do canal se torna amarela). A duração da fase clara e da fase escura é ajustada na área superior esquerda ao lado de “D2”, nos locais indicados por “HC” e “HE”, respectivamente, “horas de claro” e “horas de escuro”. O intervalo de registro (5 min) é ajustado de forma automática durante a instalação. O sistema cria um arquivo de extensão .txt, que pode ser exportado para uma planilha eletrônica ou analisado no software *El temps*



Fonte: A autora, 2022

5.7 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados por decapitação em dois horários distintos: 08:00h (ZT12) ou 16:00h (ZT16), início e intervalo final da fase escura, respectivamente. Para a eutanásia em ZT12, metade dos animais (seis) de cada grupo (C1, R, C2 e RR) foi submetida a jejum prévio de 12 horas, com o objetivo de avaliar os efeitos dessa condição (jejum agudo) nos marcadores bioquímicos e hormonais. Por outro lado, com o intuito de observar os efeitos da RTA, os seis animais restantes de todos os grupos experimentais foram eutanasiados em ZT16, início da restrição do alimento para o grupo R e de continuidade alimentar para os

grupos C1, C2 e RR. Imediatamente após a decapitação, amostras sanguíneas foram coletadas para determinação do perfil bioquímico e hormonal.

5.8 AVALIAÇÃO *POST-MORTEM*

5.8.1 Determinação do perfil glicêmico, lipêmico e hormonal

As variáveis bioquímicas [glicemia de jejum, triglicerídeos (TGL), colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL)] foram determinadas em amostras sanguíneas (10 mL) coletadas após decapitação dos animais submetidos a jejum de 12 horas (em ZT12). Já a mensuração dos hormônios (corticosterona, insulina, adiponectina e leptina) foi realizada nas amostras de sangue de animais eutanasiados em ZT12, início da fase escura com os animais de todos os grupos em jejum, bem como em ZT20, intervalo final da fase ativa com os animais dos grupos C1, C2 e RR alimentados e os do grupo R em jejum. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2500g/ 20 min para obtenção do soro e, em seguida, armazenadas em freezer, a -80°C, para posterior análise.

As variáveis bioquímicas foram determinadas na Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), através do uso do espectrofotômetro de microplacas modelo EPOCH da BioTek e kits reagentes Labtest®. O nível plasmático de LDL-colesterol e VLDL foi estimado através da equação de Friedewald (WILLIAM T. FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972), por meio do cálculo indireto, usando a fórmula: $LDL \text{ colesterol mg/DI} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - (\text{Triglicerídeos}/5)$.

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Doenças Metabólicas e Nutricionais (LDMN), do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) através do uso da leitora automática de microplacas e tiras de oito canais modelo TP READER NM/ Thermo Plate e kits reagentes ELISA (adiponectina e corticosterona por meio do Elabscience® Biotechnology Co, Estados Unidos; insulina e leptina através do kit da ThermoFisher, San Diego, CA, USA).

5.8.2 Avaliação de peso úmido da gordura abdominal e do fígado

A gordura visceral (soma da gordura retroperitoneal e epididimal) e do fígado foi pesada em balança digital de precisão Marte® AL200, com capacidade máxima de

200g e variação de 0,01g. Os valores absolutos dos pesos das gorduras retroperitoneal e epididimal bem como do fígado foram relativizados a partir do peso corporal final, obtido em momento imediatamente anterior à realização da eutanásia.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de atividade motora extraídos do Sistema para Acionamento Programado e Monitoramento da Atividade (SAP) foram descarregados no *software El Temps* e organizados em actogramas e gráficos em forma de onda para observação dos padrões de atividade-reposo. O método Cosinor foi utilizado para investigação da presença de ritmicidade através das variáveis paramétricas mesor, amplitude, acrofase e porcentagem rítmica (%V). Para extração das variáveis não paramétricas L5, M10, Amplitude Relativa, Estabilidade Interdiária e Variabilidade Intradia foi utilizado o *software nparACT-package*. A análise dos dados normalizados (porcentagem em relação a atividade total diária) das variáveis ritmo circadiano e média da atividade locomotora foi realizada por dia no intervalo de trinta dias.

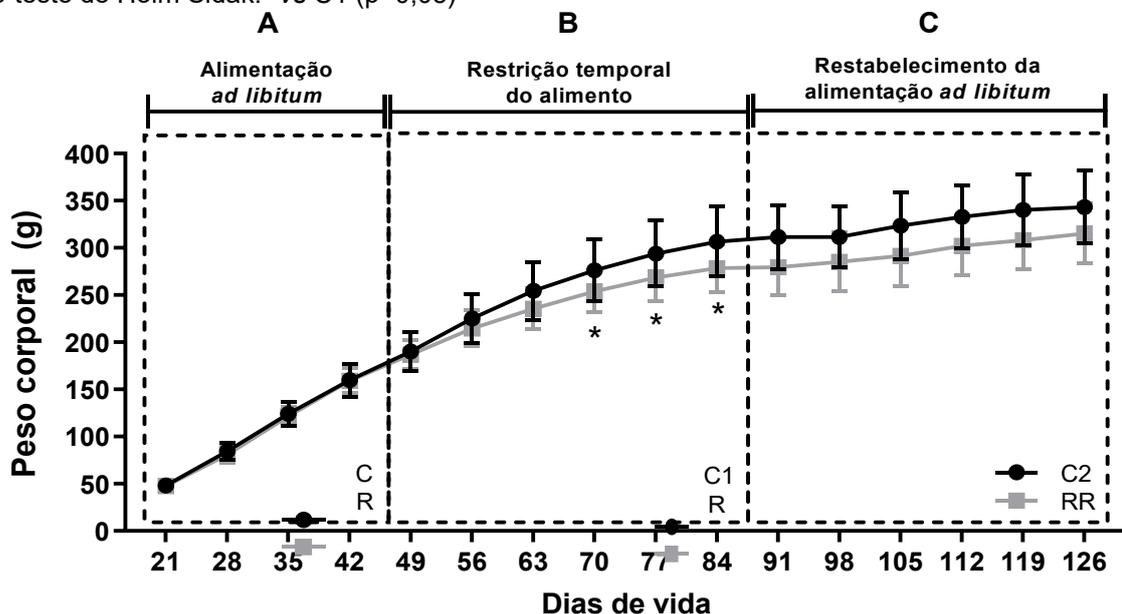
As análises estatísticas foram realizadas através do *software* GraphPad Prism®9, estabelecendo a significância de $p < 0,05$. A normalidade dos dados foi verificada a partir do Teste de Shapiro-Wilk e a investigação das possíveis diferenças entre os grupos através da aplicação do Teste T-Student não pareado (ganho de peso corporal, peso da gordura visceral, ingestão alimentar por fases do ciclo e total em 24h, área sob a curva da glicose, perfil glicêmico e lipêmico, concentrações hormonais – corticosterona, insulina, adiponectina e leptina) ou Análise de Variância (ANOVA) *two-way* (evolução do peso corporal, padrão circadiano de ingestão alimentar, glicemia circadiana, tolerância à glicose), seguida pelos Testes de Bonferroni ou Holm Sidak para determinação da significância estatística para todos os procedimentos de comparação múltipla. Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

6 RESULTADOS

6.1 EVOLUÇÃO PONDERAL

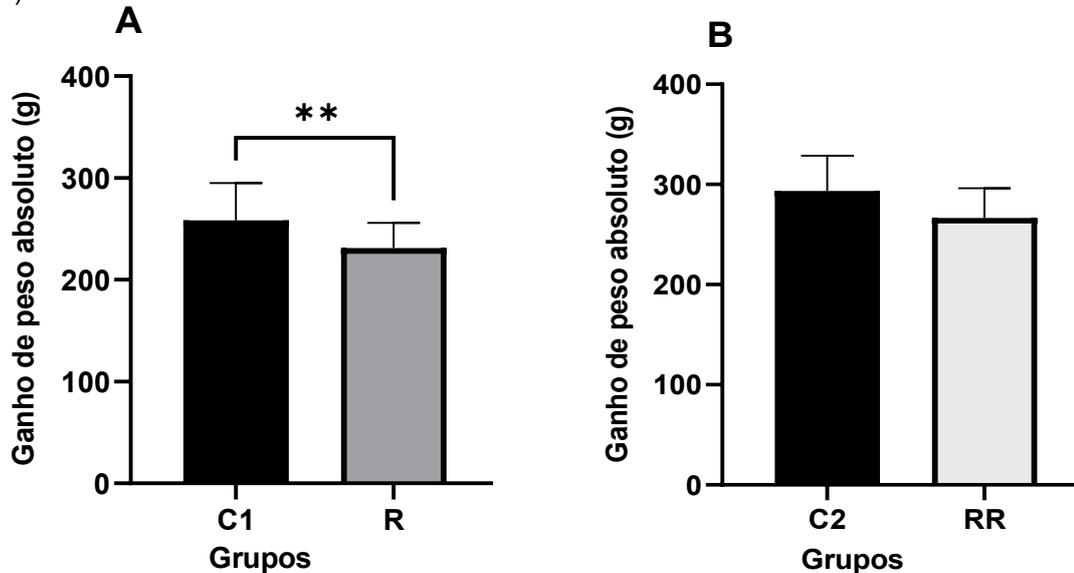
Ratos recém desmamados com peso corporal médio de $47,80 \pm 3,5$ g foram alimentados com dieta padrão *ad libitum* durante 3 semanas e aleatoriamente designados grupos Controle (C) e Restrito (R). Os grupos C e R não apresentaram diferença na massa corporal ao final de 3 semanas pós-desmame ($C = 159,7 \pm 17,5$ g; $R = 159,3 \pm 12,7$ g, $p = 0,9998$) (Figura 9A). No período de RTA (Figura 9B), o peso corporal diferiu entre os grupos R e C na terceira semana do protocolo sendo o peso dos animais restritos 11% menor ao final de seis semanas de restrição alimentar ($C1 = 306,6 \pm 37,20$ g; $R = 278,5 \pm 25,35$ g, $p = 0,0235$). O ganho de peso corporal no período entre o desmame e fim do protocolo de RTA também diferiu entre os dois grupos ($C = 258,4 \pm 36,5$ g; $R = 231,04 \pm 24,8$ g, $p = 0,0040$) (Figura 10A). Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum*, o peso corporal não diferiu entre os grupos C2 e RR ($C2 = 343,1 \pm 38,7$ g; $RR = 315,2 \pm 31,8$ g, $p = 0,9995$) (Figura 9C). Também não foi diferente o ganho ponderal entre os grupos do intervalo pós-desmame ao final do restabelecimento da alimentação *ad libitum* ($C2 = 293,5 \pm 35,2$ g; $RR = 266,4 \pm 29,9$ g, $p = 0,0744$) (Figura 10B).

Figura 9: Peso corporal de ratos antes da restrição alimentar, na restrição temporal do alimento e no restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle (C/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 1 (C1/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; aplicou-se a análise de Variância (ANOVA) *two-way* de medidas repetidas seguido do pós-teste de Holm Sidak. *vs C1 ($p < 0,05$)



Fonte: A autora, 2022

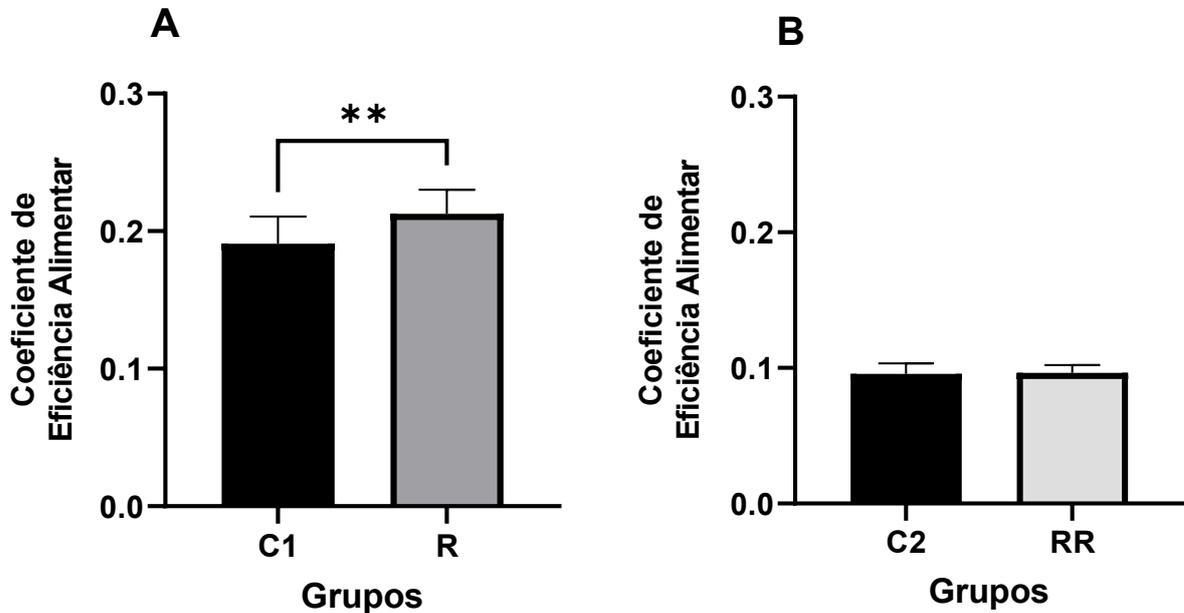
Figura 10: Ganho de peso absoluto (g) do desmame ao final da restrição temporal do alimento (A) e ao final do período de restabelecimento da alimentação *ad libitum* (B). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; aplicou-se o Teste t – Student. **vs C (p<0,05)



Fonte: A autora, 2022

Contudo, é importante destacar que ao se realizar a estatística sobre o total de alimento acumulado (C1=1209,0±132,6g; R=1051±64,1g, p<0,001), o ganho de peso no período (C1=233,7±41,8g; R=223,4±21,0g, p=0,45) e o coeficiente de eficiência alimentar (relação ganho de peso/quantidade de alimento ingerido) se observou que o protocolo de restrição promoveu um maior coeficiente de eficiência alimentar (C1=0,191±0,02; R=0,212±0,02, p<0,001) (Figura 11A), ou seja, animais restritos mesmo ingerindo menor quantidade de alimento no período convertem essa eficiência para manutenção do peso corporal. Para o grupo de animais restritos e com alimentação *ad libitum* restabelecida (RR), se encontrou também menor ingestão acumulada comparada ao controle (C2), (C2=2751±236,9g; RR=2368±212,2, p<0,001), diferença no total de ganho de peso, visto que reduziram o peso e depois recuperaram (C2=253,7±40,6g; RR=228,9±29,7g, p=0,025), mas sem diferença no coeficiente alimentar (C2=0,095±0,007; RR=0,096±0,005, p=0,685) (Figura 11B) reforçando a reversibilidade deste parâmetro após restabelecimento da alimentação *ad libitum*.

Figura 11: Coeficiente de Eficiência Alimentar do desmame ao final da restrição temporal do alimento (A) e ao final do período de restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; aplicou-se o Teste t – Student. **vs C (p<0,05)

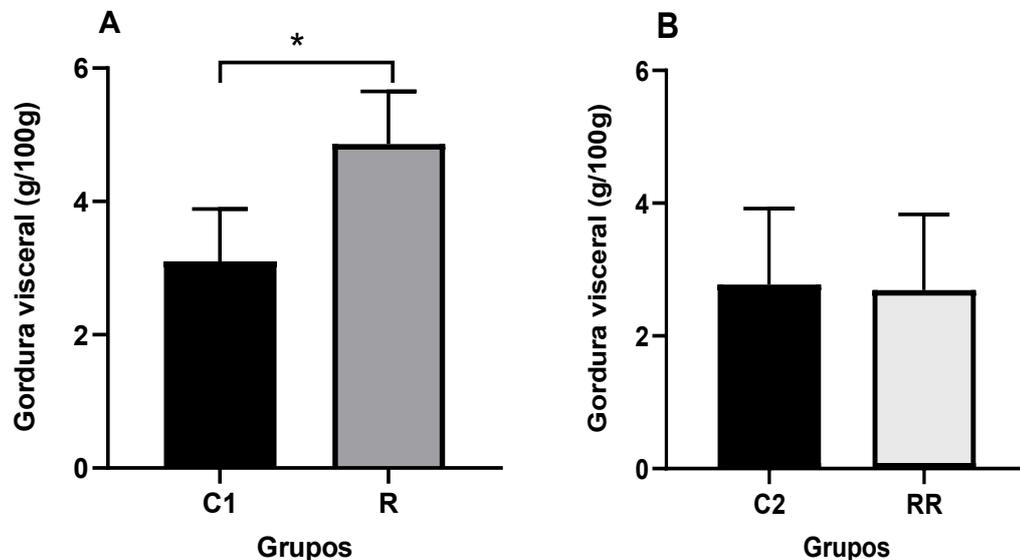


Fonte: A autora, 2022

6.2 GORDURA VISCERAL E PESO DO FÍGADO ÚMIDO

O protocolo de restrição alimentar aumentou cerca de 60% a gordura visceral dos animais restritos quando comparados ao controle (C1) (C1 = 3,10 ± 0,78; R = 4,86 ± 0,79 %g, p<0,0001) (Figura 12A). Para os animais com restabelecimento da alimentação *ad libitum* após a restrição alimentar nenhuma diferença foi observada na gordura visceral entre os grupos C2 e RR (C2 = 2,77 ± 1,14; RR = 2,69 ± 1,20 %g, p = 0,8667) (Figura 12B).

Figura 12: Gordura visceral de ratos adultos submetidos a restrição temporal do alimento (A) e restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação *ad libitum* (B). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; aplicou-se o Teste t – Student. *vs C1 ($p < 0,05$)



Fonte: A autora, 2022

A massa relativa do fígado úmido (grama por 100g de massa corporal) foi obtido e observou-se redução do tecido hepático no grupo R durante o período da restrição alimentar (C1=3,49±0,37; R=3,01±0,14g%, $p < 0,001$), mas uma total recuperação dessa massa após o retorno à alimentação *ad libitum* (C2=2,84±0,66, RR=2,67±0,81g%, $p = 0,566$).

6.3 PADRÃO CIRCADIANO DE ALIMENTAÇÃO

Na Figura 13A observa-se que a ingestão alimentar diária *ad libitum* (g/100g de peso corporal-g%) durante três dias consecutivos segue um padrão circadiano regular, o qual é caracterizado por uma menor ingestão na fase de claro seguida por um pico de ingestão nas primeiras quatro horas da fase escura (ZT12) e nas últimas 4 hs antes de acender a luz. Nos animais com restrição temporal do alimento (Figura 13B), o pico de ingestão ocorreu nas quatro horas finais da fase escura (ZT20), o qual demonstrou uma hiperfagia temporária (R = 3,41 ± 0,65 g%; C1 = 2,18 ± 1,40 g%, $p < 0,0001$) um pouco de cinquenta por cento acima do controle. Nos intervalos em que estavam sem ração, ZT12 e ZT16, a ingestão média relativa (% peso corporal) de R foi diferente de C1, o que era esperado já que os animais do grupo restrito estavam

sem comida. Com o restabelecimento da alimentação *ad libitum*, as diferenças não foram mais observadas, voltando o animal restrito à sua ingestão habitual (Figura 13C).

A ingestão relativa de alimento (g%) total e por fase do ciclo circadiano está representada na Figura 14. Nesta se observa que antes da restrição temporal do alimento os grupos não diferiram entre si ingerindo cerca de 66% do alimento na fase escura (C = $9,31 \pm 1,42$ %g; R = $9,5 \pm 1,21$ %g, $p = 0,5339$) (Figura 14A) e 34% na fase clara (C = $4,99 \pm 1,12$ %g; R = $4,49 \pm 0,92$ %g, $p = 0,1051$) (Figura 14B), representando um total em 24hs sem diferenças entre os grupos (C = $14,33 \pm 2,07$ %g; R = $14,04 \pm 1,23$ %g, $p = 0,5620$) (Figura 14C).

Porém, no período de RTA houve redução em torno de 36% da quantidade média ingerida pelo grupo R na fase escura quando comparado ao grupo C1 (R = $3,41 \pm 0,55$; C1 = $5,28 \pm 0,68$ %g, $p < 0,0001$) (Figura 14D), o que era previsível devido à ausência de alimento. Na fase clara (Figura 14E) o grupo R ingeriu cerca de 20% a mais que C1, mas sem significância entre os grupos (C1 = $3,45 \pm 0,87$ %g; R = $4,14 \pm 0,85$ %g, $p = 0,0637$) uma vez que não compensou o total reduzido na fase escura. A ausência de compensação levou a uma redução total de alimento em torno de 12% em 24h no grupo R comparado a C1 (C1 = $8,58 \pm 0,44$ %g; R = $7,56 \pm 0,91$ %g, $p = 0,0028$) (Figura 14F). Com o restabelecimento da alimentação *ad libitum* no grupo submetido a RTA nenhuma diferença foi observada entre os grupos C2 e RR durante a fase escura (C2 = $5,67 \pm 0,91$ %g; RR = $5,22 \pm 0,65$ %g, $p = 0,1757$) (Figura 14G), clara (C2 = $3,99 \pm 1,27$ %g; RR = $3,47 \pm 0,59$ %g, $p = 0,2155$) (Figura 14H) e total em 24h (C2 = $9,66 \pm 1,42$ %g; RR = $8,69 \pm 0,98$, $p = 0,0639$) (Figura 14I).

Figura 13: Ritmo circadiano da alimentação (g/100g) antes da restrição alimentar (A), na restrição temporal do alimento (B) e no período de restabelecimento da alimentação *ad libitum* (C). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle (C/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 1 (C1/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) *two-way* de medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni. *vs C1 ($p < 0,05$)

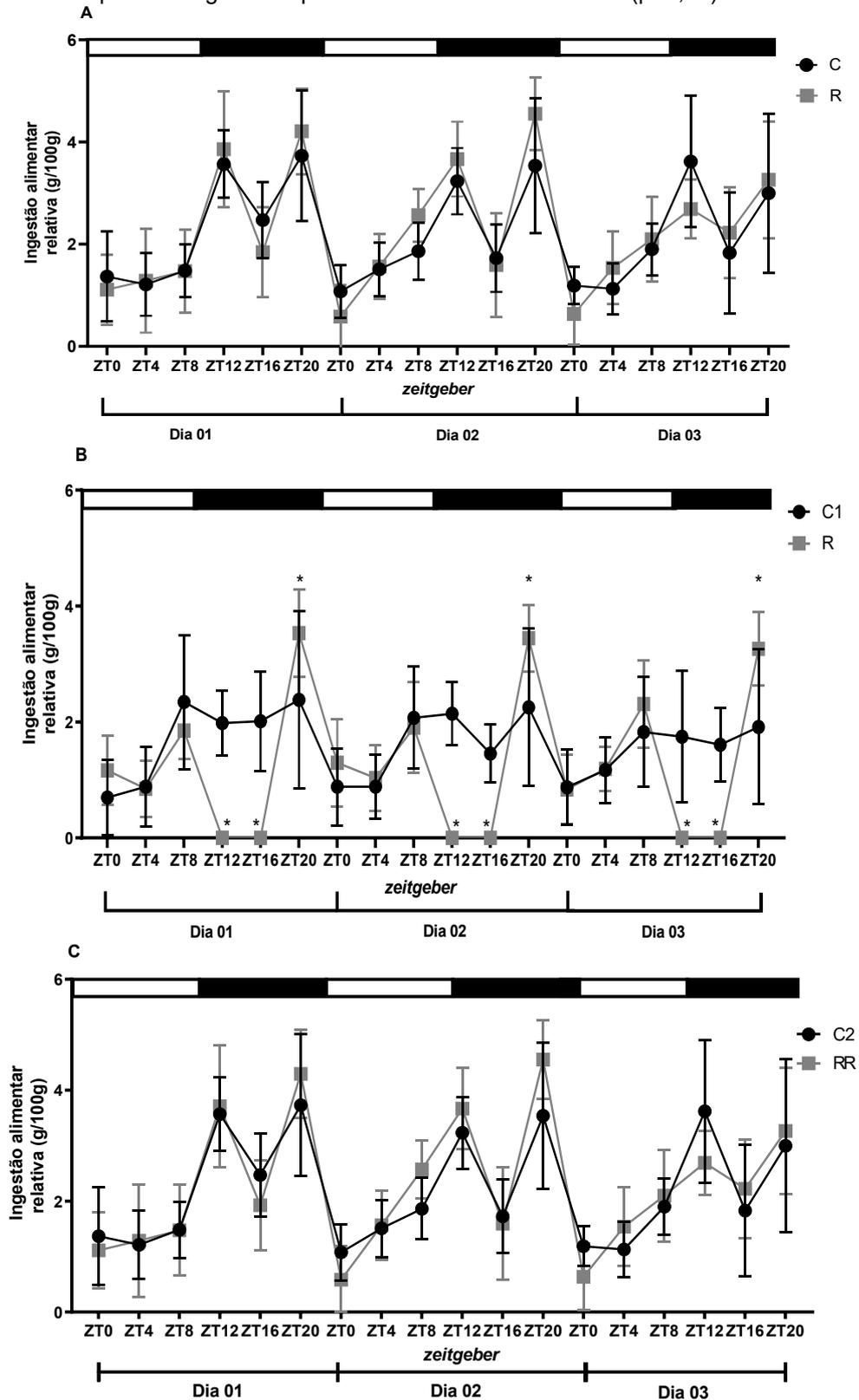
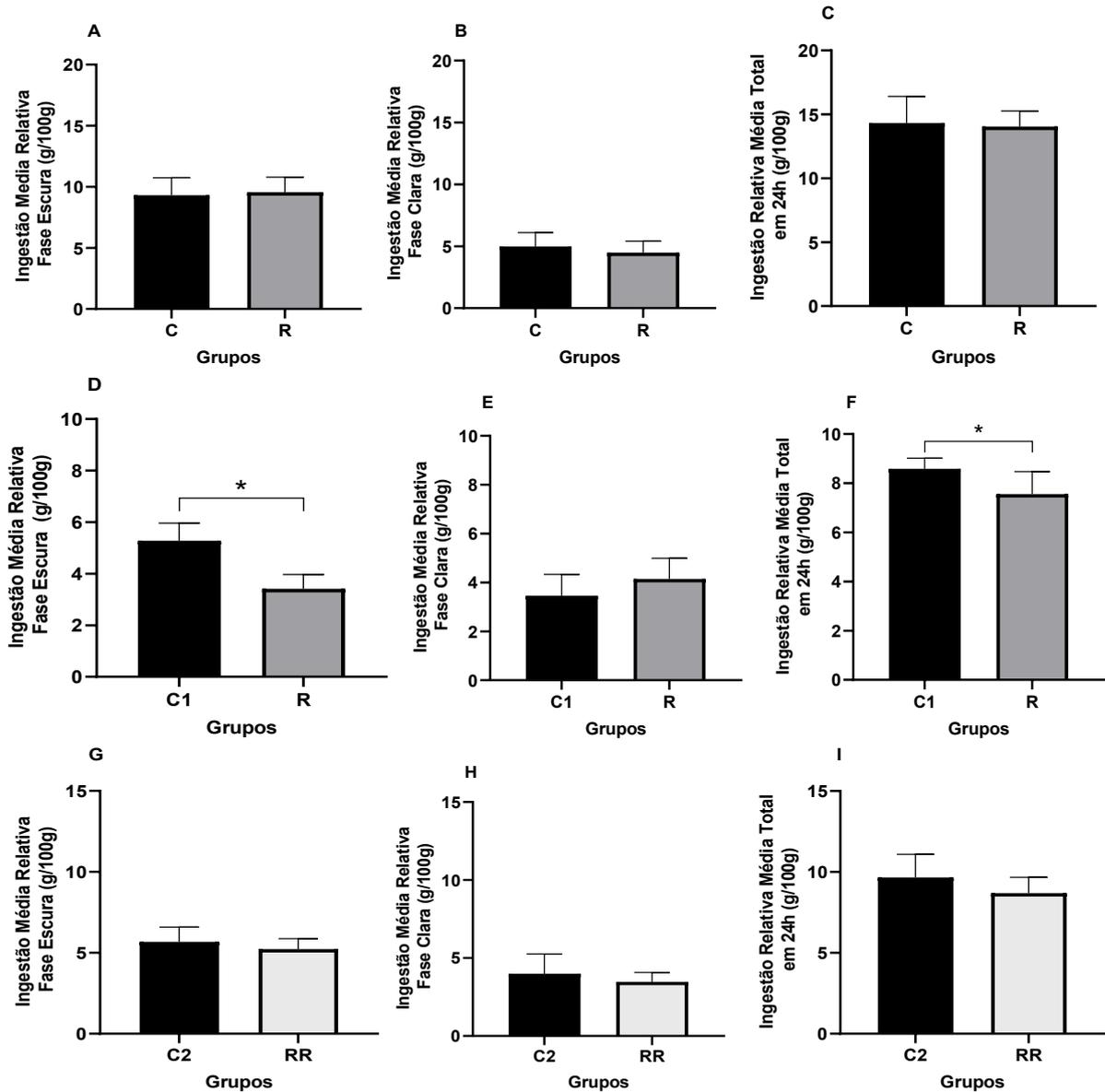


Figura 14: Ingestão alimentar média (g/100g) de ração por fases (escura e clara) e ao longo do ciclo de 24 horas antes da restrição alimentar (A, B, C), na restrição temporal do alimento (D, E, F) e no restabelecimento da alimentação *ad libitum* (G, H, I). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle (C/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 1 (C1/n=12); Restrição temporal do alimento (R/n=12); Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student. (D, F) *vs C1 (p<0,05)



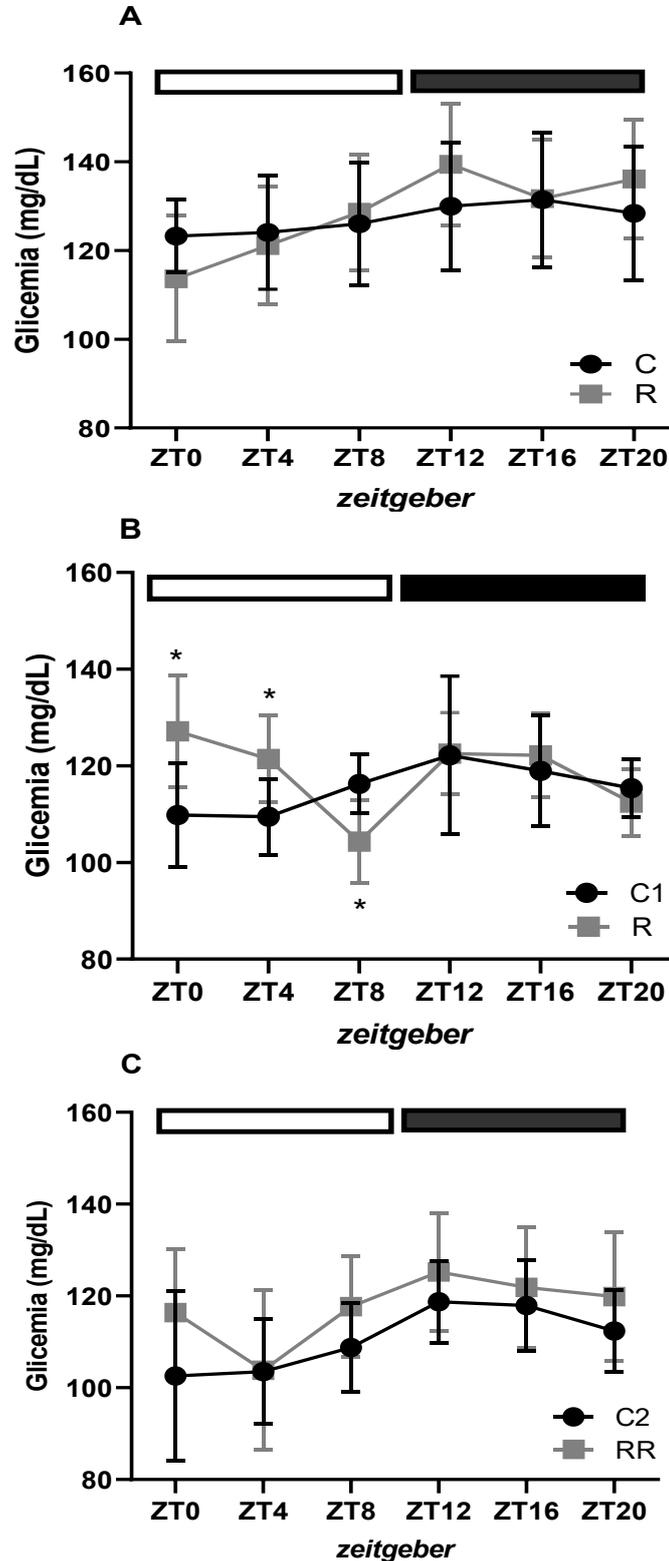
Fonte: A autora, 2022

6.4 GLICEMIA CIRCADIANA

As curvas glicêmicas de cada grupo em um ciclo de 24h nas diferentes etapas do estudo estão mostradas na Figura 15. Durante o período de alimentação *ad libitum* (Figura 15A) o padrão circadiano glicêmico não diferiu entre os animais dos grupos C

e R. Ele manteve-se constante em todos os pontos das fases clara (ZT0, ZT4 e ZT8) e escura (ZT12, ZT16 e ZT20). Na restrição alimentar (Figura 15B) observou-se alteração do perfil glicêmico circadiano de R em comparação ao C1. O grupo R demonstrou uma maior glicemia em relação ao C1 nos dois primeiros intervalos da fase clara (ZT0 e ZT4) enquanto para o último momento (ZT8) dessa fase a glicemia foi menor. Por outro lado, ao longo da fase escura a glicemia de R manteve-se constante em todos os pontos (ZT12, ZT16 e ZT20) dessa fase comparado a C1 (Figura 15B). Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* para os animais que foram submetidos a restrição temporal do alimento, nenhuma significância foi observada na curva glicêmica em comparação ao C2, sendo o padrão glicêmico constante ao longo de 24 hs para ambos (Figura 15C).

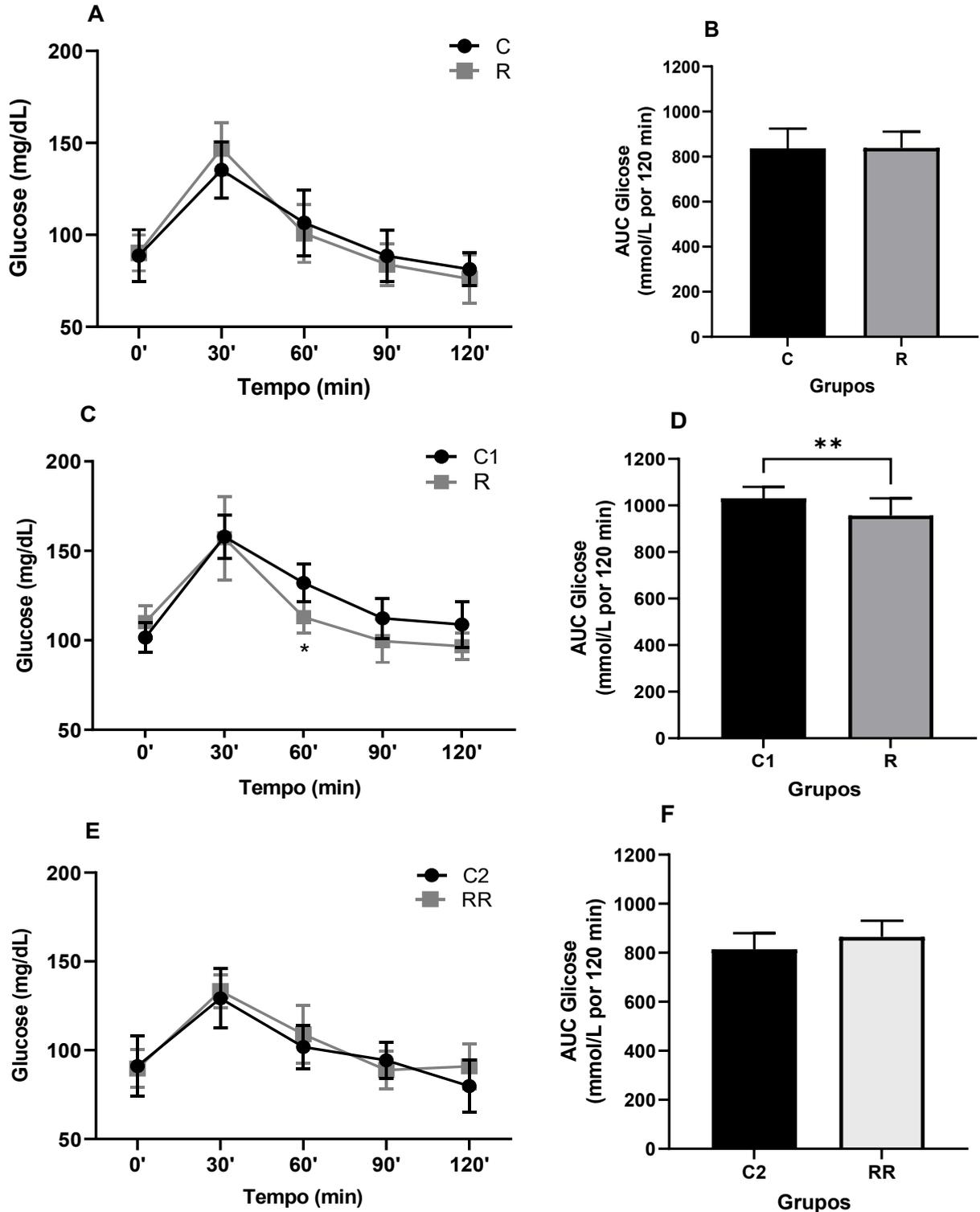
Figura 15: Curva glicêmica circadiana realizada antes da restrição alimentar (A), na restrição temporal do alimento (B) e no restabelecimento da alimentação *ad libitum* (C). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle (C/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 1 (C1/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) *two-way* seguido pelo pós-teste de Holm Sidak. *vs C1 ($p < 0,05$)



6.5 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE

Na Figura 16 estão representados a tolerância à glicose e a área sob a curva da glicose. A tolerância à glicose antes da restrição alimentar não foi significativa entre os grupos (Figura 16A). Durante a intervenção (Figura 16C), o grupo R diferiu do grupo C1 aos 60 min, refletindo também na significância na área sob a curva (Figura 16D). Para o período de restabelecimento da alimentação *ad libitum* (Figura 16E), nenhuma diferença foi observada intergrupos.

Figura 16: Tolerância à glicose (A, C, E) e área sob a curva de glicose (B, D, F) antes da restrição alimentar (A e B), na restrição temporal do alimento (C e D) e no restabelecimento da alimentação *ad libitum* (E e F). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle (C/n=24), Restrição temporal do alimento (R/n=24), Controle 1 (C1/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) *two-way* seguido pelo pós-teste de Holm Sidak para TOTG e Teste t – Student para área sob a curva. (C e D) *vs C1 (p<0,05)

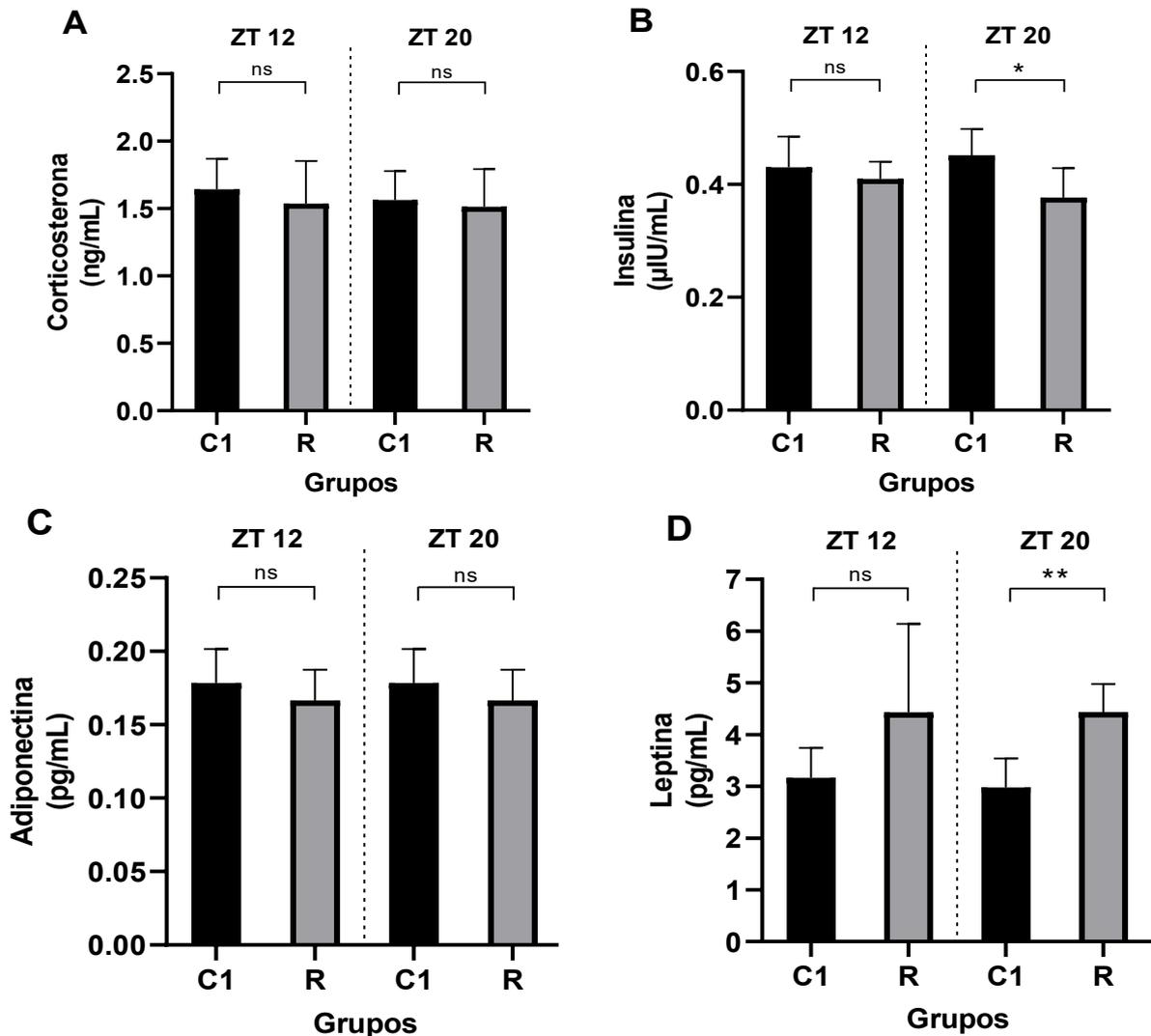


6.6 PERFIL HORMONAL

No início (Zt12) e ao final da fase escura (Zt20) foi realizada a dosagem hormonal dos grupos Controles e Restritos (Figura 17). A restrição alimentar não alterou as concentrações de corticosterona (C1 = $1,64 \pm 0,23$ ng/mL; R = $1,54 \pm 0,32$ ng/mL, $p = 0,5170$) (Figura 17A); insulina (C1 = $0,43 \pm 0,05$ μ IU/ mL; R = $0,41 \pm 0,03$ μ IU/ mL, $p = 0,4521$) (Figura 17B); adiponectina (C1 = $0,18 \pm 0,02$ pg/mL; R = $0,17 \pm 0,02$ pg/mL, $p = 0,3789$) (Figura 17C) e leptina (C1 = $3,17 \pm 0,57$ pg/mL; R = $4,43 \pm 1,71$ pg/mL, $p = 0,1172$) (Figura 17D) quando mensuradas no intervalo Zt12 ou início da fase escura em que os grupos estavam em jejum.

Ao final da fase escura (ZT20), momento de disponibilidade do alimento para os grupos C e R, o protocolo de RTA não interferiu nos níveis de corticosterona (C1 = $1,56 \pm 0,22$ ng/mL; R = $1,51 \pm 0,28$ ng/mL, $p = 0,7350$) (Figura 17A) e adiponectina (C1 = $0,18 \pm 0,03$ pg/mL; R = $0,17 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,4217$) (Figura 17C), mas reduziu os níveis de insulina quando comparados ao grupo C1 (R = $0,38 \pm 0,05$ μ IU/ mL; C1 = $0,45 \pm 0,05$ μ IU/ mL, $p = 0,0252$) (Figura 17B), e aumentou os níveis de leptina (R = $4,44 \pm 0,54$ pg/mL; C1 = $2,98 \pm 0,56$ pg/mL, $p = 0,0018$) (Figura 17D).

Figura 17: Perfil hormonal no soro de ratos adultos nos Zt12 e Zt 20 submetidos a restrição temporal do alimento. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=12) e Restrição temporal do alimento (R/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student. *vs C1 ($p < 0,05$)

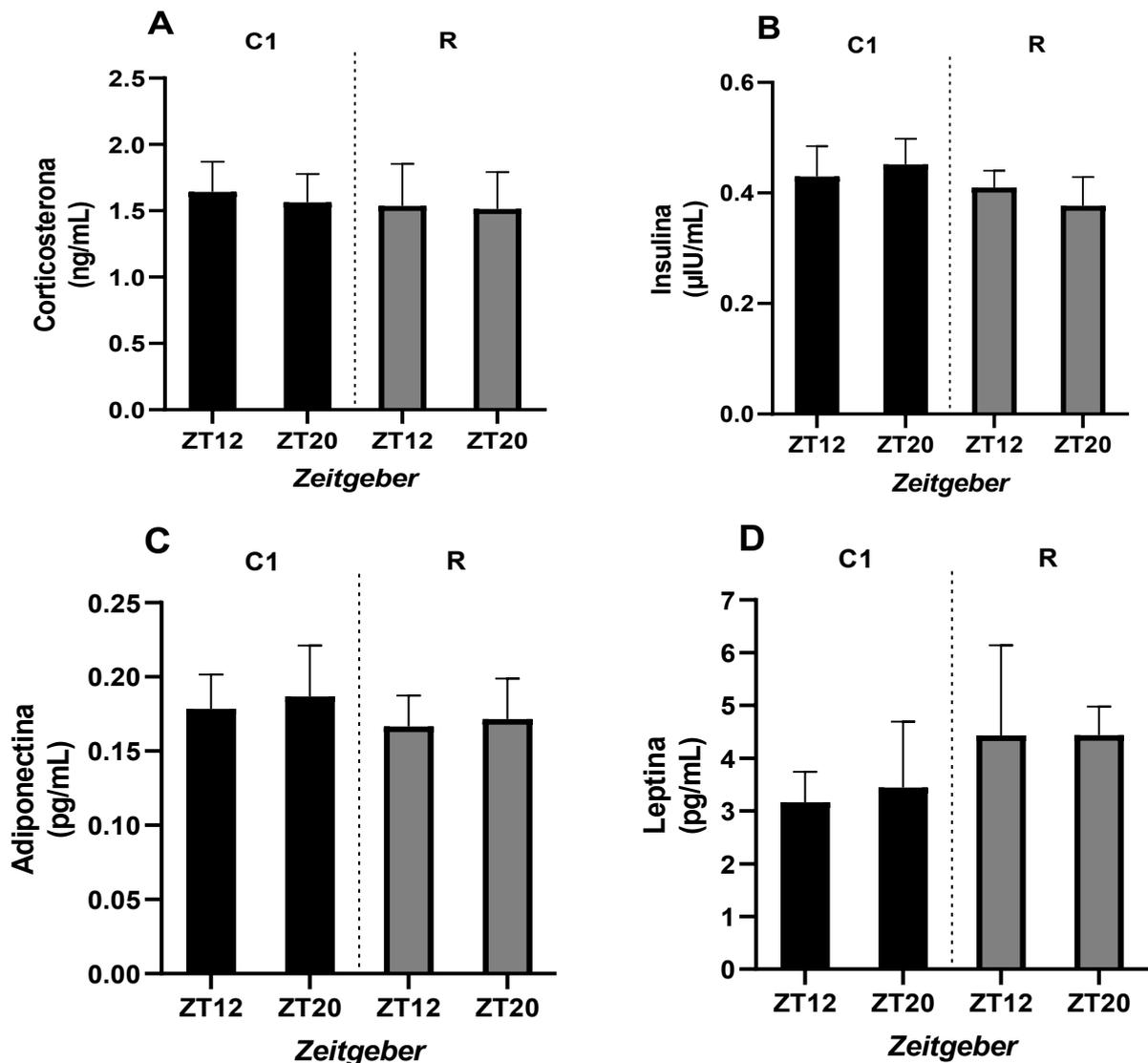


Fonte: A autora, 2022

A concentração hormonal também foi avaliada intragrupo segundo os *zeitgebers* 12 e 20, início e fim da fase escura, respectivamente, nos grupos Controle e Restrição temporal do alimento (Figura 18). Nenhuma diferença foi detectada entre os grupos nos períodos de tempo (*zeitgebers*) nos níveis de corticosterona (C1/ZT12 = $1,64 \pm 0,23$ ng/mL; C1/ZT20 = $1,56 \pm 0,22$ ng/mL, $p = 0,5451$; R/ZT12 = $1,54 \pm 0,32$ ng/mL; R/ZT20 = $1,51 \pm 0,28$ ng/mL, $p = 0,8947$) (Figura 18A); insulina (C1/ZT12 = $0,43 \pm 0,05$ µIU/mL; C1/ZT20 = $0,45 \pm 0,05$ µIU/mL, $p = 0,4777$; R/ZT12 = $0,41 \pm 0,03$ µIU/mL; R/ZT20 = $0,38 \pm 0,05$ µIU/mL, $p = 0,2050$) (Figura 18B); adiponectina (C1/ZT12 = $0,18 \pm 0,02$ pg/mL; C1/ZT20 = $0,19 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,6335$; R/ZT12 =

0,17 0,02 ± μ IU/mL; R/ZT20 = 0,17 ± 0,03 μ IU/mL, $p = 0,7270$) (Figura 18C) e leptina (C1/ZT12 = 3,17 ± 0,57 pg/mL; C1/ZT20 = 2,98 ± 0,56 pg/mL, $p = 0,5937$; R/ZT12 = 4,43 ± 1,71 μ IU/mL; R/ZT20 = 4,44 ± 0,54 μ IU/mL, $p = 0,9929$) (Figura 18D).

Figura 18: Análise hormonal por *zeitgeber* (12 e 20) intragrupos em função da restrição temporal do alimento. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=12) e Restrição temporal do alimento (R/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student.

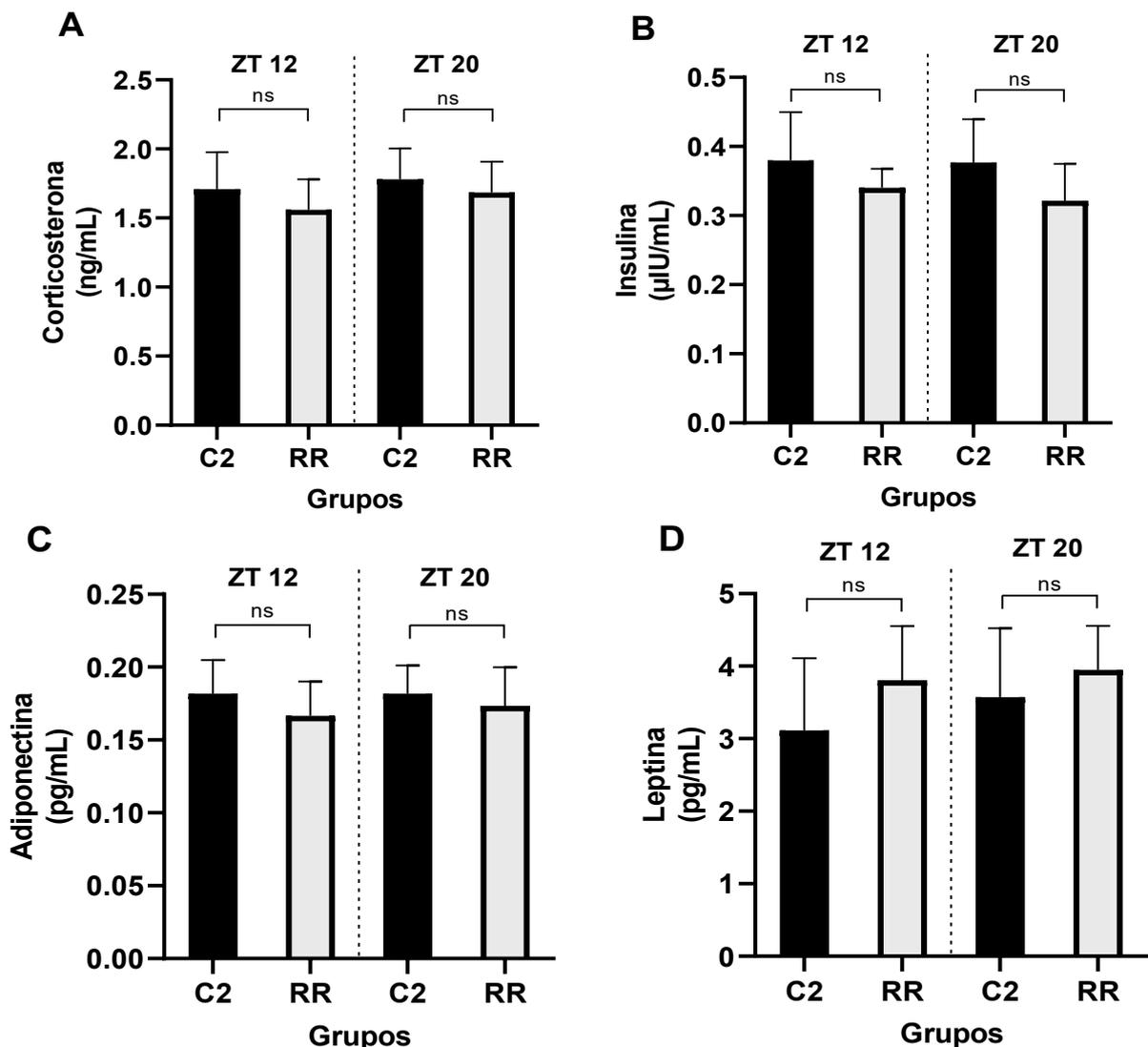


Fonte: A autora, 2022

Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* no grupo submetido a restrição alimentar, a dosagem hormonal no ZT12 (Figura 19) permaneceu sem alterações nos níveis de corticosterona (C2 = 1,71 ± 0,27 ng/mL; RR = 1,56 ± 0,22 ng/mL, $p = 0,3094$) (Figura 19A); insulina (C2 = 0,38 ± 0,07 μ IU/mL; RR = 0,34 ± 0,03 μ IU/mL, $p = 0,2212$) (Figura 19B); adiponectina (C2 = 0,18 ± 0,02 pg/mL; RR = 0,17 ±

0,02 pg/mL, $p = 0,2904$) (Figura 19C) e leptina (C2 = $3,11 \pm 1,00$ pg/mL; RR = $3,81 \pm 0,75$ pg/mL, $p = 0,2023$) (Figura 19D). Porém, as diferenças mostradas no ZT20 nos níveis de insulina e leptina desapareceram de modo que nenhuma significância foi encontrada nas diversas dosagens hormonais, como os níveis de corticosterona (C2 = $1,78 \pm 0,22$ ng/mL; RR = $1,69 \pm 0,22$ ng/mL, $p = 0,4780$) (Figura 19A), insulina (C2 = $0,38 \pm 0,06$ μ UI/mL; RR = $0,32 \pm 0,05$ μ UI/mL, $p = 0,1324$) (Figura 19B), adiponectina (C2 = $0,18 \pm 0,02$ pg/mL; RR = $0,17 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,1817$) (Figura 19C) e leptina (C2 = $3,57 \pm 0,95$ pg/mL; RR = $3,95 \pm 0,61$ pg/mL, $p = 0,4347$) (Figura 19D) em função do restabelecimento da alimentação *ad libitum* nos animais restritos.

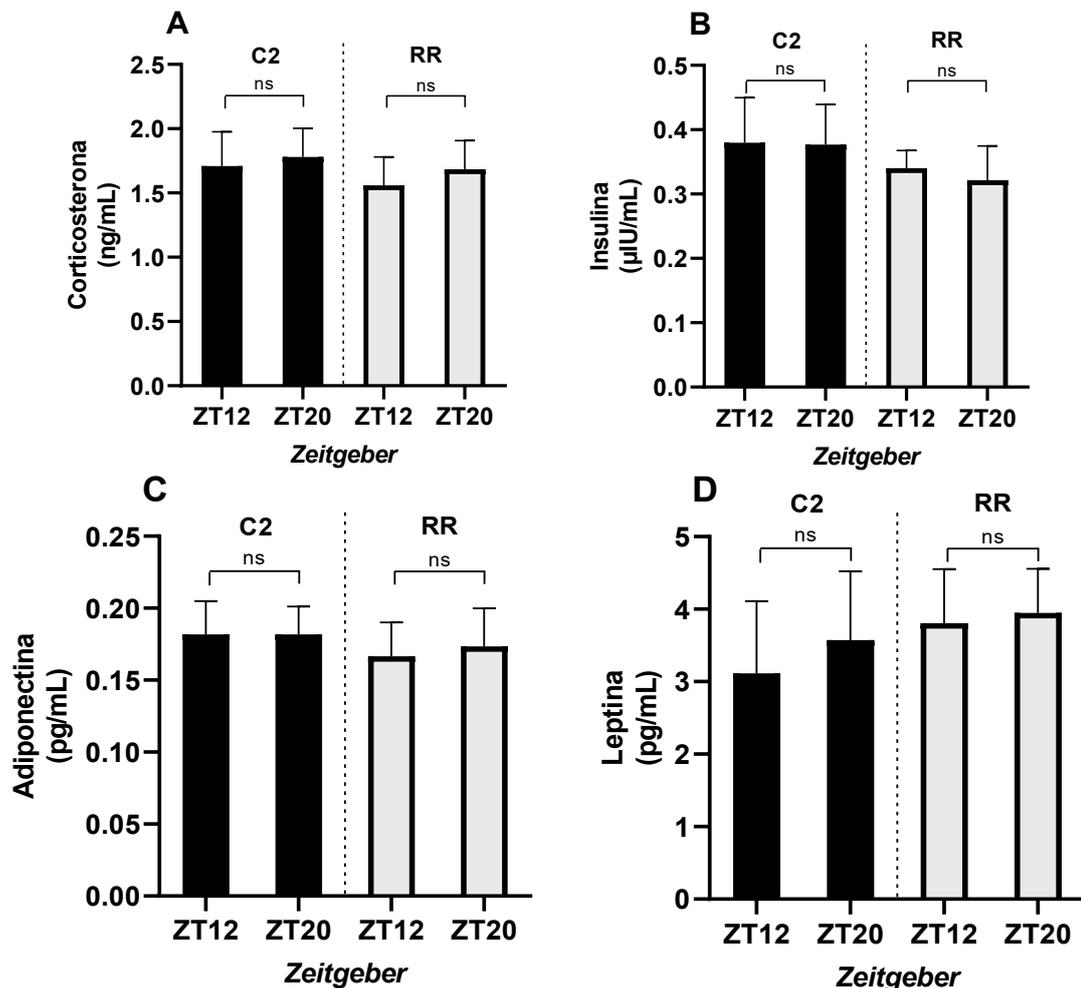
Figura 19: Perfil hormonal no soro de ratos adultos nos ZT12 e ZT20 submetidos a restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student.



Fonte: A autora, 2022

A análise intragrupo segundo os *zeitgebers* 12 e 20 também foi realizada nos grupos Controle 2 e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Na Figura 20 nenhuma significância foi observada nos níveis dos hormônios avaliados; corticosterona (C2/ZT12 = $1,71 \pm 0,27$ ng/mL; C2/ZT20 = $1,78 \pm 0,22$ ng/mL, $p = 0,6334$; RR/ZT12 = $1,56 \pm 0,22$ ng/mL; RR/ZT20 = $1,68 \pm 0,22$ ng/mL, $p = 0,3461$) (Figura 20A); insulina (C2/ZT12 = $0,38 \pm 0,07$ μ IU/mL; C2/ZT20 = $0,38 \pm 0,06$ μ IU/mL, $p = 0,9325$; RR/ZT12 = $0,34 \pm 0,03$ μ IU/mL; RR/ZT20 = $0,32 \pm 0,05$ μ IU/mL, $p = 0,4700$) (Figura 20B); adiponectina (C2/ZT12 = $0,18 \pm 0,02$ pg/mL; C2/ZT20 = $0,18 \pm 0,02$ pg/mL, $p > 0,9999$; RR/ZT12 = $0,17 \pm 0,02$ pg/mL; RR/ZT20 = $0,17 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,6545$) (Figura 20C) e leptina (C2/ZT12 = $3,11 \pm 1,00$ pg/mL; C2/ZT20 = $3,57 \pm 0,95$ pg/mL, $p = 0,4324$; RR/ZT12 = $3,81 \pm 0,75$ pg/mL; RR/ZT20 = $3,95 \pm 0,61$ pg/mL, $p = 0,7258$) (Figura 20D).

Figura 20: Análise hormonal por *zeitgeber* (12 e 20) intragrupos em função da restrição temporal do alimento associada ou não ao restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student.



6.7 PERFIL BIOQUÍMICO

O perfil glicêmico e lipêmico dos animais submetidos à restrição temporal do alimento é mostrado na Tabela 1. Para todos os parâmetros avaliados, não foi observada diferença entre os grupos C1 e R. De modo semelhante, as variáveis bioquímicas de glicemia e lipemia dos animais submetidos a restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (Tabela 1) não foram significantes.

Tabela 1: Perfil glicêmico e lipêmico no soro de ratos adultos submetidos ou não à restrição temporal do alimento seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=5); Restrição temporal do alimento (R/n=6); Controle 2 (C2/n=6) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=6). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste t – Student.

Variáveis (mg/dL)	Grupos		P
	C1 (n=5)/ Média + DP	R (n=6)/ Média + DP	
Glicemia	181,7 (±31,9)	158,2 (±16,9)	0,1413
Triglicerídeos	153,6 (±6,6)	162,6 (±13,0)	0,1955
Colesterol	102,8 (±14,4)	114,8 (±24,3)	0,3241
HDLc	41,12 (±10,1)	40,37 (±13,1)	0,9137
LDLc	35,70 (±18,3)	47,65 (±23,9)	0,3534
VLDLc	30,65 (±1,2)	32,53 (±2,6)	0,1361
RAZÃO TG/HDLc	3,97 (±0,9)	4,47 (±1,3)	0,4517

Variáveis (mg/dL)	Grupos		P
	C2 (n=6)/ Média + DP	RR (n=6)/ Média + DP	
Glicemia	160,8 (± 16,9)	148,7 (± 3,4)	0,2526
Triglicerídeos	188,7 (± 7,2)	174,4 (± 29,0)	0,3129
Colesterol	104,4 (± 6,3)	116,5 (± 20,2)	0,3040
HDLc	33,68 (± 7,6)	30,10 (± 6,8)	0,4121
LDLc	45,97 (± 4,8)	55,17 (± 25,6)	0,4082
VLDLc	37,74 (± 1,4)	34,87 (± 5,8)	0,3121
RAZÃO TG/HDLc	5,26 (± 0,5)	6,00 (± 1,4)	0,2971

Fonte: A autora, 2022

6.8 RITMO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA

6.8.1 Actogramas, perfil de atividade em 24 horas, análises cosinor e não paramétricas

O padrão de atividade locomotora dos animais ao longo de 24 horas é demonstrado através de actogramas representativos na Figura 21. Os demais actogramas, que são referentes a todos os animais dos grupos C1, R, C2 e RR estão em Apêndices A, B, C e D, respectivamente. Na Figura 21, os actogramas C1 e R são relativos aos grupos Controle 1 e Restrição temporal do alimento, respectivamente, que tiveram o registro de atividade durante 42 dias (duração do protocolo de restrição alimentar). Já os actogramas C2 e RR dizem respeito aos grupos Controle 2 e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* cuja atividade locomotora foi registrada ao longo de 75 dias (45 dias de restrição alimentar mais 30 dias do restabelecimento da alimentação *ad libitum*).

Todos os grupos concentraram a atividade na fase escura do ciclo de 24 horas, mas diferenças foram observadas em função da restrição temporal do alimento. Durante a restrição alimentar, a atividade locomotora dos grupos R e RR se apresentou menor nas horas iniciais da fase escura. Este padrão é evidenciado pelo surgimento de uma faixa branca observada no centro dos registros dos actogramas nessa fase, que se estendeu do início ao fim do período de intervenção. Com o restabelecimento da alimentação *ad libitum*, o grupo que passou pelo período de RTA restaurou seu padrão de atividade locomotora assemelhando-se ao C2, com nítida ausência da faixa branca na fase escura. Os espaços em branco situados entre os blocos de dias 15-20 para o grupo C1, 30-35 para o grupo R, 20-25 e 55-60 para o grupo C2 e 50-60 para o grupo RR (Figura 21), são relativos aos momentos em que não houve aquisição de dados devido a paralização do computador ou problemas com o Sistema Para Acionamento Programado e Monitoramento da Atividade (SAP).

O perfil circadiano do ritmo de atividade locomotora obtido por gráficos em forma de ondas (Figura 22) também demonstrou diferenças entre os grupos C1 e R. Para o grupo controle, os animais apresentaram um ritmo locomotor relativamente constante ao longo da fase escura (início aos 480 min/ ZT12 e finalização aos 1200 min/ZT0), com momentos de maior ou menor atividade, mas nunca próximos do zero. Nos animais do grupo restrito durante a mesma fase, evidencia-se um brusco decaimento na atividade que se estendeu do início da fase escura (480 min/ 08:00h/

ZT12) até, aproximadamente, o primeiro quarto (720 min/ 12:00h/ ZT 16), dessa fase, ficando, inclusive, próxima do zero neste intervalo. Posterior a este decaimento, a partir dos 720 min (12:00h/ ZT 16), a atividade volta a aumentar apresentando um pico aos 840 min (ZT18/ 14:00h, 2 horas antes da oferta do alimento) e se mantendo constante até próximo do fim (1120 min para RR) ou até o fim da fase escura (1200 min/ 20:00h/ ZT0 para R) quando decai novamente.

Figura 21: Actogramas representativos. Os gráficos evidenciam o ritmo da atividade motora. Os blocos em duas cores situados na parte superior referem-se à fase clara (blocos brancos) e escura (blocos pretos). A atividade em 24 h é representada em uma linha, e os dias são organizados de forma sequencial de cima para baixo. O valor de atividade para cada registro, coletado em intervalo de 5 min em um período de 24 horas, é representado pelas deflexões verticais. Grupos: C1/n=12: Controle 1; R/n=12: Restrição temporal do alimento; C2/n=12: Controle 2; RR/n=12: Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum*

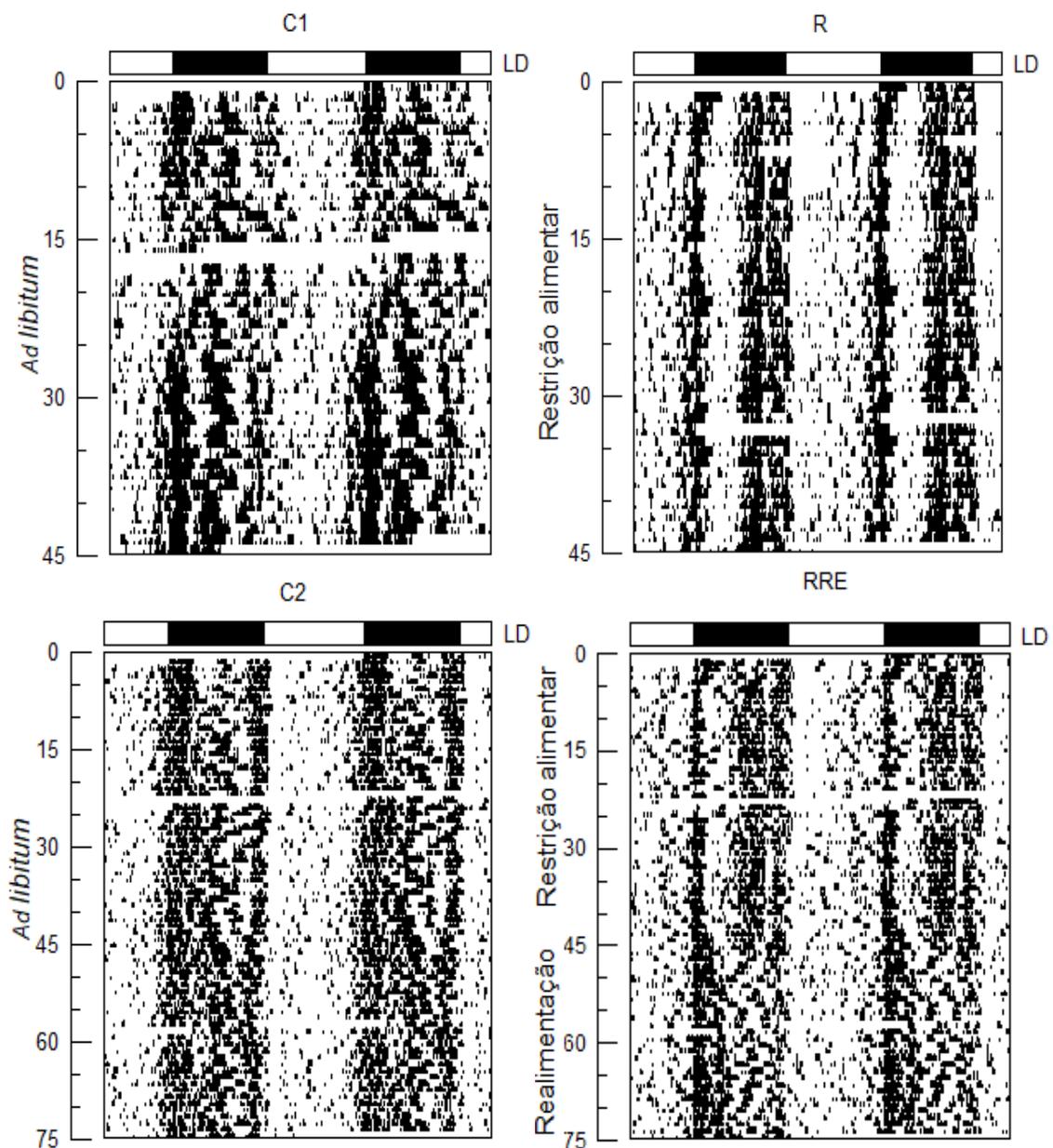
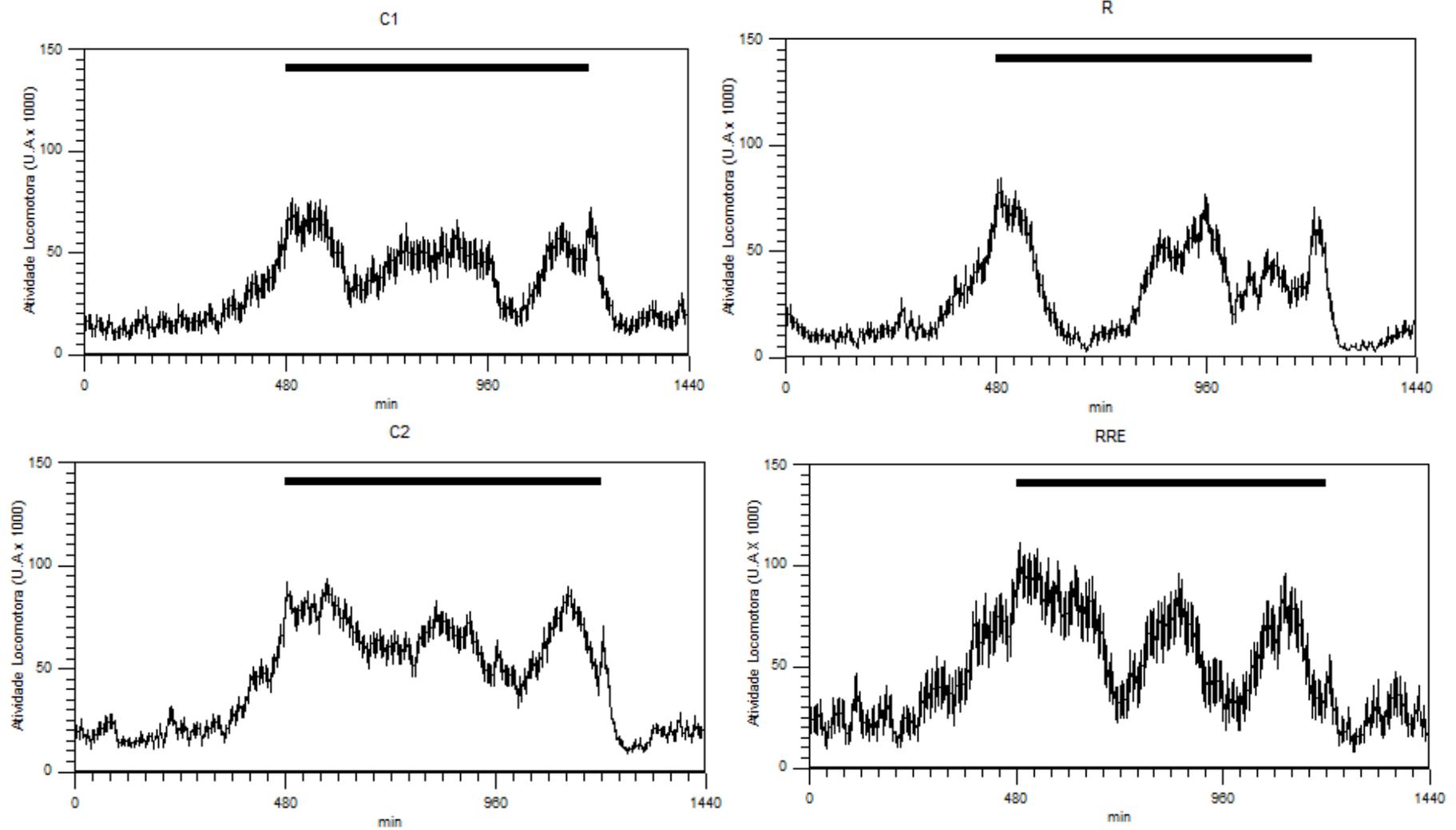


Figura 22: Perfil do ritmo de atividade locomotora em 24h. Os gráficos apresentam os dados brutos de atividade. Os dados de atividade são expressos em intervalos de 5 minutos como média e desvio padrão. Os intervalos menores, situados entre os valores maiores observados nos gráficos, são equivalentes a 40 min. Grupos: Controle 1 (C1/n=12); Restrição temporal do alimento (R/n=12); Controle 2 (C2/n=12); Restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12).



Fonte: A autora, 2022

O perfil circadiano da atividade locomotora também foi obtido a cada intervalo de 4hs ao longo de 24 horas e foi extraído a partir de médias dos valores brutos dos actogramas (Figura 23). Para os grupos controle (Figura 23A, 23B, 23C e 23D), o padrão locomotor apresentou-se regular e constante ao longo dos dias, sem diferenças nos intervalos da fase clara (ZT0, ZT4, ZT8) e escura (ZT12, ZT16, ZT20), sendo o pico de atividade no primeiro intervalo (ZT12) dessa fase.

Durante a restrição alimentar, o perfil circadiano de atividade do grupo R diferiu do C1 ao longo das semanas de restrição (Figura 23A) e na média do período (Figura 32B). Na fase clara, a atividade de R apresentou-se semelhante à de C1 nos dois primeiros intervalos (ZT0 e ZT4), mas aumentou no último momento (ZT8) dessa fase. Na fase escura, R reduziu a atividade no primeiro intervalo (Z12) e aumentou no último (ZT20), sendo esse o momento do seu pico de locomoção, e não apresentou nenhuma alteração no ZT16. Embora irregular ao longo das semanas (Figura 23A), a média da atividade (Figura 23B) demonstrou para os animais restritos um perfil de locomoção marcado por alterações no último intervalo da fase clara (ZT8) e no primeiro (ZT12) e último intervalo (ZT20) da fase escura, como relatado.

Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* (Figuras 23C e 23D), o padrão locomotor de RR apresentou-se semelhante ao de C2, regular e contínuo ao longo dos dias e sem as diferenças observadas durante o período de restrição e com completa restauração do pico de locomoção de RR durante as primeiras quatro horas (ZT12) da fase escura do ciclo (Figuras 23C e 23D).

A partir da análise da atividade locomotora pelo método COSINOR (Figuras 24 e 25; Tabela 2) verificou-se que os animais restritos demonstraram menor média na atividade ao longo de 24 horas (mesor) e menor oscilação rítmica (amplitude), além de atraso no horário de pico de atividade (acrofase) (Figura 24). Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* (Figura 25; Tabela 2) ainda se observou permanência de menor atividade ao longo de 24 horas (amplitude), pico de atividade atrasado (acrofase) e menor percentual rítmico (%V).

Na análise pelo método não paramétrico nenhuma alteração foi observada para os parâmetros L5, M10, IV e AR, porém, maior estabilidade interdiária (IS) foi vista para os animais R em comparação ao C1 (Tabela 2). Curiosamente, ao retornar para a alimentação *ad libitum* a estabilidade interdiária de RR apresentou-se reduzida em comparação ao C2 enquanto as demais variáveis continuaram inalteradas.

Figura 23: Ritmo circadiano e média da atividade locomotora em função da restrição temporal do alimento (A e B) e do restabelecimento da alimentação ad libitum (C e D). Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C/n=12), Restrição temporal do alimento (R/n=12), Controle 2 (C2/n=12) e Restrição temporal do alimento associada ao restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) two-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *vs C1 (p<0,05).

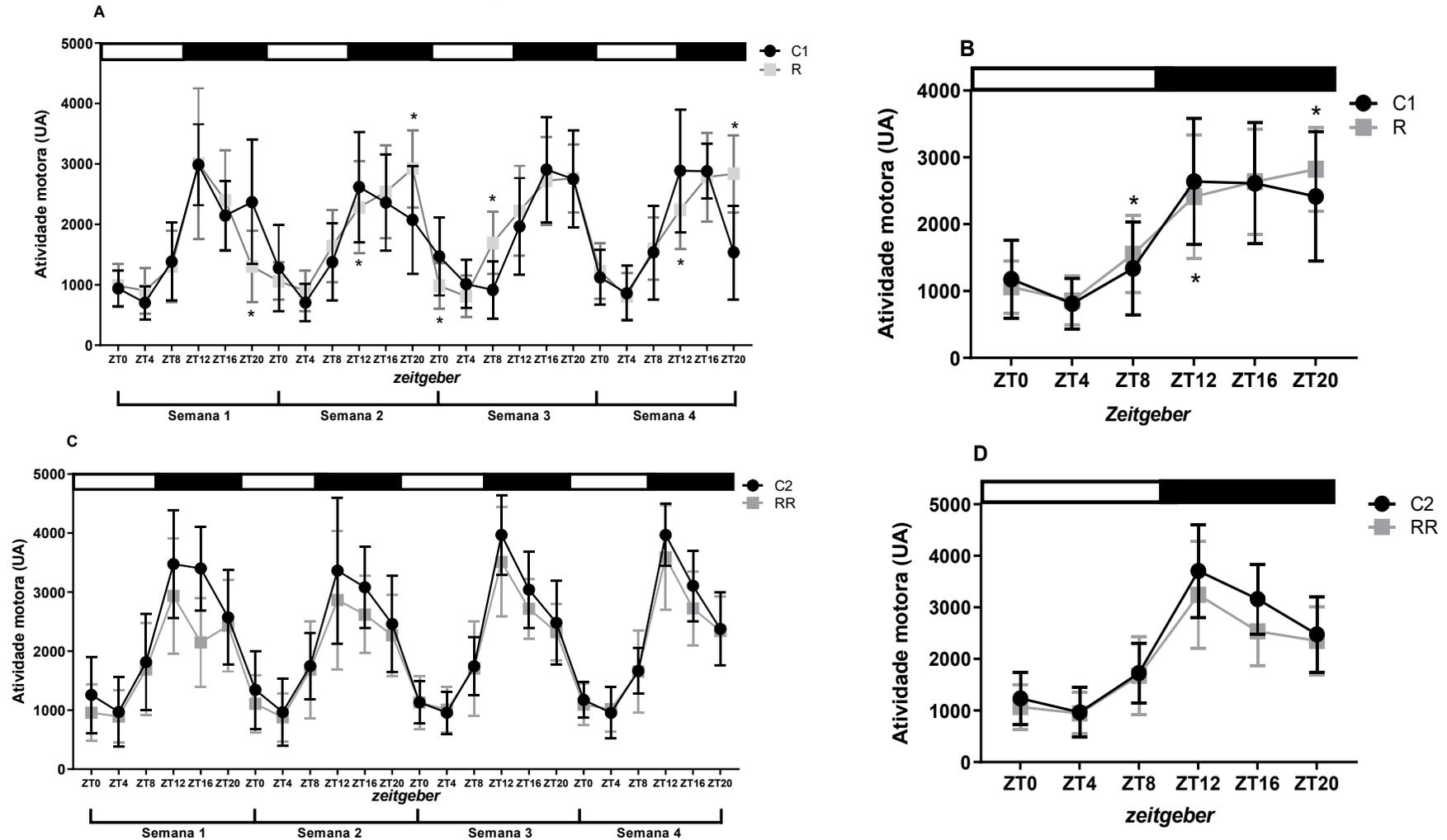
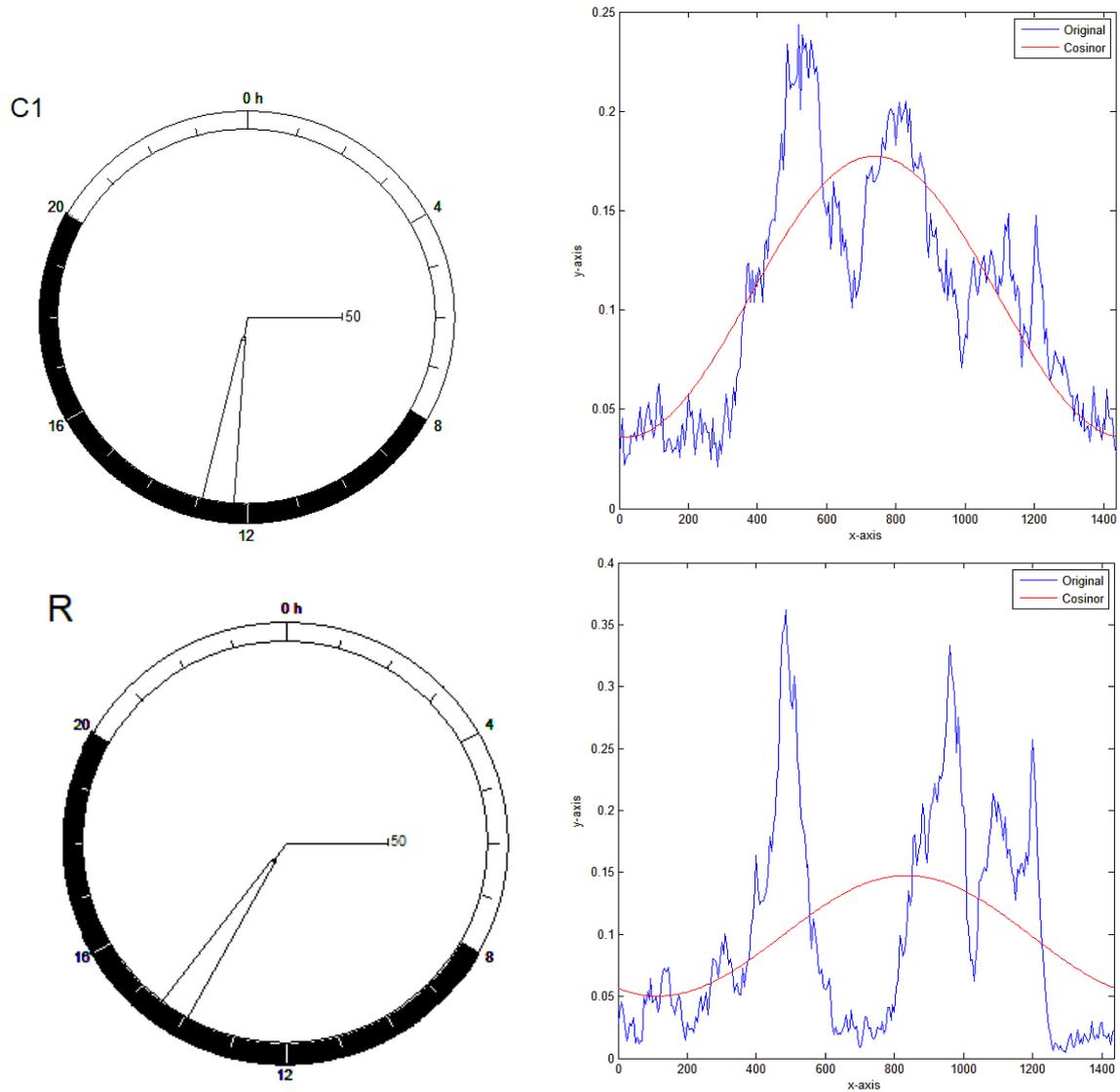
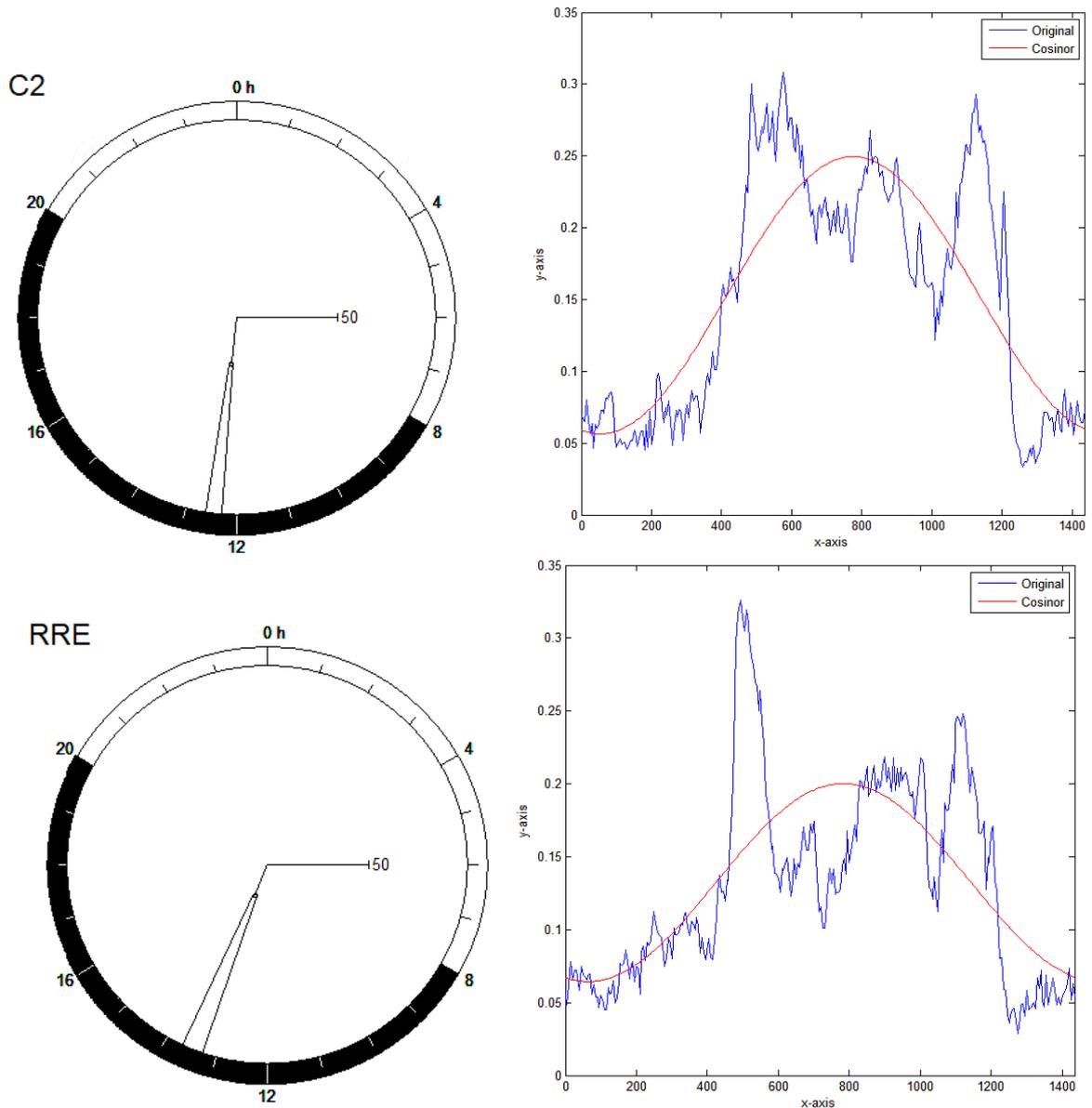


Figura 24: Perfil de atividade locomotora de animais controles e submetidos a restrição temporal do alimento analisados pelo método Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Grupos: Controle 1 (C1/n=12); Restrição temporal do alimento (R/n=12).



Fonte: A autora, 2022

Figura 25: Perfil de atividade locomotora de animais controles e submetidos a restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* analisados pelo método Cosinor e seus parâmetros: mesor, amplitude e acrofase. Grupos: Controle 2 (C2/n=12); Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=12)



Fonte: A autora, 2022

Tabela 2: Variáveis paramétricas e não paramétricas do ritmo de atividade locomotora de ratos submetidos ou não a restrição temporal do alimento seguida ou não do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Resultados expressos em média e desvio padrão, considerando o grupo Controle 1 (C1/n=5); Restrição temporal do alimento (R/n=6); Controle 2 (C2/n=6) e Restrição temporal do alimento seguida do restabelecimento da alimentação *ad libitum* (RR/n=6). Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; utilizou-se o Teste “t” de Student. *vs C1; #vs C2 (p<0,05)

Variáveis	Grupos		P
	C1/ Média + DP	R/ Média + DP	
Paramétricas			
Mesor (UA)	25,90 (± 5,70)	18,42 (± 3,49)	0,0024**
Amplitude (UA)	15,64 (± 3,45)	10,01 (±2,05)	0,0003***
Acrofase (min)	776,40 (±42,96)	825,60 (± 19,93)	0,0041**
%V	7,90 (±1,90)	4,08 (± 1,14)	<0,0001****
Não paramétricas			
L5 (UA)	10,71 (± 3,16)	10,18 (± 4,08)	0,7497
M10 (UA)	57,37 (± 11,56)	56,08 (± 10,03)	0,7932
Estabilidade interdiária (IS) (UA)	0,27 (± 0,05)	0,51 (± 0,04)	<0,0001****
Variabilidade Intradiária (IV) (UA)	0,74 (± 0,09)	0,78 (± 0,08)	0,2699
Amplitude Relativa (AR) (UA)	0,69 (± 0,04)	0,70 (± 0,07)	0,7054
Variáveis	Grupos		P
	C2/ Média + DP	RR/ Média + DP	
Paramétricas			
Mesor (UA)	40,41 (± 5,09)	37,08 (± 8,03)	0,2663
Amplitude (UA)	24,88 (± 2,99)	19,48 (± 3,45)	0,0011##
Acrofase (min)	743,00 (± 21,37)	806,10 (± 30,02)	<0,0001####
%V	15,00 (± 3,73)	10,25 (± 2,03)	0,0020##
Não paramétricas			
L5 (UA)	18,12 (± 5,79)	13,26 (±4,75)	0,0582
M10 (UA)	70,74 (± 6,87)	59,33 (±11,18)	0,0117
Estabilidade interdiária (IS) (UA)	0,39 (± 0,05)	0,30 (± 0,04)	0,0015##
Variabilidade Intradiária (IV) (UA)	0,85 (± 0,11)	0,84 (± 0,10)	0,8048
Amplitude Relativa (AR) (UA)	0,60 (± 0,08)	0,63 (± 0,06)	0,2816

Fonte: A autora, 2022

7 DISCUSSÃO

O estudo teve como foco identificar alterações fisiológicas, comportamentais e metabólicas de ratos submetidos a um protocolo de RTA de ampla janela alimentar concentrando 75% do horário de alimentação na fase inativa do animal ou fase clara do ciclo e testou a hipótese que após retorno à alimentação *ad libitum* as alterações encontradas em função do protocolo de restrição se perpetuariam. Dentre as mudanças fenotípicas causadas pela RTA pode-se citar a redução do peso corporal, e aumento na quantidade de gordura visceral. Os animais restritos apresentaram significativo pico de hiperfagia temporária nas primeiras horas de disponibilidade de ração e insignificante aumento da ingestão na fase clara do ciclo culminando com redução global da ingestão de alimento ao longo de 24h. Este achado é intrigante visto que a redução da ingestão alimentar/energética apesar de reduzir o peso corporal causou aumento na quantidade de gordura na região visceral.

Os testes de homeostasia da glicose mostraram diferenças no padrão entre os grupos durante a intervenção refletindo que o controle glicêmico possui regulação tanto do componente circadiano quanto da disponibilidade de alimento. Em adição, a disponibilidade de alimento também se mostra relevante para o controle da secreção de hormônios relacionados com a homeostase energética a exemplo dos valores elevados de leptina e reduzidos de insulina encontrados no animal submetido à restrição. O protocolo de RTA também se mostrou influente no ritmo da atividade locomotora. Após o restabelecimento da alimentação *ad libitum* a maioria dos parâmetros alterados pela RTA foram restaurados, exceto àqueles relacionados à atividade locomotora.

A redução ponderal dos animais restritos corrobora os achados de estudos que também fizeram uso da privação alimentar nas horas iniciais do período ativo de ratos *Wistar* (ALVES et al., 2021; COSTA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021). De forma similar, protocolos cuja ração foi oferecida apenas durante a fase clara, ou período de inatividade do animal, promoveram redução do peso corporal de roedores restritos comparados ao seu controle (DE ARAUJO et al., 2016; DE GOEDE et al., 2020). Por outro lado, quando a alimentação foi concentrada na fase escura/ativa do roedor, promovendo sincronia entre a variável ambiental (alimentação) e os ritmos circadianos, nenhuma alteração foi observada no peso corporal de animais submetidos à restrição alimentar em relação ao grupo controle (DE GOEDE et al., 2020). Tais evidências demonstram que o horário de realização das refeições

repercute de formas diferentes sobre o peso corporal, sendo os impactos da ingestão durante horários não convencionais mais incisivos. Soma-se as observações fenotípicas, a redução alimentar/energética de 12% ocorrida na fase escura para o grupo R, não compensada na fase clara. Certamente este fato contribuiu para o menor peso corporal detectado nos animais restritos. Estudo prévio também associou a redução ponderal de animais submetidos a protocolos de restrição temporal do alimento à diminuição da ingestão calórica (DE ARAUJO et al., 2016).

Supõe-se que a recuperação do peso perdido durante a restrição e restabelecido a seguir a alimentação ad libitum, foi facilitado porque o percentual de redução não foi intenso. No entanto, o resultado da recuperação de peso após a restrição temporal do alimento, difere do relatado por DE GOEDE et al., (2020) que reportaram persistência de menor peso corpóreo em animais com alimentação restrita ao claro. Porém, neste mesmo estudo, o mesmo padrão não procedeu com animais com alimentação restrita a fase escura comparados ao controle na primeira semana de retorno à dieta ad libitum pós restrição. É importante relatar que a literatura demonstra que alterações mais contundentes de manutenção do peso perdido ocorre em modelos de RTA em janelas temporais de 12h ou menos, o que também difere do nosso protocolo que utilizou o período de RTA de 16hs/dia.

Os ritmos circadianos juntamente com sinais humorais, neurais e hormonais determinam os intervalos diários de fome e alimentação (MENDOZA, 2019a), que repercutem na expressão cíclica de genes relacionados ao metabolismo energético (CHAIX et al., 2014). Essa influência sobre o metabolismo pode repercutir negativamente em outros parâmetros, a exemplo da maior quantidade de gordura visceral encontrada nos animais submetidos a restrição temporal do alimento. No presente estudo, o grupo R mostra um aumento de 56% na gordura visceral comparado ao controle corroborando resultados prévios de nosso grupo de pesquisa evidenciados em outros protocolos tanto em machos (COSTA et al., 2021; ROCHA et al., 2017) quanto em fêmeas (OLIVEIRA et al., 2021).

Outros pesquisadores também corroboram dos mesmos achados (KIM et al., 2021; SHIMIZU et al., 2018; YOSHIDA et al., 2012). Um estudo recente em camundongos C57BL/6J mostra que a resposta metabólica de adipócitos após protocolo de jejum intermitente varia de acordo com a distribuição anatômica, ou seja, se o tecido adiposo é de localização visceral ou subcutânea. Com uso de ferramentas de proteômica Harney et al., (2021) demonstraram redução de enzimas envolvidas

com a via lipolítica e aumento das vias lipogênicas, a exemplo de enzimas como ácido graxo sintase, no tecido adiposo visceral. Segundo os autores os depósitos de tecido adiposo se adaptam a um regime de restrição para preservar os estoques lipídicos principalmente o visceral. Além disso, esse estudo também demonstrou que a proteína termogênica UCP1 (proteína desacopladora envolvida com a termogênese) aumentou no tecido adiposo subcutâneo em função do protocolo de jejum intermitente, o que contribui para fundamentar a redução de peso corporal e a manutenção de gordura visceral nos restritos.

A elevada quantidade de gordura na região abdominal dos animais restritos também nos instiga a refletir que a retirada de alimento no período ativo leva a um estresse no organismo culminando com o aumento de corticoides circulantes. Contudo, apesar dos corticoides serem hormônios associados a maior depósito de gordura visceral (PAREDES; RIBEIRO, 2014) seus níveis não foram consistentes em nossos achados de modo que outras vias subjacentes podem ter sido responsáveis pelo acúmulo de gordura nessa região nos animais do grupo R. Outra possível explicação para o aumento de gordura visceral nos animais restritos é a responsividade de tecidos periféricos à disponibilidade de alimento e alterações no metabolismo energético.

A alimentação restrita à fase de descanso promove alterações no padrão da síntese de gordura, sendo a maior parte da produção para esse período (YOSHIDA et al., 2012). Diferentes estudos têm demonstrado os efeitos da privação alimentar na fase ativa de roedores sobre o aumento da gordura visceral (ARBLE et al., 2009b; KIM et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SALGADO-DELGADO et al., 2010; SHIMIZU et al., 2018), bem como, sua associação com a modulação de genes circadianos periféricos e do metabolismo lipídico pela restrição alimentar (SHIMIZU et al., 2018; YOSHIDA et al., 2012). Em camundongos, a privação do alimento nas primeiras 6 horas do período ativo alterou o pico de expressão de genes circadianos envolvidos com a lipogênese (*Srebp-1c*, *Gpat-1*, *Fas* e *Acc*) no tecido adiposo epididimal transferindo o pico de expressão do final do período noturno para o início do período diurno elevando os depósitos de gordura nessa região (YOSHIDA et al., 2012). Além disso, promoveu alterações nos genes circadianos *Bmal1*, *Cry1* e *Clock* aumentando sua expressão na fase clara e reduzindo na escura (YOSHIDA et al., 2012). O conjunto desses mecanismos provavelmente está subjacente ao aumento do depósito de gordura visceral encontrado no presente estudo.

Genes circadianos estão relacionados com a cíclica expressão hormonal. A variabilidade circadiana da leptina já foi evidenciada, porém, sua expressão circadiana e de seu receptor no tecido adiposo ainda não está bem definida. Estudo em cultura de células do tecido adiposo de humanos mostrou que este hormônio possui sua acrofase (expressão máxima) durante o período noturno e este período pode diferir conforme seja na gordura visceral ou na subcutânea (ABELLÁN et al., 2011). Neste estudo foi encontrado que animais do grupo R quando em restrição na fase escura apresentaram ao final desse período um aumento na concentração de leptina plasmática. A leptina, um potente anorexígeno estimulador do gasto energético e da termogênese (FLIER, 2019), participa da regulação do balanço energético e, por conseguinte, do peso corporal (ZHANG et al., 1994). Esse hormônio também possui maior expressão no tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral e seu pico de expressão no visceral é antecipado em comparação ao subcutâneo (ABELLÁN et al., 2011).

Partindo da premissa que não mensuramos compartimentos anatômicos de tecido adiposo e nem a expressão de leptina em adipócitos, mas sim, os níveis de leptina circulante, pode-se sugerir que os animais do grupo R possam ter tecido adiposo desenvolvido como observado na gordura visceral. O aumento da leptina é conhecido por se relacionar com a massa de tecido adiposo (tanto em número de adipócitos quanto na indução de RNAm). Esta premissa pode levar à especulação de que a redução de peso corporal nesse grupo pode não ter ocorrido em função da perda de gordura subcutânea, mas sim, de massa muscular, visto que a leptina também aumenta o gasto energético. Perda de massa muscular foi encontrada em ratos *Sprague-Dawley* em estudo realizado em protocolo de jejum intermitente de 24 hs (CHAUSSE et al., 2014). Foi verificado também que animais em restrição temporal de alimentação reduzem massa hepática, sugerindo maior mobilização deste tecido para provimento de energia e/ou metabólitos (HOLDERBAUM et al., 2018; LEWIS et al., 2006). No entanto, os níveis de leptina não são regulados apenas em função da massa adiposa, mas sim de outros fatores envolvidos, a exemplo do jejum, estresse, sono, entre outros.

Não foi avaliado exatamente o período de sono dos animais, mas, a partir do contínuo registro locomotor observa-se pelos resultados da variabilidade interdiária que não parece ter ocorrido fragmentação do sono a partir do protocolo adotado. Conforme observado no actograma, gráficos em forma de ondas e análises COSINOR

durante o período de restrição, houve redução da atividade locomotora dos animais do grupo R. Segundo Zhao et al (2013), um menor tempo gasto em movimentação do animal pode aumentar as concentrações de leptina. Estudo anterior aponta que maior repouso ou sono tem sido associado ao aumento da concentração de leptina (SPIEGEL et al., 2004), fato este que pode ter ocorrido ao grupo R em função da evidente redução da atividade no período escuro. A relação entre leptina e sono ainda necessita de maiores esclarecimentos, mas foi recentemente publicado que administração de leptina exógena na região dos núcleos pré-ópticos ventrolaterais, principal área de promoção de sono, promoveu a expressão de sono REM e NREM (RAMÍREZ-PLASCENCIA et al., 2022).

De forma oposta, o grupo R apresenta níveis baixos de insulina comparado ao controle, o que se mostra coerente ao estado de jejum dos animais. A insulina é um potente modulador do comportamento alimentar e metabolismo (MITCHELL; BEGG, 2021b) com receptores em diversas regiões cerebrais a exemplo do bulbo olfatório, hipocampo, cerebelo, estriato, mesencéfalo (KLEINRIDDERS et al., 2014).

Juntas as evidências fortalecem a premissa de que a restrição alimentar é positiva para a perda ponderal, mas prejudicial para o acúmulo de gordura visceral. Com o restabelecimento do padrão *ad libitum*, a recuperação da sincronia entre a variável ambiental (horário de alimentação) e sistema circadiano possivelmente contribui para a homeostase do metabolismo energético e lipídico. Este fato pode explicar em parte o semelhante peso corporal e quantidade de gordura visceral entre os animais do grupo RR e C2.

Como documentado na literatura, os horários de alimentação são potentes reguladores do metabolismo energético e de genes periféricos circadianos relacionados ao metabolismo. O padrão e ritmo endógeno de ingestão alimentar de roedores já foi demonstrado em estudos prévios, cujo pico de ingestão corre nas primeiras horas da fase escura do ciclo (NASCIMENTO et al., 2013; OROZCO-SÓLIS et al., 2009) e foi corroborado neste estudo. Devido à privação de ração nas horas iniciais do escuro, o padrão de alimentação nos animais em restrição altera o pico da ingestão e mostra uma hiperfagia temporária nas últimas horas do período escuro.

Animais em protocolos de jejuns intermitentes de 24hs sem alimento ingerem a maior parte da dieta (53%) em apenas 2 horas, apesar de reduzirem a ingestão total em 20% e o ganho de peso em quase 50%. No presente estudo, apesar da hiperfagia temporária observada no grupo R, esta não foi suficiente para compensar o déficit

energético detectado durante o período de privação de alimento ao longo do período de disponibilidade de ração.

Alguns protocolos de RTA repercutem na redução de peso corporal, mas sem interferência na quantidade de tecido adiposo visceral sugerindo um estado de reduzida conversão energética (CHAUSSE et al., 2014). No caso do protocolo do presente estudo, se observa que os animais do grupo R aumentaram sua eficiência metabólica repercutindo em melhor conversão energética, segundo os resultados do coeficiente de eficiência alimentar, ou seja, apesar da redução da ingestão alimentar (menos 14%), o ganho de peso no período ficou apenas 5% menor que o controle. Porém, essa eficiência não permaneceu após a restauração da alimentação *ad libitum*.

Períodos de jejum podem alterar a expressão e/ou razão entre peptídeos orexígenos/anorexígenos. Alterações no horário de alimentação podem afetar hormônios relacionados à saciedade (ARBLE et al., 2009; ASAO et al., 2016). A seguir a um período de 24hs de jejum ou mesmo quando a alimentação está disponível, a expressão de peptídeos orexígenos hipotalâmicos mostraram-se elevados em ratos a exemplo de Agrp, orexinas, NPY quando submetidos a protocolo de jejum intermitente, mas não necessariamente mostrou-se associado ao aumento de grelina (CHAUSSE et al., 2014) o que demonstra a complexidade do controle alimentar.

O controle da ingestão alimentar é um mecanismo complexo que envolve uma interação neuro-endócrina e de metabólitos a partir da liberação de compostos centrais e periféricos. A ausência de compensação da ingestão no período com alimento disponível *ad libitum* pode ter algumas explicações. O aumento da leptina encontrado no grupo R pode também ter contribuído para a redução da ingestão de alimento na fase clara do ciclo visto que este hormônio tradicionalmente é conhecido como supressor do apetite (FLIER, 2019). Outrossim, foi demonstrado que os níveis plasmáticos de leptina aumentam em resposta à alimentação pós-jejum, sendo a liberação observada principalmente pela mucosa gástrica (PICÓ et al., 2002). Além disso, a ação da leptina pode ter sido fortalecida pela restrição temporal do alimento já que diante da utilização desse protocolo há aumento da sensibilidade à leptina no núcleo arqueado que resulta em diminuição da ingestão alimentar (TACAD et al., 2022).

Durante a restrição, o padrão cíclico da alimentação medido a cada 4 horas foi alterado em função da falta de alimento, mas, logo após o retorno ao padrão habitual

este ritmo foi restabelecido com um perfil similar ao do controle e daquele obtido antes da R com semelhante quantidade de ração ingerida entre os grupos, tanto por fases quanto total em 24 horas. De Goede et al. (2020) apontou resultado semelhante para o consumo total em 24 h, mas a diferença por fases persistiu entre os grupos restrito e controle após a volta ao padrão *ad libitum*. Esta ausência de alteração permanência do padrão de ingestão pode ser consequente ao tipo de protocolo utilizado visto que o período restrito à alimentação corresponde a uma ampla janela alimentar com horários tanto de fase escura quanto clara.

O acompanhamento da curva glicêmica circadiana mostra que esta é responsiva ao horário de disponibilidade do alimento. Neste sentido, o aumento das concentrações glicêmicas em Zt0 e 4 nos animais restritos pode estar relacionado ao momento de disponibilidade do alimento e tolerância dos tecidos à glicose. Em Zt0, as concentrações glicêmicas para o grupo R deveriam ser baixas, porém, a oferta de ração para esse grupo aconteceu no momento em que a tolerância à glicose, e consequentemente sua captação pelos tecidos, é menor (Zt20), ou seja, ao final da fase escura. Este fato pode ter influenciado o rápido retorno das concentrações glicêmicas aos valores basais, ou ainda, pelo aumento de hormônios contra regulatórios da insulina (a qual mostrou-se reduzida na restrição), sobretudo o glucagon que ativa vias gliconeogênicas para manutenção da glicemia (MLEKUSCH et al., 1981).

Outra hipótese para o aumento glicêmico na fase clara (Zt4) pode ser a elevada hiperfagia do grupo R nas primeiras horas após a oferta de alimento, o que culminou com um pico de ingestão 60% acima do ingerido pelo controle, prolongando o tempo necessário para a completa absorção da glicose pelos tecidos insulino-dependentes. A restrição alimentar em dessincronia com o sistema circadiano piorou a tolerância à glicose em roedores (DE GOEDE et al., 2019). Estudos realizados em humanos também demonstraram aumento das concentrações glicêmicas e redução da tolerância à glicose quando a ingestão alimentar ocorre à noite (BONNELL et al., 2017; LEUNG; HUGGINS; BONHAM, 2019; MORGAN et al., 2012; SIMON; FOLLENIUS; BRANDENBERGER, 1987; VAN CAUTER et al., 1991). Juntos esses estudos corroboram os nossos achados, mostrando que a alimentação restrita a um horário inadequado repercute de maneira negativa sob o metabolismo da glicose com elevação do nível plasmático em momento coincidente com baixa sensibilidade tecidual circadiana da insulina.

A homeostase da glicose está sob controle do NSQ, que regula o ritmo diário das suas concentrações plasmáticas aumentando-as no início do período ativo e reduzindo-as ao final dele. Igualmente, o NSQ regula a tolerância à glicose de forma consistente com o padrão observado nas concentrações plasmáticas, ou seja, maior sensibilidade na fase ativa com gradual redução ao longo alinhado ao aumento da inatividade (LA FLEUR, 2003; LA FLEUR et al., 2001).

O alterado perfil glicêmico em função da RTA foi recuperado após restabelecimento da alimentação *ad libitum*. A melhoria do controle glicêmico após a restrição pode ser estar associada à redução da sobrecarga alimentar ao final da fase escura, tendo em vista que o retorno ao padrão normal da alimentação diminuiu a demanda de glicose a ser absorvida num período de reduzida sensibilidade tecidual. A pequena quantidade de estudos observando os efeitos da oferta *ad libitum* da alimentação após a restrição temporal do alimento limita a comparação dos resultados encontrados no nosso estudo. Contudo, fica evidente que o protocolo utilizado, com destaque para a alimentação restrita ao final da fase ativa e início da inativa, compromete a manutenção da homeostase glicêmica, mas que tais alterações desaparecem diante da restauração da ingestão *ad libitum*.

A avaliação do padrão de resposta à sobrecarga de glicose através do TOTG na fase escura do ciclo revelou alteração em função da restrição alimentar, sendo uma maior sensibilidade à glicose identificada aos 60 minutos da curva. Independente da alteração no controle glicêmico, a tolerância à glicose na fase escura foi melhorada no grupo restrito e essa poderia se relacionar à maior responsividade dos tecidos à glicose nesse horário, que pode ter sido intensificada pela restrição alimentar. Esse resultado, porém, diverge de estudos prévios realizados pelo nosso grupo de estudo (ALVES et al., 2021; ROCHA et al., 2017) em que as alterações na tolerância à glicose pelo TOTG foram observadas na fase clara do ciclo e não durante a escura. As evidências apontam que a fase do dia na qual o teste de tolerância é realizado depende da sensibilidade tecidual e controle circadiano. De Goed et al (2019a) também relataram melhora da tolerância à glicose em ratos submetidos à restrição temporal do alimento quando a ingestão alimentar ocorreu dentro da fase ativa do animal. O padrão de tolerância à glicose pelo TOTG foi restabelecido nos animais restritos após retorno à alimentação *ad libitum* demonstrando que diante do padrão habitual de alimentação os efeitos da restrição alimentar são descontinuados, seja do ponto de vista positivo ou negativo para a saúde metabólica.

Apesar da redução da ingestão na fase escura e do aumento do tecido adiposo visceral, os níveis de corticosterona e adiponectina não foram alterados pelo protocolo de RTA em nenhum dos horários avaliados (início e final da fase escura), o que denota independência tanto da fase do ciclo quanto do estado alimentado ou não dos grupos. Os níveis plasmáticos de adiponectina oscilam durante o dia em função da necessidade energética. As concentrações de adiponectina aumentam antes do início da fase ativa (BARNEA et al., 2015) enquanto os de leptina aumentam gradualmente durante a fase ativa com pico alcançado antes do início da fase de repouso (GAVRILA et al., 2003) e atinge a menor concentração horas antes do início da fase ativa do animal (SÁNCHEZ et al., 2004).

Em roedores, os níveis de leptina reduzem imediato a uma privação aguda de alimento ou à redução de massa de gordura consequente a uma restrição calórica prolongada, e se relacionam à diminuição da atividade locomotora e aumento da atividade antecipatória ao alimento (AAA) (CECCARINI et al., 2015). No entanto, um estudo realizado por Ribeiro et al (2011) demonstrou que a atividade locomotora e a AAA são reguladas independentes da leptina (RIBEIRO et al., 2011). No presente estudo, a restrição de alimento não ocorreu de forma aguda e, apesar da redução de peso corporal e aumento da gordura visceral, não se pode afirmar que o tecido adiposo corporal total estava reduzido. Em nossos resultados, o protocolo de restrição diminuiu a atividade locomotora no início da fase escura e promoveu um pico de atividade ao final desse período coincidente com o momento de disponibilização do alimento, o que mostra coerência com os relatos de Ceccarini et al. (2015) em que os autores relacionam este padrão de atividade com os níveis de leptina.

De modo contrário ao observado para a leptina, as concentrações plasmáticas de insulina foram reduzidas em Zt20 nos ratos submetidos a restrição temporal do alimento. As concentrações de insulina apresentam um ritmo ao longo de 24 horas, que seguem as concentrações plasmáticas de glicose (LA FLEUR et al., 2001). Em ratos com dieta *ad libitum*, os níveis de insulina são baixos durante a fase clara, mas aumentam antes do início da fase escura. Na fase escura, as concentrações de insulina continuam aumentando gradativamente e atingem um pico 3 horas antes do término dessa fase, quando seus níveis voltam a diminuir (SÁNCHEZ et al., 2004). Embora não se tenha avaliado o perfil circadiano da insulina, observa-se que a ausência de alimento no grupo R durante a fase ativa do animal mostra-se determinante para a reduzida concentração desse hormônio ao final da fase escura.

O respaldo a esta afirmação pode ser demonstrado com a restauração dos níveis de insulina ocorrido no mesmo horário quando a alimentação foi restabelecida, demonstrando mais uma vez a evidente influência da alimentação para o controle da secreção hormonal relacionada a regulação energética.

As evidências a respeito da influência de protocolos de RTA sobre o ritmo de atividade-reposo demonstram diferentes resultados. Kim et al (2021) observaram semelhante padrão diário da atividade locomotora de ratos com omissão do café da manhã em comparação ao seu grupo controle (KIM et al., 2021). O protocolo de trabalho noturno realizado em camundongos fêmeas também não alterou o padrão nem a ritmicidade do ritmo de atividade-reposo (ZHONG et al., 2019). Já estudo com alimentação ultradiana, com a ocorrência de 6 refeições diárias, sendo três refeições com duração de 12 min na fase clara e três refeições com duração de 11 min na fase escura, demonstrou alteração na acrofase e na amplitude do ritmo entre animais experimentais e alimentados *ad libitum* (DE GOEDE et al., 2018).

Os distúrbios provocados pela RTA no ritmo de atividade locomotora não foram reversíveis ao fim do restabelecimento da alimentação *ad libitum*. Com exceção do mesor, o percentual de variação em torno do ritmo e a acrofase continuaram alterados indicando um sustentado efeito posterior da privação alimentar nas horas iniciais do período ativo no fenótipo comportamental. Embora divergente quanto ao modelo animal e protocolo de RTA utilizado, estudo conduzido com camundongos demonstrou que a omissão do café da manhã provocou atividade diária aumentada durante o período de alimentação restritiva, sendo esta mantida mesmo no retorno à alimentação *ad libitum* (YOON et al., 2012). No estudo de De Goed e colaboradores também foi vista continuidade de alteração no padrão de atividade de animais com alimentação restrita à fase de claro ou de escuro ao fim da alimentação *ad libitum* após a restrição alimentar (DE GOEDE et al., 2020).

A análise não paramétrica também demonstra que a RTA não provoca fragmentação do ritmo/sono, ou seja, não promove a ocorrência de cochilos (maior repouso) na fase ativa e/ou episódios de atividade (maior movimentação) na fase inativa (GONÇALVES et al., 2015a), o que foi visto através da IV (*intradaily variability*). Isso pode estar associado à ampla janela alimentar (16hs), que possibilitando a ingestão de ração também na fase escura promove maior movimentação do animal ainda nesse período. Essa premissa é reforçada pelos resultados encontrados para

as variáveis L5 e M10, as quais são utilizadas para mensurar a fase de repouso e o período de atividade, respectivamente.

Um valor baixo de L5 indica sono com poucos despertares e ritmo menos fragmentado (GONÇALVES et al., 2015b), enquanto valores elevados representam atividade/movimento durante o sono mais despertares noturnos (VAN SOMEREN et al., 1996). Assim, tendo em vista que não houve diferenças entre os valores de L5 para os animais restritos e controles, nosso estudo indica que o protocolo de RTA não promove a ocorrência de maior atividade do animal na sua fase de descanso (clara) o que, conseqüentemente, também não altera o sono do animal durante esse período, visto por meio da IV que continuou estável ou sem fragmentação ao longo da restrição.

Já com base na variável M10, foi demonstrado que a RTA não impacta a qualidade de vida dos animais em restrição, tendo em vista que ela não reduz a atividade/movimentação durante a fase escura. Como já mencionado para alguns parâmetros ao longo desse tópico, isso pode ter explicação no protocolo de restrição empregado, que contendo uma ampla janela para ingestão alimentar (16h), com parte dela localizada no período ativo, possibilita ao animal compensar a atividade ainda nessa fase. Como a atividade noturna dos animais restritos não foi impactada pela restrição temporal do alimento, a amplitude do ritmo (AR) permaneceu semelhante à do grupo controle, demonstrando a continuidade de sua robustez. Normalmente, a redução da amplitude relativa do ritmo atividade-repouso por estar relacionada à redução da capacidade motora ou à dificuldade do sistema de temporização circadiano em ajustar a atividade durante determinada fase (GONÇALVES et al., 2015b). Porém, isso não ocorreu no nosso estudo.

Os resultados obtidos permitem inferir que o protocolo de restrição alimentar, caracterizado pela privação do alimento nas horas iniciais da fase ativa de ratos e amplo período de alimentação intercalando fase escura e clara, promove distúrbios em variáveis nutricionais e fisio-metabólicas. Contudo, o retorno à alimentação *ad libitum* descontinua as alterações observadas, destacadamente para os parâmetros nutricionais e metabólicos, mas, permanecendo algumas alterações referentes ao comportamento locomotor.

Contudo, assumimos algumas limitações como a ausência de investigações moleculares, a exemplo da análise da expressão de genes circadianos em osciladores central e/ou periféricos bem como de genes relacionados ao metabolismo controlados pelos genes circadianos. Estas análises podem fornecer de forma mais robusta

informações sobre as mudanças em nível celular oriundas do protocolo de restrição temporal do alimento utilizado, tanto durante a sua execução quanto após o restabelecimento da alimentação *ad libitum*.

8 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados neste estudo, podemos concluir que a restrição temporal do alimento em ratos provoca distúrbios em parâmetros nutricionais e fisio-metabólicos, com destaque para o peso corporal, a gordura visceral, o ritmo circadiano e padrão de ingestão alimentar, curva circadiana glicêmica e tolerância à glicose, níveis de leptina e insulina e ritmo de atividade locomotora.

Após o restabelecimento do padrão *ad libitum* da alimentação os distúrbios provocados pela RTA são descontinuados, demonstrando que a restrição temporal do alimento durante seis semanas não provoca efeitos incisivos que não são recuperados quando a livre alimentação retorna. Mais investigações são necessárias acerca da modulação de genes circadianos e metabólicos pela restrição temporal do alimento e sua associação com o desenvolvimento de doenças.

REFERÊNCIAS

ABELLÁN, P. Gómez; SANTOS, C. Gómez; MADRID, J. A.; MILAGRO, F. I.; CAMPION, J.; MARTÍNEZ, J. A.; LUJÁN, J. A.; ORDOVÁS, J. Ma; GARAULET, M. Site-specific circadian expression of leptin and its receptor in human adipose tissue. **Nutricion hospitalaria**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1394–1401, 2011. DOI: 10.1590/S0212-16112011000600029.

ABRAHAMSON, Eric E.; MOORE, Robert Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain Research**, [S. l.], v. 916, n. 1–2, p. 172–191, 2001. DOI: 10.1016/S0006-8993(01)02890-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899301028906>.

ACOSTA-GALVAN, Guadalupe; YI, Chun Xia; VAN DER VLIET, Jan; JHAMANDAS, Jack H.; PANULA, Pertti; ANGELES-CASTELLANOS, Manuel; DEL CARMEN BASUALDO, María; ESCOBAR, Carolina; BUIJS, Ruud M. Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 14, p. 5813–5818, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1015551108.

AKASHI, M.; TAKUMI, T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nature structural & molecular biology**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 441–448, 2005.

ALBRECHT, Urs. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. **Neuron**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 246–260, 2012. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.04.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.006>.

ALMOOSAWI, Suzana; VINGELIENE, Snieguole; GACHON, Frederic; VOORTMAN, Trudy; PALLA, Luigi; JOHNSTON, Jonathan D.; VAN DAM, Rob Martinus; DARIMONT, Christian; KARAGOUNIS, Leonidas G. Chronotype: Implications for Epidemiologic Studies on Chrono-Nutrition and Cardiometabolic Health. **Advances in Nutrition**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 30–42, 2019. DOI: 10.1093/advances/nmy070.

ALVES, Eryka Maria dos Santos; DE OLIVEIRA MELO, Nathalia Caroline; OLIVEIRA COSTA, Ana Carolina; MOURA BARBOSA, Humberto De; ARAÚJO, Nathália Cavalcanti de Moraes; DO NASCIMENTO, Elizabeth. Time-restricted feeding in dark phase of circadian cycle and/or westernized diet cause mixed hyperlipidemia in rats. **Nutrición Hospitalaria**, [S. l.], 2021. DOI: 10.20960/nh.03432. Disponível em: <https://www.nutricionhospitalaria.org/articles/03432/show>.

ANDRIKOPOULOS, Sofianos; BLAIR, Amy R.; DELUCA, Nadia; FAM, Barbara C.; PROIETTO, Joseph. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 295, n. 6, p. 1323–1332, 2008. DOI: 10.1152/ajpendo.90617.2008.

ARBLE, Deanna M.; BASS, Joseph; LAPOSKY, Aaron D.; VITATERNA, Martha H.; TUREK, Fred W. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. **Obesity**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 2100–2102, 2009. a. DOI: 10.1038/oby.2009.264.

ARBLE, Deanna M.; BASS, Joseph; LAPOSKY, Aaron D.; VITATERNA, Martha H.; TUREK, Fred W. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. **Obesity**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 2100–2102, 2009. b. DOI: 10.1038/oby.2009.264. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.264>.

BALMFORTH, Anthony J.; GRANT, Peter J.; SCOTT, Eleanor M.; WHEATCROFT, Stephen B.; KEARNEY, Mark T.; STAELS, Bart; MARX, Nikolaus. Inter-subject differences in constitutive expression levels of the clock gene in man. **Diabetes and Vascular Disease Research**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 39–43, 2007.

BARCLAY, Johanna L.; HUSSE, Jana; BODE, Brid; NAUJOKAT, Nadine; MEYER-KOVAC, Judit; SCHMID, Sebastian M.; LEHNERT, Hendrik; OSTER, Henrik. Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. **Sleep, Circadian Rhythms, and Metabolism: The Rhythm of Life**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 1–11, 2012. DOI: 10.1201/b17253.

BARNEA, Maayan; CHAPNIK, Nava; GENZER, Yoni; FROY, Oren. The circadian clock machinery controls adiponectin expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 399, p. 284–287, 2015. DOI: 10.1016/j.mce.2014.10.018.

BERG, Anders H.; COMBS, Terry P.; SCHERER, Philipp E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 84–89, 2002. DOI: 10.1016/S1043-2760(01)00524-0.

BERNARDIS, Lee L.; BELLINGER, Larry L. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 189–287, 1996. DOI: 10.1016/0149-7634(95)00015-1.

BERTHOUD, Hans-Rudolf. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 393–428, 2002. DOI: 10.1016/S0149-7634(02)00014-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763402000143>.

BONNELL, Emily K.; HUGGINS, Catherine E.; HUGGINS, Chris T.; MCCAFFREY, Tracy A.; PALERMO, Claire; BONHAM, Maxine P. Influences on dietary choices

during day versus night shift in shift workers: A mixed methods study. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3390/nu9030193.

BOULOS, Ziad; TERMAN, Michael. Food availability and daily biological rhythms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 119–131, 1980. DOI: 10.1016/0149-7634(80)90010-X.

BRAY, M. S.; RATCLIFFE, W. F.; GRENETT, M. H.; BREWER, R. A.; GAMBLE, K. L.; YOUNG, M. E. Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. **International Journal of Obesity**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 843–852, 2013. DOI: 10.1038/ijo.2012.137.

BROWN, Alexandra J.; PENDERGAST, Julie S.; YAMAZAKI, Shin. Peripheral circadian oscillators. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 327–335, 2019. DOI: 10.1196/annals.1417.005.

BUIJS, Frederik N.; GUZMÁN-RUIZ, Mara; LEÓN-MERCADO, Luis; BASUALDO, Mari Carmen; ESCOBAR, Carolina; KALSBECK, Andries; BUIJS, Ruud M. Suprachiasmatic nucleus interaction with the arcuate nucleus; Essential for organizing physiological rhythms. **eNeuro**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1523/ENEURO.0028-17.2017.

CAMBRAIA, Rosana Passos Beinner. Aspectos psicobiológicos do comportamento alimentar. **Revista de Nutrição**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 217–225, 2004. DOI: 10.1590/s1415-52732004000200008.

CARNEIRO, Breno T. S.; ARAUJO, John F. Food entrainment: Major and recent findings. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 6, n. NOVEMBER 2012, p. 1–6, 2012. DOI: 10.3389/fnbeh.2012.00083.

CARNEIRO, Breno T. S.; FERNANDES, Diego A. C.; MEDEIROS, Caio F. P.; DINIZ, Nathália L.; ARAUJO, John F. Daily anticipatory rhythms of behavior and body temperature in response to glucose availability in rats. **Psychology and Neuroscience**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 191–197, 2012. DOI: 10.3922/j.psns.2012.2.09.

CARNEIRO, Breno Tercio Santos; ARAUJO, John Fontenele. The food-entrainable oscillator: A network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? **Chronobiology International**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 1273–1289, 2009. DOI: 10.3109/07420520903404480.

CECCARINI, G.; MAFFEI, M.; VITTI, P.; SANTINI, F. Fuel homeostasis and locomotor behavior: role of leptin and melanocortin pathways. **Journal of Endocrinological Investigation**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 125–131, 2015. DOI: 10.1007/s40618-014-0225-z.

CHAIX, Amandine; ZARRINPAR, Amir; MIU, Phuong; PANDA, Satchidananda. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 991–1005, 2014. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>.

CHALLET, E. Keeping circadian time with hormones. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [S. l.], v. 17, n. S1, p. 76–83, 2015. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605862838%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/dom.12516%5Cnhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=14631326&id=doi:10.1111%2Fdom.12516&atitle=Keeping+circadian+time+with>.

CHALLET, Etienne. The circadian regulation of food intake. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 393–405, 2019. DOI: 10.1038/s41574-019-0210-x.

CHAUSSE, Bruno; SOLON, Carina; CALDEIRA DA SILVA, Camille C.; MASSELLI DOS REIS, Ivan G.; MANCHADO-GOBATTO, Fúlvia B.; GOBATTO, Claudio A.; VELLOSO, Licio A.; KOWALTOWSKI, Alicia J. Intermittent Fasting Induces Hypothalamic Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency, Low Body Mass and Overeating. **Endocrinology**, [S. l.], v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014. DOI: 10.1210/en.2013-2057.

COOMANS, Claudia P. et al. The suprachiasmatic nucleus controls circadian energy metabolism and hepatic insulin sensitivity. **Diabetes**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 1102–1108, 2013.

COSTA, Ana Carolina Oliveira. **Comportamento alimentar e metabolismo em ratos a partir de mudanças da disponibilidade de alimento e/ou composição dietética**. 2017. [S. l.], 2017. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

COSTA, Ana Carolina Oliveira; ARAÚJO, Nathália Cavalcanti de Moraes; DE SANTANA MUNIZ, Giselia; DE SOUZA, Sandra Lopes; NASCIMENTO, Elizabeth Do. Timed restricted feeding in adult rats using standard chow or Western diet causes different response to food behavior. **Biological Rhythm Research**, [S. l.], p. 1–25, 2021. DOI: 10.1080/09291016.2021.1882143. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09291016.2021.1882143>.

CUI, L. N.; DYBALL, R. E. Synaptic input from the retina to the suprachiasmatic nucleus changes with the light-dark cycle in the Syrian hamster. **The Journal of Physiology**, [S. l.], v. 497, n. 2, p. 483–493, 1996. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021782. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1996.sp021782>.

DAI, Jiapei; SWAAB, Dick F.; BUIJS, Ruud M. Distribution of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) fibers in the human hypothalamus with special emphasis on suprachiasmatic nucleus efferent projections. **The Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 383, n. 4, p. 397–414, 1997. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970714)383:4<397::AID-CNE1>3.0.CO;2-Y. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970714\)383:4%3C397::AID-CNE1%3E3.0.CO;2-Y](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9861(19970714)383:4%3C397::AID-CNE1%3E3.0.CO;2-Y).

DAMIOLA, F.; LE MINLI, N.; PREITNER, N.; KORNMANN, B.; FLEURY-OLELA, F.; SCHIBLER, U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes and Development**, [S. l.], v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 2000. DOI: 10.1101/gad.183500.

DE ARAUJO, Leonardo D. et al. Restricted feeding schedules modulate in a different manner the expression of clock genes in rat hypothalamic nuclei. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. DEC, 2016. DOI: 10.3389/fnins.2016.00567.

DE CASTRO, John M. Circadian rhythms of the spontaneous meal pattern, macronutrient intake, and mood of humans. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 437–446, 1987. DOI: 10.1016/0031-9384(87)90028-X.

DE GOEDE, Paul; FOPPEN, Ewout; RITSEMA, Wayne I. G. R.; KORPEL, Nikita L.; YI, Chun Xia; KALSBECK, Andries. Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Rats, but Only When in Line With the Circadian Timing System. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00554.

DE GOEDE, Paul; HELLINGS, Tom P.; COOPMANS, Tom V.; RITSEMA, Wayne I. G. R.; KALSBECK, Andries. After-Effects of Time-Restricted Feeding on Whole-Body Metabolism and Gene Expression in Four Different Peripheral Tissues. **Obesity**, [S. l.], v. 28, n. S1, p. S68–S80, 2020. DOI: 10.1002/oby.22830.

DE GOEDE, Paul; SEN, Satish; SU, Yan; FOPPEN, Ewout; POIREL, Vincent Joseph; CHALLET, Etienne; KALSBECK, Andries. An ultradian feeding schedule in rats affects metabolic gene expression in liver, brown adipose tissue and skeletal muscle with only mild effects on circadian clocks. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 10, 2018. DOI: 10.3390/ijms19103171.

DÍAZ-MUÑOZ, Mauricio; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, Olivia; BÁEZ-RUIZ, Adrián; MARTÍNEZ-CABRERA, Gema; SOTO-ABRAHAM, María V.; ÁVILA-CASADO, María C.; LARRIVA-SAHAD, Jorge. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. **Comparative Hepatology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 5, 2010. DOI: 10.1186/1476-5926-9-5.

DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. **The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks**. [s.l.: s.n.]. v. 72 DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

DÍEZ-NOGUERA, Antoni. **El Temps: the chronobiologist's program**. , 2013. Disponível em: <http://www.el-temps.com>.

DUEZ, Hélène; STAELS, Bart. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. **Diabetes and Vascular Disease Research**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 82–88, 2008.

EGECIOGLU, Emil; SKIBICKA, Karolina P.; HANSSON, Caroline; ALVAREZ-CRESPO, Mayte; ANDERS FRIBERG, P.; JERLHAG, Elisabet; ENGEL, Jörgen A.; DICKSON, Suzanne L. Hedonic and incentive signals for body weight control. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 141–151, 2011. DOI: 10.1007/s11154-011-9166-4.

FEILLET, Céline A.; MENDOZA, Jorge; ALBRECHT, Urs; PÉVET, Paul; CHALLET, Etienne. Forebrain oscillators ticking with different clock hands. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 209–221, 2008. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.09.010.

FEILLET, Céline A.; RIPPERGER, Jürgen A.; MAGNONE, Maria Chiara; DULLOO, Abdul; ALBRECHT, Urs; CHALLET, Etienne. Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice. **Current Biology**, [S. l.], v. 16, n. 20, p. 2016–2022, 2006. DOI: 10.1016/j.cub.2006.08.053.

FLANAGAN, Alan; BECHTOLD, David A.; POT, Gerda K.; JOHNSTON, Jonathan D. Chrono-nutrition: From molecular and neuronal mechanisms to human epidemiology and timed feeding patterns. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], n. October, p. 1–20, 2020. DOI: 10.1111/jnc.15246.

FLIER, Jeffrey S. Starvation in the Midst of Plenty: Reflections on the History and Biology of Insulin and Leptin. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 1–16, 2019. DOI: 10.1210/er.2018-00179.

FROY, Oren. Metabolism and circadian rhythms - Implications for obesity. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 1–24, 2010. DOI: 10.1210/er.2009-0014.

FULLER, Patrick M.; LU, Jun; SAPER, Clifford B. Differential Rescue of Light- and Food-Entrainable Circadian Rhythms. **Nature**, [S. l.], v. 8, n. October, p. 1074–1078, 2008.

GARAULET, M.; ORDOVÁS, J. M.; MADRID, J. A. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. **International Journal of Obesity**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 1667–1683, 2010. DOI: 10.1038/ijo.2010.118.

GARAULET, Marta; QIAN, Jingyi; FLOREZ, Jose C.; ARENDT, Josephine; SAXENA, Richa; SCHEER, Frank A. J. L. Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 192–204, 2020. DOI: 10.1016/j.tem.2019.11.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.11.011>.

GARDNER, George F.; FELDMAN, Jerry F. The FRQ locus in *Neurospora crassa*: a key element in circadian clock organization. **Genetics**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 877–886, 1980.

GAVRILA, Alina; PENG, C. K.; CHAN, Jean L.; MIETUS, Joseph E.; GOLDBERGER, Ary L.; MANTZOROS, Christos S. Diurnal and Ultradian Dynamics of Serum Adiponectin in Healthy Men: Comparison with Leptin, Circulating Soluble Leptin Receptor, and Cortisol Patterns. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 88, n. 6, p. 2838–2843, 2003. DOI: 10.1210/jc.2002-021721.

GONÇALVES, B. S. B.; ADAMOWICZ, Taísa; LOUZADA, Fernando Mazzilli; MORENO, Claudia Roberta; ARAUJO, John Fontenele. A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. **Sleep Medicine Reviews**, [S. l.], v. 20, p. 84–91, 2015. a. DOI: 10.1016/j.smrv.2014.06.002.

GONÇALVES, Bruno S. B.; CAVALCANTI, Paula R. A.; TAVARES, Gracilene R.; CAMPOS, Tania F.; ARAUJO, John F. Nonparametric methods in actigraphy: An update. **Sleep Science**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 158–164, 2014. DOI: 10.1016/j.slsci.2014.09.013.

GONÇALVES, BSB; ADAMOWICZ, Taísa; LOUZADA, Fernando Mazzilli; MORENO, Claudia Roberta; ARAUJO, John Fontenele. A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. **Sleep Medicine Reviews**, [S. l.], v. 20, p. 84–91, 2015. b. DOI: 10.1016/j.smrv.2014.06.002.

GOOLEY, Joshua J. Circadian regulation of lipid metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 440–450, 2016. DOI: 10.1017/S0029665116000288.

GOOLEY, Joshua J.; SCHOMER, Ashley; SAPER, Clifford B. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 398–407, 2006. DOI: 10.1038/nn1651.

GUAN, Dongyin; LAZAR, Mitchell A. Interconnections between circadian clocks and metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 131, n. 15, 2021. DOI: 10.1172/JCI148278.

GUILLAUMOND, Fabienne; DARDENTE, Hugues; GUIGUÈRE, Vincent; CERMAKIAN, Nicolas. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **Journal of biological rhythms**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 391–403, 2005.

HARNEY, Dylan J.; CIELESH, Michelle; CHU, Renee; COOKE, Kristen C.; JAMES, David E.; STÖCKLI, Jacqueline; LARANCE, Mark. Proteomics analysis of adipose depots after intermittent fasting reveals visceral fat preservation mechanisms. **Cell Reports**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 108804, 2021. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108804.

HASTINGS, Michael H.; REDDY, Akhilesh B.; MAYWOOD, Elizabeth S. A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 649–661, 2003. DOI: 10.1038/nrn1177.

HATORI, Megumi et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 848–860, 2012. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.019.

HIRAYAMA, Masatoshi; MURE, Ludovic S.; PANDA, Satchidananda. Circadian regulation of energy intake in mammals. **Current Opinion in Physiology**, [S. l.], v. 5, p. 141–148, 2018. DOI: 10.1016/j.cophys.2018.11.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.11.002>.

HOLDERBAUM, Mariana; CASAGRANDE, Daniela Schaan; SUSSENBACH, Samanta; BUSS, Caroline. Effects of very low calorie diets on liver size and weight loss in the preoperative period of bariatric surgery: a systematic review. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 237–244, 2018. DOI: 10.1016/j.soard.2017.09.531.

HONMA, Ken-Ichi; HONMA, Sato; HIROSHIGE, Tsutomu. Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 767–774, 1987. DOI: 10.1016/0031-9384(87)90281-2.

IZZI-ENGBEAYA, Chioma et al. Effects of corticosterone within the hypothalamic arcuate nucleus on food intake and body weight in male rats. **Molecular Metabolism**, [S. l.], v. 36, p. 100972, 2020. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.02.015.

JOHNSTON, Jonathan D.; ORDOVÁS, José M.; SCHEER, Frank A.; TUREK, Fred W. Circadian rhythms, metabolism, and chrononutrition in rodents and humans.

Advances in Nutrition, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 399–406, 2016. DOI: 10.3945/an.115.010777.

KADOWAKI, Takashi; YAMAUCHI, Toshimasa; KUBOTA, Naoto. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 582, n. 1, p. 74–80, 2008. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.11.070.

KENNY, Paul J. Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. **Neuron**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 664–679, 2011. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016>.

KIEHN, Jana Thabea; TSANG, Anthony H.; HEYDE, Isabel; LEINWEBER, Brinja; KOLBE, Isa; LELIAVSKI, Alexei; OSTER, Henrik. Circadian rhythms in adipose tissue physiology. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 383–427, 2017. DOI: 10.1002/cphy.c160017.

KIM, Daeun; HANZAWA, Fumiaki; SUN, Shumin; LAURENT, Thomas; IKEDA, Saiko; UMEKI, Miki; MOCHIZUKI, Satoshi; ODA, Hiroaki. Delayed Meal Timing, a Breakfast Skipping Model, Increased Hepatic Lipid Accumulation and Adipose Tissue Weight by Disintegrating Circadian Oscillation in Rats Fed a High-Cholesterol Diet. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fnut.2021.681436.

KLEINRIDDERS, André; FERRIS, Heather A.; CAI, Weikang; KAHN, C. Ronald. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. **Diabetes**, [S. l.], v. 63, n. 7, p. 2232–2243, 2014. DOI: 10.2337/db14-0568.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 9, p. 2112–2116, 1971. DOI: 10.1073/pnas.68.9.2112. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.68.9.2112>.

KUCKUCK, Susanne; VAN DER VALK, Eline S.; SCHEURINK, Anton J. W.; VAN DER VOORN, Bibian; IYER, Anand M.; VISSER, Jenny A.; DELHANTY, Patric J. D.; VAN DEN BERG, Sjoerd A. A.; VAN ROSSUM, Elisabeth F. C. Glucocorticoids, stress and eating: The mediating role of appetite-regulating hormones. **Obesity Reviews**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1111/obr.13539.

KULLMANN, Stephanie; KLEINRIDDERS, André; SMALL, Dana M.; FRITSCHÉ, Andreas; HÄRING, Hans-Ulrich; PREISSEL, Hubert; HENI, Martin. Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 524–534, 2020. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30113-3.

LA FLEUR, S. E. Daily rhythms in glucose metabolism: Suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 315–322, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2826.2003.01019.x.

LA FLEUR, Susanne E. **THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS GENERATED RHYTHM IN BLOOD GLUCOSE A role for the autonomic nervous system**. [s.l.: s.n.].

LA FLEUR, Susanne E.; KALSBECK, Andries; WORTEL, Joke; FEKKES, Madelon L.; BUIJS, Ruud M. A daily rhythm in glucose tolerance: A role for the suprachiasmatic nucleus. **Diabetes**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1237–1243, 2001. DOI: 10.2337/diabetes.50.6.1237.

LANDRY, G. J.; SIMON, M. M.; WEBB, I. C.; MISTLBERGER, R. E. Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 290, n. 6, p. 1527–1535, 2006. DOI: 10.1152/ajpregu.00874.2005.

LE FLOCH, J. P.; ESCUYER, P.; BAUDIN, E.; BAUDON, D.; PERLEMUTER, L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 172–175, 1990. DOI: 10.2337/diacare.13.2.172.

LEHMAN. Circadian Rhythmicity Restored by Neural Transplant. Immunocytochemical Characterization of the Graft and Its Integration with the Host Brain. **The journal of neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 1626–1638, 1987.

LENARD, Natalie R.; BERTHOUD, Hans-Rudolf. Central and Peripheral Regulation of Food Intake and Physical Activity: Pathways and Genes. **Obesity**, [S. l.], v. 16, n. S3, p. S11–S22, 2008. DOI: 10.1038/oby.2008.511. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2008.511>.

LEUNG, Gloria K. W.; HUGGINS, Catherine E.; BONHAM, Maxine P. Effect of meal timing on postprandial glucose responses to a low glycemic index meal: A crossover trial in healthy volunteers. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 465–471, 2019. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.11.010.

LEVI, Francis; SCHIBLER, Ueli. Circadian Rhythms: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 593–628, 2007. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208.

LEWIS, Mark; PHILLIPS, Madeleine; SLAVOTINEK, John; KOW, Lilian; THOMPSON, Campbell; TOOULI, Jim. Change in Liver Size and Fat Content after Treatment with Optifast®/SUP® Very Low Calorie Diet. **Obesity Surgery**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 697–701, 2006. DOI: 10.1381/096089206777346682.

LONGO, Valter D.; PANDA, Satchidananda; ADAMELLO, Via; JOLLA, La. Fasting Circadian Rhythms Time restricted eating. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1048–1059, 2017. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.06.001.Fasting.

LUTTER, Michael; NESTLER, Eric J. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. **The Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 139, n. 3, p. 629–632, 2009. DOI: 10.3945/jn.108.097618.

MANOOGIAN, Emily N. C.; PANDA, Satchidananda. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], v. 39, p. 59–67, 2017. DOI: 10.1016/j.arr.2016.12.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.006>.

MENDOZA, Jorge. Eating Rewards the Gears of the Clock. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 299–311, 2019. a. DOI: 10.1016/j.tem.2019.03.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.03.001>.

MENDOZA, Jorge. Food intake and addictive-like eating behaviors: Time to think about the circadian clock(s). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 106, p. 122–132, 2019. b. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.07.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.003>.

MENDOZA, Jorge; GOURMELEN, Sylviane; DUMONT, Stephanie; SAGE-CIOCCA, Dominique; PÉVET, Paul; CHALLET, Etienne. Setting the main circadian clock of a diurnal mammal by hypocaloric feeding. **Journal of Physiology**, [S. l.], v. 590, n. 13, p. 3155–3168, 2012. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.230300.

MIÑANA-SOLIS, M. C.; ÁNGELES-CASTELLANOS, M.; FEILLET, C.; PÉVET, P.; CHALLET, E.; ESCOBAR, Carolina. Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat. **Chronobiology International**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 808–820, 2010. DOI: 10.1080/07420520903044240.

MISTLBERGER, Ralph E. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 104, n. 4, p. 535–545, 2011. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.04.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.015>.

MITCHELL, Caitlin S.; BEGG, Denovan P. The regulation of food intake by insulin in the central nervous system. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 33, n. 4, 2021. a. DOI: 10.1111/jne.12952.

MITCHELL, Caitlin S.; BEGG, Denovan P. The regulation of food intake by insulin in the central nervous system. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 33, n. 4, 2021. b. DOI: 10.1111/jne.12952.

MLEKUSCH, W.; PALETTA, B.; TRUPPE, W.; PASCHKE, E.; GRIMUS, R. Plasma Concentrations of Glucose, Corticosterone, Glucagon and Insulin and Liver Content of Metabolic Substrates and Enzymes during Starvation and Additional Hypoxia in the Rat. **Hormone and Metabolic Research**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 612–614, 1981. DOI: 10.1055/s-2007-1019352.

MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 445–462, 2012. DOI: 10.1146/annurev-neuro-060909-153128.

MORGAN, Linda M.; SHI, Jiang-Wen; HAMPTON, Shelagh M.; FROST, Gary. Effect of meal timing and glycaemic index on glucose control and insulin secretion in healthy volunteers. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 108, n. 7, p. 1286–1291, 2012. DOI: 10.1017/S0007114511006507.

MORIYA, Takahiro et al. The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1447–1460, 2009. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06697.x.

MOYNIHAN RAMSEY, Kathryn; MARCHEVA, Biliana; KOHSAKA, Akira; BASS, Joseph. The Clockwork of Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 219–240, 2007. DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093546.

NASCIMENTO, Elizabeth; GUZMAN-QUEVEDO, Omar; DELACOURT, Nellie; DA SILVA ARAGÃO, Raquel; PEREZ-GARCIA, Georgina; DE SOUZA, Sandra Lopes; MANHÃES-DE-CASTRO, Raul; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, Francisco; KAEFFER, Bertrand. 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**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056231.

NERY, Cybelle da Silva; PINHEIRO, Isabeli Lins; MUNIZ, Gisélia de Santana; VASCONCELOS, Diogo Antônio Alves De; FRANÇA, Sabrina Pereira De; NASCIMENTO, Elizabeth Do. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 49–55, 2011. DOI: 10.1590/S1517-86922011000100010.

NIGRO, Ersilia; SCUDIERO, Olga; MONACO, Maria Ludovica; PALMIERI, Alessia; MAZZARELLA, Gennaro; COSTAGLIOLA, Ciro; BIANCO, Andrea; DANIELE,

Aurora. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–14, 2014. DOI: 10.1155/2014/658913.

OISHI, Katsutaka; ITOH, Nanako. Disrupted daily light-dark cycle induces the expression of hepatic gluconeogenic regulatory genes and hyperglycemia with glucose intolerance in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 432, n. 1, p. 111–115, 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.076. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.076>.

OLIVEIRA, Daniela Aquino; ARAÚJO, Nathália Cavalcanti de Moraes; FREIRE, Alexandra Rabello; ALBUQUERQUE, Giwellington Silva; MUNIZ, Giselia de Santana; NASCIMENTO, Elizabeth Do. Delay first active-phase meal, breakfast-skipping model, increases the risk of metabolic disorders in females rats. **Biological Rhythm Research**, [S. l.], p. 1–16, 2021. DOI: 10.1080/09291016.2021.1973203.

OOSTERMAN, Johanneke E.; KALSBECK, Andries; LA FLEUR, Susanne E.; BELSHAM, Denise D. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 308, n. 5, p. R337–R350, 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00322.2014.

OPPERHUIZEN, Anne Loes; WANG, Dawei; FOPPEN, Ewout; JANSEN, Remi; BOUDZOVITCH-SUROVTSEVA, Olga; DE VRIES, Janneke; FLIERS, Eric; KALSBECK, Andries. Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 44, n. 10, p. 2795–2806, 2016. DOI: 10.1111/ejn.13377.

OROZCO-SÓLIS, Ricardo; LOPES DE SOUZA, Sandra; BARBOSA MATOS, Rhowena Jane; GRIT, Isabelle; LE BLOCH, Jerome; NGUYEN, Patrick; MANHÃES DE CASTRO, Raul; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, Francisco. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 481–492, 2009. DOI: 10.1016/j.physbeh.2008.11.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.11.016>.

OUYANG, Y.; ANDERSSON, C. R.; KONDO, T.; GOLDEN, S. S.; JOHNSON, C. H. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 95, n. 15, p. 8660–8664, 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.15.8660. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.15.8660>.

PAGE, Amanda J.; CHRISTIE, Stewart; SYMONDS, Erin; LI, Hui. Circadian regulation of appetite and time restricted feeding: Food intake and time restricted

feeding. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 220, n. December 2019, p. 112873, 2020. DOI: 10.1016/j.physbeh.2020.112873. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112873>.

PAREDES, Sílvia; RIBEIRO, Laura. Cortisol: the villain in Metabolic Syndrome? **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 84–92, 2014. DOI: 10.1590/1806-9282.60.01.017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302014000100084&lng=en&tlng=en.

PATTON, Danica F.; MISTLBERGER, Ralph E. Circadian adaptations to meal timing: Neuroendocrine mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 7 OCT, p. 1–14, 2013. DOI: 10.3389/fnins.2013.00185.

PAUL, Sarika; HANNA, Lydia; HARDING, Court; HAYTER, Edward A.; WALMSLEY, Lauren; BECHTOLD, David A.; BROWN, Timothy M. Output from VIP cells of the mammalian central clock regulates daily physiological rhythms. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1453, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15277-x. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-15277-x>.

PICKEL, Lauren; SUNG, Hoon Ki. Feeding Rhythms and the Circadian Regulation of Metabolism. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 7, n. April, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3389/fnut.2020.00039.

PICÓ, Catalina; SÁNCHEZ, Juana; OLIVER, Paula; PALOU, Andreu. Leptin Production by the Stomach Is Up-Regulated in Obese (fa/fa) Zucker Rats. **Obesity Research**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 932–938, 2002. DOI: 10.1038/oby.2002.127.

POGGIOGALLE, Eleonora; JAMSHED, Humaira; PETERSON, Courtney M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. **Metabolism**, [S. l.], v. 84, p. 11–27, 2018. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.11.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049517303293>.

POSSIDENTE, Bernard; BIRNBAUM, Shari. Circadian rhythms for food and water consumption in the mouse, *Mus musculus*. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 657–660, 1979. DOI: 10.1016/0031-9384(79)90226-9.

RAMÍREZ-PLASCENCIA, Oscar Daniel; SADERI, Nadia; CÁRDENAS-ROMERO, Skarleth; GARCÍA-GARCÍA, Fabio; PEÑA-ESCUADERO, Carolina; FLORES-SANDOVAL, Omar; AZUARA-ÁLVAREZ, Lucia; BÁEZ-RUIZ, Adrián; SALGADO-DELGADO, Roberto. Leptin and adiponectin regulate the activity of nuclei involved in sleep-wake cycle in male rats. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 16, 2022. DOI: 10.3389/fnins.2022.907508.

RIBEIRO, Ana C.; CECCARINI, Giovanni; DUPRÉ, Christophe; FRIEDMAN, Jeffrey M.; PFAFF, Donald W.; MARK, Allyn L. Contrasting Effects of Leptin on Food Anticipatory and Total Locomotor Activity. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. e23364, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023364.

ROBERTO REFINETTI. **Circadian physiology**. 3ª ed. [s.l.: s.n.].

ROCHA, Lanni Sarmiento Da; DE MATOS, Rhowena Jane Barbosa; DE SOUZA, Julliet Araújo; COSTA, Ana Carolina Oliveira; LOPES DE SOUZA, Sandra; MUNIZ, Gisélia de Santana; NASCIMENTO, Elizabeth Do. Daytime increase in caloric intake without change in total 24-h caloric intake can increase adiposity but not total bodyweight in rats with inverted feeding pattern. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [S. l.], v. 42, n. 9, p. 931–940, 2017. DOI: 10.1139/apnm-2016-0536. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2016-0536>.

ROSSI, Mark A.; STUBER, Garret D. Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 42–56, 2018. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021>.

SALGADO-DELGADO, Roberto; ANGELES-CASTELLANOS, Manuel; SADARI, Nadia; BUIJS, Ruud M.; ESCOBAR, Carolina. Food Intake during the Normal Activity Phase Prevents Obesity and Circadian Desynchrony in a Rat Model of Night Work. **Endocrinology**, [S. l.], v. 151, n. 3, p. 1019–1029, 2010. DOI: 10.1210/en.2009-0864. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/151/3/1019/2456529>.

SÁNCHEZ, Juana; OLIVER, Paula; PICÓ, Catalina; PALOU, Andreu. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 448, n. 5, 2004. DOI: 10.1007/s00424-004-1283-4.

SHIMIZU, Hatsumi; HANZAWA, Fumiaki; KIM, Daeun; SUN, Shumin; LAURENT, Thomas; UMEKI, Miki; IKEDA, Saiko; MOCHIZUKI, Satoshi; ODA, Hiroaki. Delayed first active-phase meal, a breakfastskipping model, led to increased body weight and shifted the circadian oscillation of the hepatic clock and lipid metabolism-related genes in rats fed a high-fat diet. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 10, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206669.

SHIMIZU, Hiroshi; ARIMA, Hiroshi; WATANABE, Minemori; GOTO, Motomitsu; BANNO, Ryoichi; SATO, Ikuko; OZAKI, Nobuaki; NAGASAKI, Hiroshi; OISO, Yutaka. Glucocorticoids Increase Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling in the Arcuate Nucleus of Rats. **Endocrinology**, [S. l.], v. 149, n. 9, p. 4544–4553, 2008. DOI: 10.1210/en.2008-0229.

SILVA, Ana Marina Dutra Ferreira Da; COSTA, Ronne Hedili Silva; SILVA, Suyana Meneses; BESSA, Glauber Henrique Freitas; SIQUEIRA, Bernardo de Lima; RODRIGUES, Heitor Maia; ARAÚJO, John Fontenele; GODEIRO JURNIOR, Clécio de Oliveira. Uso da actigrafia na avaliação do ritmo atividade-reposo em pacientes com doença de Parkinson. **Rev. bras. neurol**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 5–11, 2017.

Disponível em:

<https://revistas.ufrj.br/index.php/rbn/article/view/12301/pdf%0Ahttp://fi-admin.bvsalud.org/document/view/9quap>.

SIMON, C.; FOLLENIUS, M.; BRANDENBERGER, G. Postprandial oscillations of plasma glucose, insulin and C-peptide in man. **Diabetologia**, [S. l.], v. 30, n. 10, 1987. DOI: 10.1007/BF00275742.

SOUZA, Julliet Araújo. **Efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a imunorreatividade da period 1 nos núcleos supraquiasmático e arqueado**. 2014. [S. l.], 2014.

SPIEGEL, Karine; LEPROULT, Rachel; L'HERMITE-BALÉRIAUX, Mireille; COPINSCHI, Georges; PENEV, Plamen D.; VAN CAUTER, Eve. Leptin Levels Are Dependent on Sleep Duration: Relationships with Sympathovagal Balance, Carbohydrate Regulation, Cortisol, and Thyrotropin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 89, n. 11, p. 5762–5771, 2004. DOI: 10.1210/jc.2004-1003.

STENVERS, Dirk Jan; SCHEER, Frank A. J. L.; SCHRAUWEN, Patrick; LA FLEUR, Susanne E.; KALSBECK, Andries. Circadian clocks and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 75–89, 2019. DOI: 10.1038/s41574-018-0122-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0122-1>.

STEPHAN, F. K. The “Other” Circadian System: Food as a Zeitgeber. **Journal of Biological Rhythms**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 284–292, 2002. DOI: 10.1177/074873040201700402.

STEPHAN, Friedrich K.; SWANN, Jennifer M.; SISK, Cheryl L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. **Behavioral and Neural Biology**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 545–554, 1979. DOI: 10.1016/S0163-1047(79)90332-7.

STRATMANN, Markus; SCHIBLER, Ueli. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. **Journal of Biological Rhythms**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 494–506, 2006. DOI: 10.1177/0748730406293889.

SUYAMA, Shigetomo; MAEKAWA, Fumihiko; MAEJIMA, Yuko; KUBOTA, Naoto; KADOWAKI, Takashi; YADA, Toshihiko. Glucose level determines excitatory or

inhibitory effects of adiponectin on arcuate POMC neuron activity and feeding. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 30796, 2016. DOI: 10.1038/srep30796.

TACAD, Debra K. M.; TOVAR, Ashley P.; RICHARDSON, Christine E.; HORN, William F.; KEIM, Nancy L.; KRISHNAN, Giri P.; KRISHNAN, Sridevi. Satiety Associated with Calorie Restriction and Time-Restricted Feeding: Central Neuroendocrine Integration. **Advances in Nutrition**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1093/advances/nmac011.

TAHARA, Y.; SHIBATA, S. **Chronobiology and nutrition**. [s.l.] : IBRO, 2013. v. 253 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.049>.

TAHARA, Yu; HIRAO, Akiko; MORIYA, Takahiro; KUDO, Takashi; SHIBATA, Shigenobu. Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2::Luc mice. **Journal of Biological Rhythms**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 9–18, 2010. DOI: 10.1177/0748730409352782.

TAKAHASHI, Joseph S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 164–179, 2017. DOI: 10.1038/nrg.2016.150. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.150>.

TAKAHASHI, Joseph S.; HONG, Hee Kyung; KO, Caroline H.; MCDEARMON, Erin L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 764–775, 2008. DOI: 10.1038/nrg2430.

VAN CAUTER, E.; BLACKMAN, J. D.; ROLAND, D.; SPIRE, J. P.; REFETOFF, S.; POLONSKY, K. S. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 934–942, 1991. DOI: 10.1172/JCI115396.

VAN ESSEVELDT, Lisette K. E.; LEHMAN, Michael N.; BOER, Gerard J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. **Brain Research Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 34–77, 2000. DOI: 10.1016/S0165-0173(00)00025-4.

VAN SOMEREN, Eus J. W.; HAGEBEUK, Eveline E. O.; LIJZENGA, Cees; SCHELTENS, Philip; DE ROOIJ, Sophie E. J. A.; JONKER, Cees; POT, Anne-Margriet; MIRMIRAN, Majid; SWAAB, Dick F. Circadian rest—activity rhythm disturbances in alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 259–270, 1996. DOI: 10.1016/0006-3223(95)00370-3.

VITATERNA, M. et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. **Science**, [S. l.], v. 264, n. 5159, p. 719–725, 1994. DOI:

10.1126/science.8171325. Disponível em:
<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.8171325>.

VOLLMERS, Christopher; GILL, Shubhroz; DITACCHIO, Luciano; PULIVARTHY, Sandhya R.; LE, Hiep D.; PANDA, Satchidananda. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 50, p. 21453–21458, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0909591106.

WATTS, Alan G.; SWANSON, Larry W. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 258, n. 2, p. 230–252, 1987. DOI: 10.1002/cne.902580205. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.902580205>.

WHITE, B. D.; DEAN, R. G.; MARTIN, R. J. An Association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increased food intake. **Nutritional Neuroscience**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 173–182, 1998. DOI: 10.1080/1028415X.1998.11747227.

WHITTON, Alexis E.; MEHTA, Malavika; IRONSIDE, Manon L.; MURRAY, Greg; PIZZAGALLI, Diego A. Evidence of a diurnal rhythm in implicit reward learning. **Chronobiology International**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 1104–1114, 2018. DOI: 10.1080/07420528.2018.1459662. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1459662>.

WILLIAM T. FRIEDEWALD; LEVY, Robert I.; FREDRICKSON, Donald S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

WITTING, W.; KWA, I. H.; EIKELENBOOM, P.; MIRMIRAN, M.; SWAAB, D. F. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 563–572, 1990. DOI: 10.1016/0006-3223(90)90523-5.

YAO, Xiangyu; HEIDEBRECHT, Benjamin L.; CHEN, Jing; TYSON, John J. Mathematical analysis of robustness of oscillations in models of the mammalian circadian clock. **PLOS Computational Biology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. e1008340, 2022. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1008340.

YI, Chun-Xia et al. Glucocorticoid Signaling in the Arcuate Nucleus Modulates Hepatic Insulin Sensitivity. **Diabetes**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 339–345, 2012. DOI: 10.2337/db11-1239.

YOON, Ji-Ae; HAN, Dong-Hee; NOH, Jong-Yun; KIM, Mi-Hee; SON, Gi Hoon; KIM, Kyungjin; KIM, Chang-Ju; PAK, Youngmi Kim; CHO, Sehyung. Meal Time Shift Disturbs Circadian Rhythmicity along with Metabolic and Behavioral Alterations in Mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e44053, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044053.

YOSHIDA, Chika; SHIKATA, Nahoko; SEKI, Shinobu; KOYAMA, Naoto; NOGUCHI, Yasushi. Early nocturnal meal skipping alters the peripheral clock and increases lipogenesis in mice. **Nutrition and Metabolism**, [S. l.], v. 9, 2012. DOI: 10.1186/1743-7075-9-78.

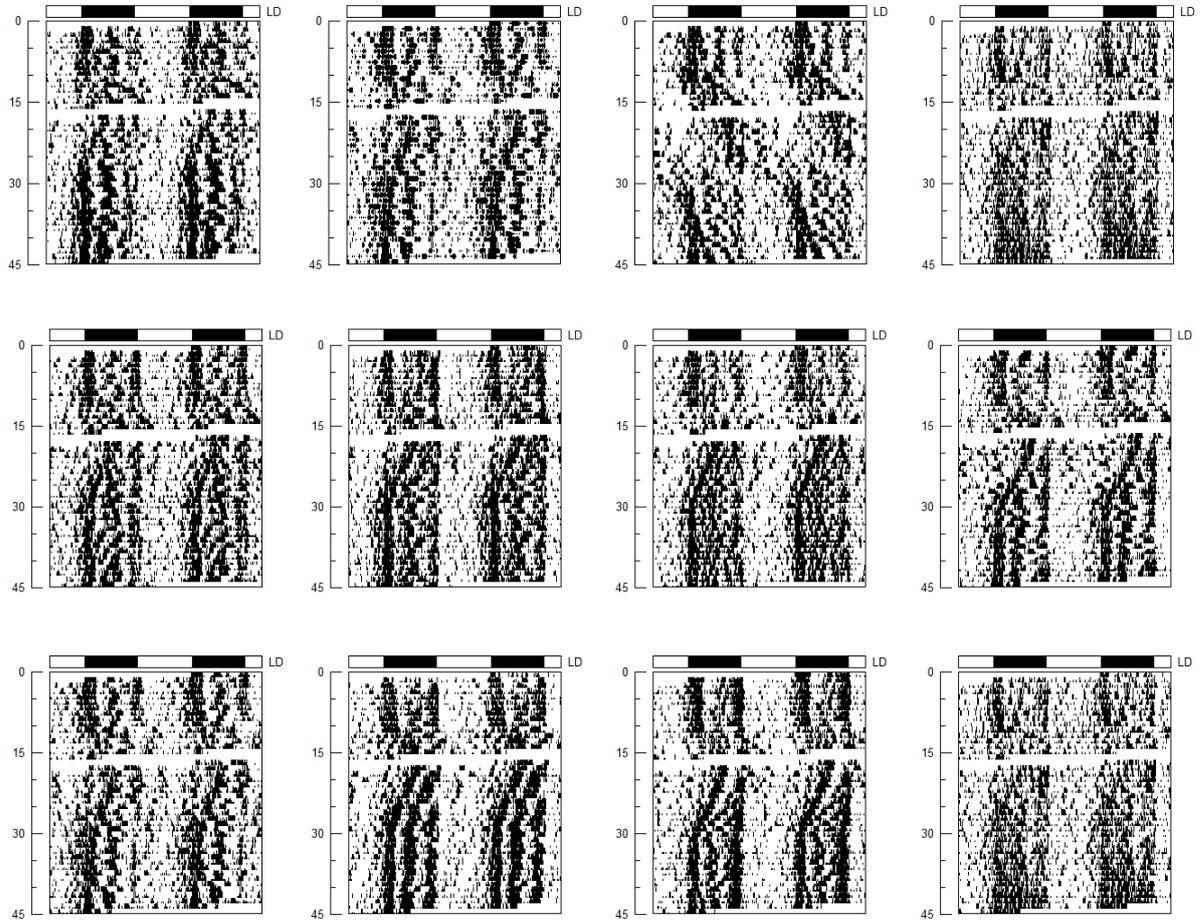
ZHANG, Yiyi; PROENCA, Ricardo; MAFFEI, Margherita; BARONE, Marisa; LEOPOLD, Lori; FRIEDMAN, Jeffrey M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, [S. l.], v. 372, n. 6505, p. 425–432, 1994. DOI: 10.1038/372425a0.

ZHAO, Zhi-Jun; ZHU, Qiao-Xia; CHEN, Ke-Xin; WANG, Yu-Kun; CAO, Jing. Energy Budget, Behavior and Leptin in Striped Hamsters Subjected to Food Restriction and Refeeding. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. e54244, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054244.

ZHONG, Li Xin et al. Circadian misalignment alters insulin sensitivity during the light phase and shifts glucose tolerance rhythms in female mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 12, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0225813.

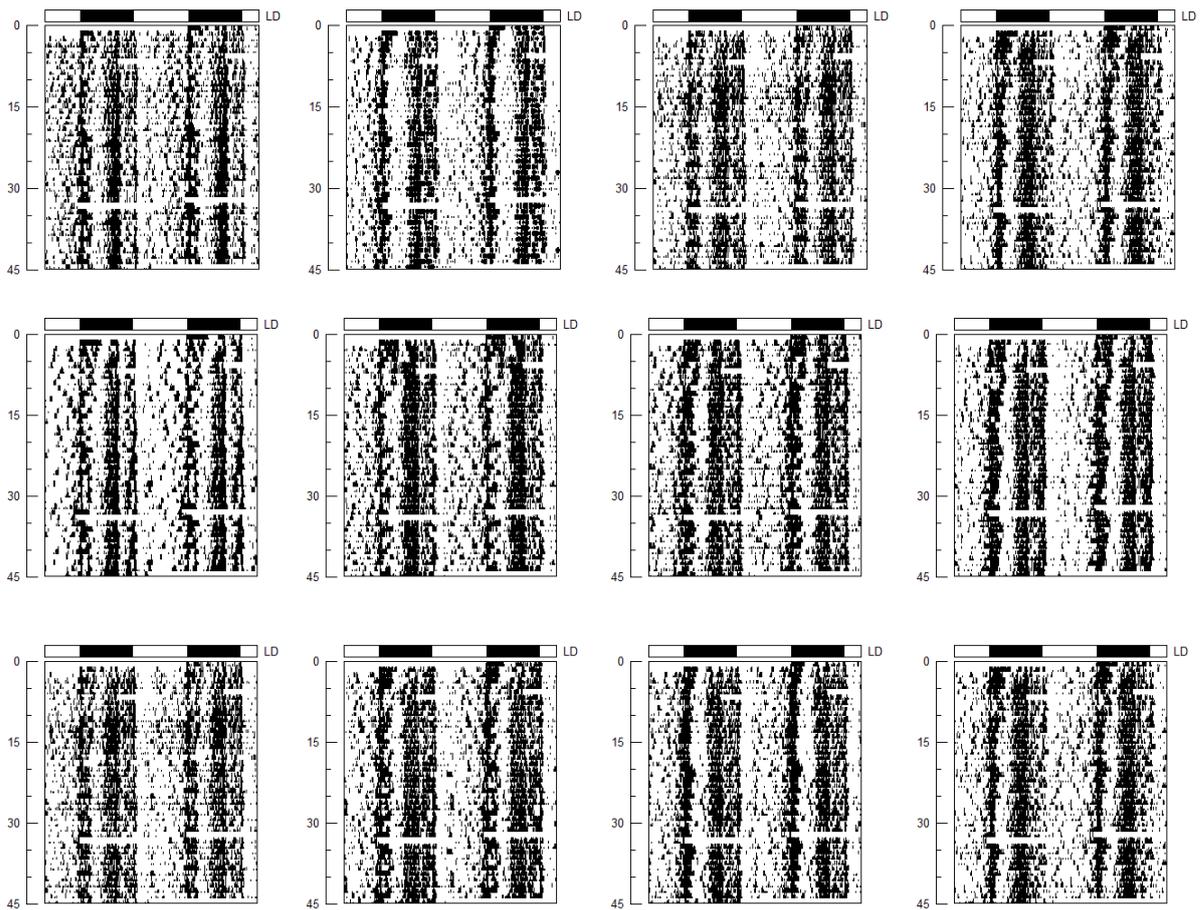
**APÊNDICE A - ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: OFERTA *AD LIBITUM*
DA ALIMENTAÇÃO**

Grupo CONTROLE 1



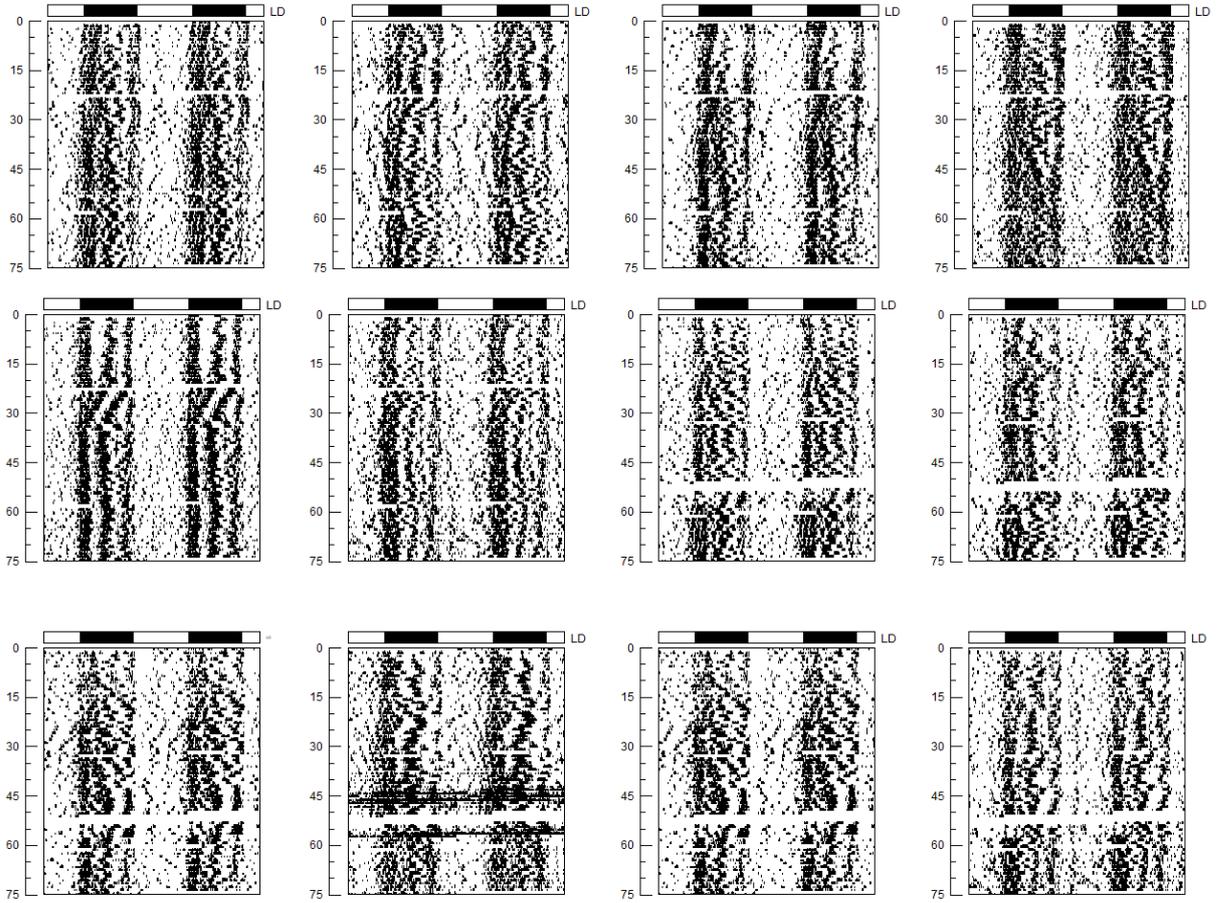
APÊNDICE B – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: RAÇÃO RETIRADA DURANTE AS PRIMEIRAS OITO HORAS DA FASE ESCURA (ZT12/08:00H À ZT20/16:00H) E OFERTADA ENTRE ZT20 (16:00 HORAS DA TARDE, OITO HORAS APÓS INÍCIO DA FOTOFASE ESCURA) E ZT12 (08:00 HORAS DO DIA SEGUINTE)

Grupo RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO



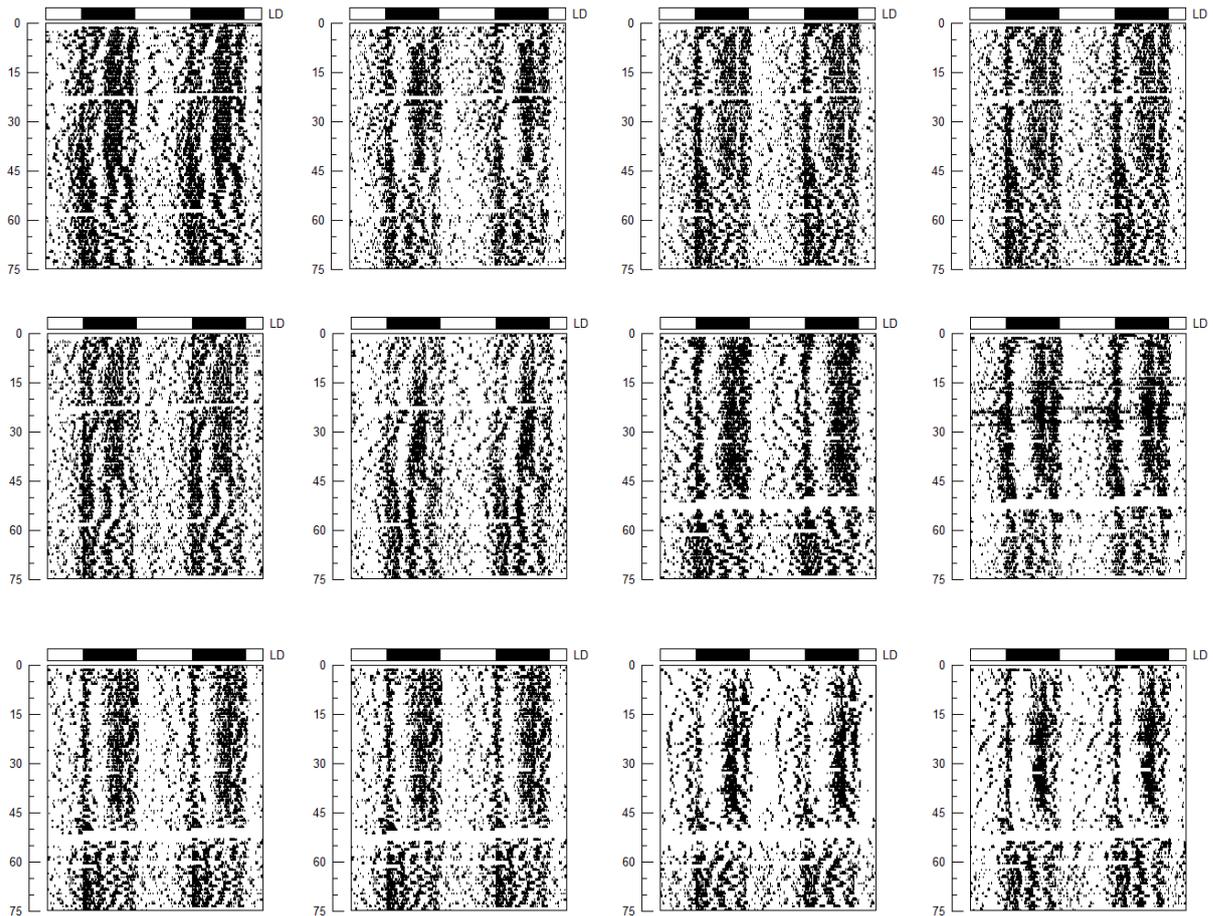
APÊNDICE C – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 75: OFERTA *AD LIBITUM* DA ALIMENTAÇÃO

Grupo CONTROLE 2



APÊNDICE D – ACTOGRAMAS INDIVIDUAIS. DIA 0 A 45: RAÇÃO RETIRADA DURANTE AS PRIMEIRAS OITO HORAS DA FASE ESCURA (ZT12/08:00H À ZT20/16:00H) E OFERTADA ENTRE ZT20 (16:00 HORAS DA TARDE, OITO HORAS APÓS INÍCIO DA FOTOFASE ESCURA) E ZT12 (08:00 HORAS DO DIA SEGUINTE). DIA 45 A 75: OFERTA AD *LIBITUM* DA ALIMENTAÇÃO.

Grupo RESTRIÇÃO TEMPORAL DO ALIMENTO REALIMENTADO



APÊNDICE E – ARTIGO ORIGINAL “TIME-RESTRICTED FEEDING IN DARK PHASE OF CIRCADIAN CYCLE AND/OR WESTERNIZED DIET CAUSE MIXED HYPERLIPIDEMIA IN RATS”

ISSN (electrónico): 1699-5198 - ISSN (papel): 0212-1611 - CODEN NUHCEQ S.V.R. 318



Nutrición Hospitalaria



Trabajo Original

Obesidad y síndrome metabólico

Time-restricted feeding in dark phase of circadian cycle and/or westernized diet cause mixed hyperlipidemia in rats

La alimentación con restricción de tiempo en la fase oscura del ciclo circadiano y/o la dieta occidentalizada causan hiperlipidemia mixta en las ratas

Eryka Maria dos Santos Alves, Nathalia Caroline de Oliveira Melo, Ana Carolina Oliveira Costa, Humberto de Moura Barbosa, Nathália Cavalcanti de Moraes Araújo, Gisélia de Santana Muniz and Elizabeth do Nascimento

Post-Graduation in Nutrition Department. Federal Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brazil

Abstract

Background: the dietary pattern that characterizes western diet is strongly associated with metabolic diseases and excess weight, as well as chronic illnesses. Misaligned feeding schedules can lead to or aggravate the development of such conditions.

Aim: this study evaluated the influence of dietary composition and/or time-restricted feeding on the anthropometric and biochemical profile of adult rats.

Methods: forty male rats, at 60 days of life, were divided into the following groups: Control (C), Restricted Control (RC), Westernized (W), and Restricted Westernized (RW).

Results: westernized groups, in spite of a low energy intake (C = 5399 ± 401.2 kcal; RC = 4279.0 ± 476.2 kcal; W = 4302 ± 619.8 kcal; RW = 4081.0 ± 404.4 kcal, p < 0.001), had a higher body weight (C = 404.6 ± 39.1 g; RC = 335.1 ± 36.5 g; W = 488.9 ± 51.2 g; RW = 438.8 ± 36.5 g, p < 0.001) as compared to their paired controls (RC and C) — around 30 % and 20 % more for RW and W, respectively. The westernized diet caused glucose intolerance and mixed hyperlipidemia, characterized by higher concentrations of cholesterol (C = 40.8 ± 7.4 mg/dL; RC = 76.7 ± 10.8 mg/dL; W = 61.3 ± 20.2 mg/dL; RW = 42.2 ± 8.2 mg/dL), LDLc (C = 17.4 ± 7.5 mg/dL; RC = 38.8 ± 7.2 mg/dL; W = 45.3 ± 15.8 mg/dL; RW = 11.0 ± 5.8 mg/dL), and triacylglycerol (C = 45.2 ± 15.0 mg/dL; RC = 73.2 ± 21.5 mg/dL; W = 83.6 ± 23.4 mg/dL; RW = 57.5 ± 13.6 mg/dL) in the serum (p < 0.05).

Conclusion: the effect of time-restricted feeding on body weight was strongly dependent on diet composition. The glucose tolerance test showed an influence of the circadian cycle phase. Mixed hyperlipidemia varied according to the presence of westernized diet and/or time-restricted food.

Keywords:

Hyperlipidemia. Time-restricted feeding. Westernized diet. Adult rats.

Resumen

Antecedentes: el patrón dietético que caracteriza a la dieta occidental está fuertemente asociado con las enfermedades metabólicas, así como con el sobrepeso y las enfermedades crónicas. Los horarios de alimentación desorganizados pueden conducir o agravar el desarrollo de tales trastornos.

Objetivo: este estudio evaluó la influencia de la composición dietética y/o la alimentación restringida en el perfil antropométrico y bioquímico de ratas adultas.

Métodos: cuarenta ratas macho, a los 60 días de vida, se dividieron en los siguientes grupos: control (C); control restringido (RC); occidentalizado (W) y occidentalizado restringido (RW).

Resultados: los grupos occidentalizados, a pesar de la baja ingesta energética (C = 5399 ± 401,2 kcal; RC = 4279,0 ± 476,2 kcal; W = 4302 ± 619,8 kcal; RW = 4081,0 ± 404,4 kcal, p < 0,001), tuvieron mayor peso corporal (C = 404,6 ± 39,1 g; RC = 335,1 ± 36,5 g; W = 488,9 ± 51,2 g; RW = 438,8 ± 36,5 g, p < 0,001) que los respectivos grupos de control (RC y C); alrededor de un 30 % y un 20 % más para RW y W, respectivamente. La dieta occidentalizada provocó intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia mixta, caracterizada por una mayor concentración de colesterol (C = 40,8 ± 7,4 mg/dL; RC = 76,7 ± 10,8 mg/dL; W = 61,3 ± 20,2 mg/dL; RW = 42,2 ± 8,2 mg/dL), cLDL (C = 17,4 ± 7,5 mg/dL; RC = 38,8 ± 7,2 mg/dL; W = 45,3 ± 15,8 mg/dL; RW = 11,0 ± 5,8 mg/dL) y triacilglicerol (C = 45,2 ± 15,0 mg/dL; RC = 73,2 ± 21,5 mg/dL; W = 83,6 ± 23,4 mg/dL; RW = 57,5 ± 13,6 mg/dL) en el suero (p < 0,05).

Conclusión: el efecto de la alimentación restringida en el tiempo sobre el peso corporal fue muy dependiente de la composición de la dieta. La prueba de tolerancia a la glucosa mostró la influencia de la fase del ciclo circadiano. La hiperlipidemia mixta varió según la presencia de la dieta occidentalizada y/o la comida con restricción de tiempo.

Palabras clave:

Hiperlipidemia. Alimentación con restricción de tiempo. Dieta occidentalizada. Ratones adultos.

Received: 09/11/2020 • Accepted: 23/12/2020

Authors' contributions: Eryka Maria dos Santos Alves: roles/writing original draft. Nathalia Caroline de Oliveira Melo: supervision; writing – review & editing. Ana Carolina Oliveira Costa: funding acquisition, data curation, investigation, methodology. Humberto de Moura Barbosa: formal analysis visualization. Nathália Cavalcanti de Moraes Araújo: data curation, investigation, methodology. Gisélia de Santana Muniz: formal analysis visualization. Elizabeth do Nascimento: funding acquisition, conceptualization, validation, writing – review & editing, project administration.

Conflicts of interest: the authors report no conflicts of interest.

Alves EMS, Melo NCO, Costa ACO, Barbosa HM, Araújo NCM, Muniz GS, Nascimento E. Time-restricted feeding in dark phase of circadian cycle and/or westernized diet cause mixed hyperlipidemia in rats. *Nutr Hosp* 2021;38(2):281-289

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.03432>

Correspondence:

Elizabeth do Nascimento. Post-Graduation in Nutrition Department. Universidade Federal de Pernambuco. Av Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. 50670-901 Recife, PE, Brazil
e-mail: elizabeth.nascimento2@ufpe.br

INTRODUCTION

Both developed and developing countries have modified their dietary patterns over the past few years. This pattern is associated with a higher intake of palatable foods, which are rich in saturated fats and refined carbohydrates, such as fast-food products, red meats, whole dairy products, and beverages with high content of simple sugars, characterizing a dietary pattern popularly known as the western or westernized diet (1).

In this dietary pattern lipids contribute about 40 % of the total energy ingested, especially in diets high in triglycerides, saturated fatty acids, and trans fatty acids (2), which influence metabolism and body composition (3). This food pattern is in line with Brazilian dietary habits and with the dietary patterns of other countries with western food patterns.

These habits are strongly associated in Brazil (4) with an increased prevalence of overweight (55 %) and obesity (19 %) and their correlated comorbidities, such as insulin resistance and glucose homeostasis imbalance (5), development of atherosclerosis (6), and a consequently increased risk of cardiovascular disease (7).

Based on dietary changes, recent evidence has shown the relationship between the pattern of meals taken throughout the day and the risk of overweight/obesity and associated diseases (8).

In western societies, lifestyle impacts show dinner as one of the meals with the highest energy intake, contributing \pm 35 % of the daily calories ingested (9). Modern living has caused many people to switch their eating times from day to night in order to carry out their work activities. A change in the active period, exemplified by individuals on night shift work or other shifts, has been shown to be an additional factor of metabolic risk, in particular for obesity and cardiovascular disease (10).

Emerging studies have suggested that meal times or even diet composition can change the biological rhythm or circadian rhythm, thus influencing energy metabolism (11) as well as the regulation of digestive and absorptive processes (12). Situations of desynchronization of this rhythmicity, mimicked by changes in the quantity, quality, and timing of meals, are related to metabolic disorders and a consequent risk of increased body fat and its comorbidities (13).

In view of the aforementioned, we hypothesized that time-restricted feeding during 8 hours of the dark phase would worsen the biochemical profile of rats fed a westernized diet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of a westernized diet and of time-restricted feeding on the anthropometric and biochemical profile of adult Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocols were submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (ECUA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE) under protocol number 23076.017868/2016-36, and followed the standards of animal handling and care established by the National Council for Animal

Experimentation Control, following the recommendations of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and the standards established in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (14).

ANIMALS AND EXPERIMENTAL GROUPS

The animals were kept in rooms with controlled temperature (22 ± 1 °C), relative humidity (\pm 55-60 %) and inverted cycle (8:00-20:00 h, dark cycle and 20:00-8:00 h, light cycle). Initially, forty male Wistar rats with 21 days of life were used. Half of the animals ($n = 20$) received a control diet and the other half ($n = 20$) received an experimental diet dubbed "westernized" (growth and maintenance phase) according to the nutritional needs recommended for the different life cycles of the animal (15). At 60 days of life the animals were arbitrarily divided into 4 groups, according to diet and temporal restriction of food. The restriction period imposed (8 hours of the active period of the animals was in the dark phase) was based on the study by Rocha et al. (10), which altered food availability to mimic the meal times of shift workers. Depending on the time of day, this restriction has been reported to alter energy homeostasis and cause metabolic disorders (16). The present study was designed to test metabolic outcomes when this restriction occurs during the active phase of the dark cycle. From the restriction protocol used new groups were formed: control (C, $n = 9$), restricted control (RC, $n = 9$), westernized (W, $n = 10$), and restricted westernized (RW, $n = 8$), totaling 36 animals kept in individual transparent cages during the subsequent 120 days. Four animals were excluded from the study due to the occurrence of esophageal perforation during the gavage procedure, and spontaneous respiratory disease.

DIETS, FOOD INTAKE, AND TIME-RESTRICTED FEEDING

The control group (C) received a standard commercial diet (Presence[®]: 26 % proteins, 63 % carbohydrates, 11 % lipids, and 3.6 calories/g) throughout the experiment. Group W received an experimental "westernized" growth diet (18 % proteins, 43 % carbohydrates, 39 % lipids, and 4.0 calories/g) until 60 days of life. After this age, the W groups received the same westernized diet but with proteins adjusted for the maintenance phase (14 % proteins, 46 % carbohydrates, 40 % lipids, and 4.1 calories/g). Just like humans, rodents need different amounts of energy and nutrients according to their life cycle (17). The diet was adapted from Ferro Cavalcante et al. (17), and its detailed composition is in table I.

After 60 days groups C and W were fed ad libitum throughout the 24-hour cycle, whereas the groups subjected to time-restricted feeding (RC and RW) received food after 8 hours of fasting during the dark cycle, e.g., between 8:00 h and 16:00 h. Food intake was measured by the difference between the amount of food offered and the amount rejected, in grams (g), as recorded on a digital electronic scale (brand Marte XL 500, class II; maximum

Table I. Centesimal composition of the westernized experimental diet

Constituents (g %)	Westernized diet (growth)	Westernized diet (maintenance)
Corn starch	11.70	15.70
Commercial feed of bioterium	8.00	8.00
Chocolate Maizena biscuit	5.00	5.00
Soy flour	4.00	4.00
Casein	20.00	15.00
Cellulose	4.00	4.00
Corn oil	-	1.50
Soy oil	3.00	2.50
Lard	5.30	5.30
Butter	4.00	4.00
Margarine (85 % lipids)	4.00	4.00
Milk cream (20 % lipids)	4.00	4.00
Sugar	22.00	22.00
Salts - mix minerals	2.50	2.50
Vitamins	0.70	0.70
Choline	0.25	0.25
Methionine	0.25	0.25
BHT	0.0014	0.014
NaCl (39.34 % Na)	0.30	0.30
Monosodium glutamate (12.3 % Na)	1.00	1.00
Kcal	402.28	409.71

Adapted from Ferro Cavalcante et al. (2013). g: grass; %: percentage; NaCl: sodium chloride; Na: sodium; BHT: butylhydroxytoluene.

capacity, 500 g; precision, 0.001 g). The accumulated amounts of food and energy intake were obtained weekly. The purpose of this control was to verify whether there was a contribution from the total amount food and energy intake on the outcomes observed under the assessed physiological and metabolic parameters.

ANTHROPOMETRIC MEASURES

Body weight was measured weekly until the end of the experimental period using the digital electronic scale (Marte® XL 500, class II; maximum capacity, 500 g, accuracy, 0.001 g). Body length (distance in cm from the nose to the base of the tail) was measured with the animal slightly anesthetized and relaxed. An inextensible measuring tape with a precision of 0.01 mm was

used to measure length. Based on weight and length, the body mass index (BMI = weight/cm²) was calculated. At the end of the study, the abdominal circumference (measured at the anterior aspect of the hind legs) and thoracic circumference (measured at the posterior aspect of the forelegs), in cm, were obtained to support the assessment of anthropometric changes and risk of developing metabolic syndrome (18).

ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST AND CIRCADIAN RHYTHM OF GLUCOSE

An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed between 123 and 146 days of life on the animals, in the light and dark photoperiods, in all groups. The animals were submitted to fasting for 6 hours and, after this period, the first blood sample (time 0) was collected for basal glucose measurement using the Accu-Check Performa®. Subsequently, a 50 % glucose solution was administered by gavage, at a dosage of 2 mg/g of body weight, for the oral glucose tolerance test (19); the glycemia was obtained at 30, 60, 90, and 120 minutes. The glucose area-under-the-curve (ΔG) was calculated using the trapezoidal method (20). The circadian rhythm of glucose was evaluated to observe whether there was an association with the temporal restriction of food and diet (21). On the same day, in all groups (± 120 days of life), every four hours, the rats were subjected to a capillary glucose test where blood was obtained through a small hole at the tip of the animal's tail.

BIOCHEMICAL PROFILE

After fasting for 10-12 h, the animals were euthanized using a muscle relaxant and an anesthetic (ketamine, 40 mg/kg and xylazine, 5 mg/kg), administered intraperitoneally, and then, through an intracardiac puncture, a blood sample (5 mL) was collected. Subsequently, the blood samples were centrifuged at 2500 g for 20 minutes, and the serum was collected and transferred to Eppendorf tubes, which were stored in a freezer at -20 °C for up to three months in order to be used for serological doses. Fasting serum glucose, total cholesterol and both high-density (HDL) and low density (LDL) lipoprotein fractions, triglycerides, urea, and creatinine were measured. The analyses were performed using Biosystems reagent kits, as well as their methodology, through an automated instrument, the A15 Clinical Chemistry Analyzer (Biosystems®, Spain). The Friedewald equation (22) was used to estimate plasma LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol levels through indirect calculation, using the formula: LDL-cholesterol mg/dL = Total cholesterol - HDL-cholesterol - (Triglycerides / 5).

STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed using the Graphpad Prism 7.0 program (Graphpad Prism Software Inc.), and the normality of variables was tested using the Shapiro-Wilk test. All results are expressed as

mean \pm standard deviation error of the mean. For intragroup analyses before and after an intervention a paired Student's *t*-test was used. For the analysis of body weight and food intake, with diet and time as cofactors, a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures (RM) was used, followed by Bonferroni's *post-hoc* test when a difference between groups was observed. For analyses with only one variable a one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's *post-hoc* test when a difference between groups was detected. Significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

SOMATIC GROWTH AND BODY COMPOSITION

At 60 days of life, the weight of the animals in the W group was 11 % higher than that of animals in C ($C = 245.0 \pm 16.1$ g; $RC = 247.3 \pm 26.0$ g; $W = 272.4 \pm 16.9$ g; $RW = 290.3 \pm 9.4$ g, $p < 0.005$). The final weight (± 180 days of life) in the RC group was around 20 % lower than in its unrestricted pair ($C = 404.6 \pm 39.1$ g; $RC = 335.1 \pm 36.5$ g, $p < 0.001$), and around 10 % lower in RW as compared to the group fed the unrestricted westernized diet ($W = 488.9 \pm 51.2$ g; $RW = 438.8 \pm 36.5$ g, $p < 0.001$). As regards restricted groups, RW was about 30 % heavier than RC ($RC = 335.1 \pm 36.5$ g; $RW = 438.8 \pm 36.5$ g, $p < 0.001$), and the difference between C and W was 21 % ($C = 404.6 \pm 39.1$ g; $W = 488.9 \pm 51.2$ g, $p < 0.001$) at the end of the experiment.

The food restriction imposed while still in the growth phase of the animals impaired longitudinal growth regardless of dietary treatment ($C = 25.99 \pm 0.91$ cm; $RC = 24.48 \pm 0.94$ cm; $W = 26.00 \pm 1.07$ cm; $RW = 24.32 \pm 1.11$ cm, $p = 0.001$). When analyzing body mass index, the results showed a higher BMI in RW when compared to RC ($C = 0.649 \pm 0.053$ g/cm²; $RC = 0.577 \pm 0.031$ g/cm²; $W = 0.737 \pm 0.107$ g/cm²; $RW = 0.801 \pm 0.067$ g/cm²), in line with the greater body mass weight in the RW group.

Body perimeters showed a greater thoracic circumference in groups fed the westernized diet, whether restricted or not, when compared to their unrestricted and restricted control pairs ($C = 14.67 \pm 0.58$ cm; $RC = 13.84 \pm 0.44$ cm; $W = 15.88 \pm 0.78$ cm; $RW = 16.64 \pm 1.02$ cm, $p < 0.001$). The abdominal circumference showed no differences between restricted and unrestricted groups on the same dietary treatment, but was strongly responsive to the westernized diet ($C = 15.94 \pm 0.80$ cm; $RC = 16.38 \pm 0.98$ cm; $W = 18.66 \pm 1.21$ cm; $RW = 19.29 \pm 1.21$ cm, $p < 0.001$). Also, differences in relative gonadal fat ($C = 1.45 \pm 0.28$ g %; $RC = 1.41 \pm 0.23$ g %; $W = 2.45 \pm 0.97$ g %; $RW = 1.95 \pm 0.77$ g %, $p < 0.05$) and retroperitoneal fat ($C = 1.76 \pm 0.84$ g %; $RC = 1.83 \pm 0.61$ g %; $W = 3.19 \pm 1.00$ g %; $RW = 3.91 \pm 1.15$ g %, $p < 0.05$) were observed.

DIETARY INTAKE

The accumulated dietary intake (Fig. 1A) over the weeks of experimentation revealed a difference in food intake between the

restricted control group (RC) and its unrestricted pair (C), as well as between RW and RC, and between W and C. However, the same was not observed for the restricted westernized group (RW) and its pair (W) ($C = 1,500 \pm 111.4$ g; $RC = 1,189 \pm 132.3$ g; $W = 1,049 \pm 151.2$ g; $RW = 995.4 \pm 98.63$ g, $p < 0.001$).

The energy value ingested (Fig. 1B) showed that, despite the fact that the westernized diet was more caloric by 13 %, the results were similar except between the RW and RC groups, which did not differ from each other ($C = 5,399 \pm 401.2$ kcal; $RC = 4,279.0 \pm 476.2$ kcal; $W = 4,302 \pm 619.8$ kcal; $RW = 4,081.0 \pm 404.4$ kcal, $p < 0.001$).

The data set suggests that the metabolic and physiological alterations observed in the present study are not only due to differences in energy but also to differences in the proportion of macronutrients in the diet.

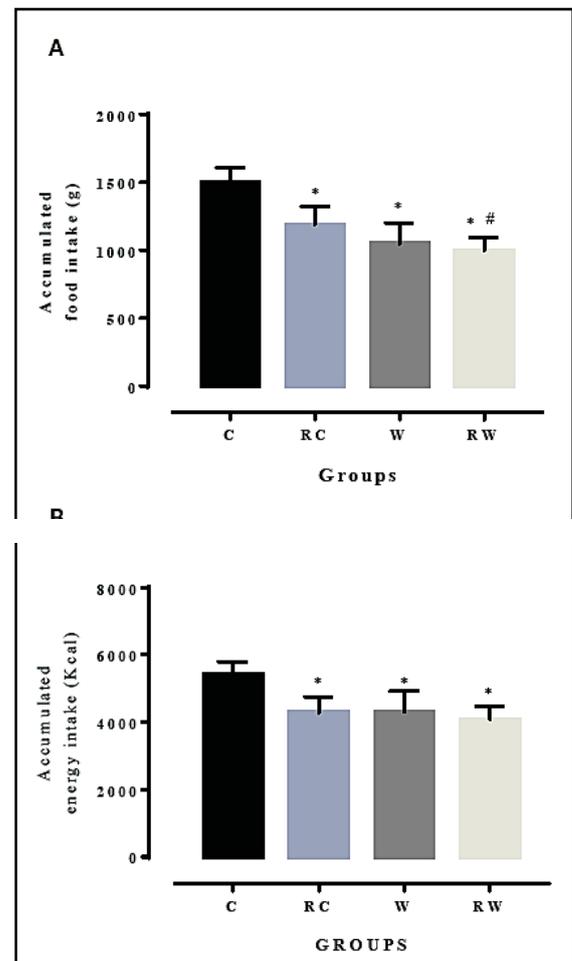


Figure 1.

Dietary intake (A) and energy intake (B) accumulated over 8 weeks of experimentation. Groups (n, 8-10 per group) — C: control; RC: control with time-restricted feeding; W: westernized; RW: westernized with time-restricted feeding. Two-way ANOVA repeated measurements using Bonferroni's *post-hoc* test. *: vs. C; #: vs. W ($p < 0.05$)/Graphpad Prism 7.0.

CIRCADIAN RHYTHM OF GLUCOSE

The follow-up of the 24-hour glycemic curve (Fig. 2) for the groups with ad libitum diet (C and W) (Fig. 2A) showed that group W presented a higher glycemia as compared to C in the three intervals of the light phase (20-24 h; 24-04 h, and 04-08 h). In the restricted groups, it was observed that the RW group showed lower glycemia levels than W in the last two intervals of the dark phase (12-16 h and 16-20 h). Although a reduction in blood glucose in the RW group was observed when compared to group W, glycemia remained higher than in its restricted counterpart (RC) at various points in the interval, revealing that the circadian rhythm

of glucose is sensitive to both the temporal restriction of food and the nutritional composition of the diet.

In the evaluation of the intragroup circadian rhythm of glucose as a function of the light and dark phases of the 24-hour cycle, for the control (Fig. 2B) and westernized (Fig. 2D) groups fed ad libitum no difference was observed. In the RC group (Fig. 2C) the difference between the light and dark phase occurred at two points on the curve, at 12:00 hrs and 16:00 hrs, consistent with the dark phase during which the animal was without food. Interestingly, the RW group shows no differences at any point on the curve (Fig. 2E), suggesting that the composition of the diet may interfere with the mechanisms of glyce-

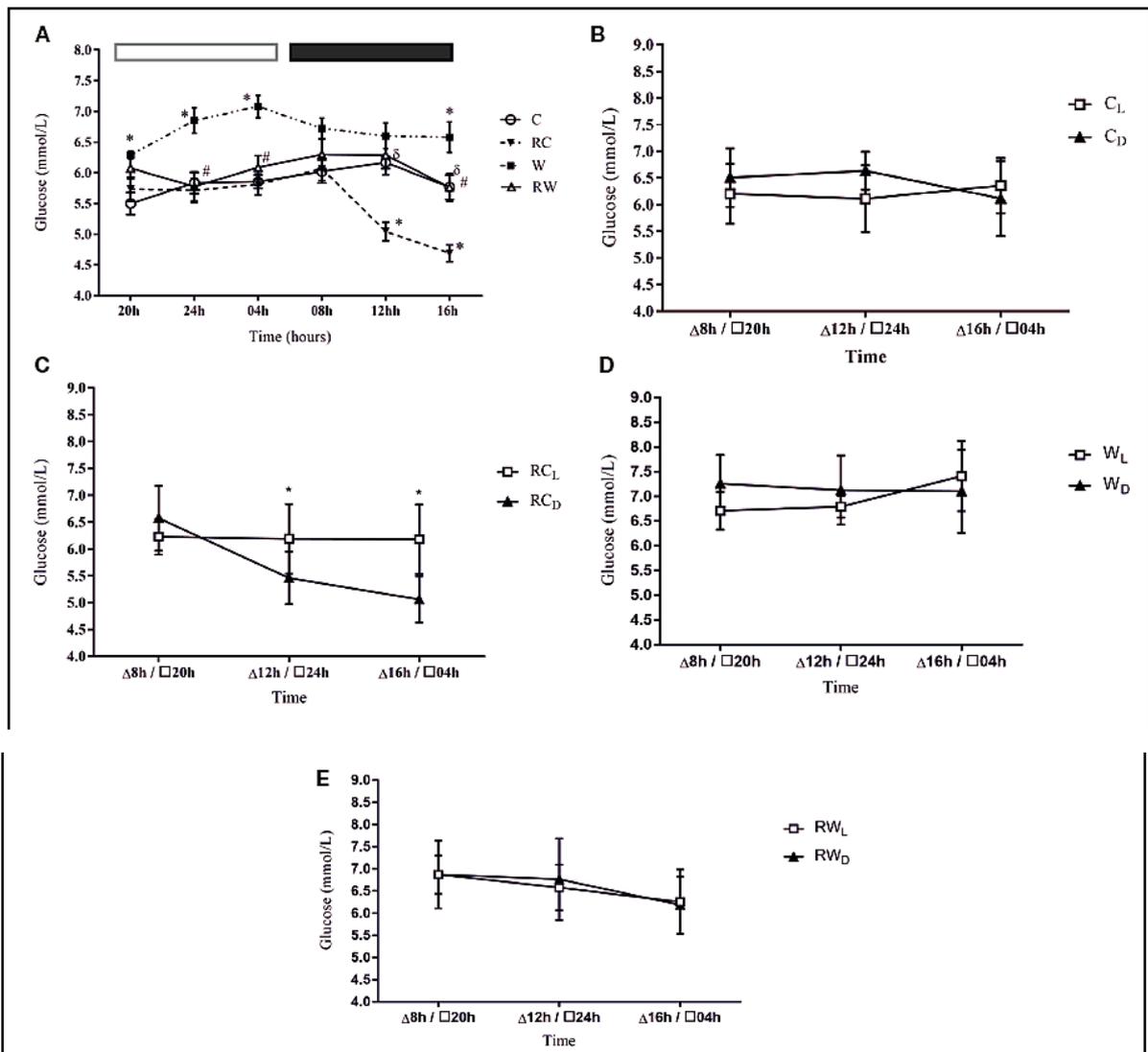


Figure 2. Circadian rhythm over glucose in a 24-hour cycle, between groups throughout the cycle (A) and intragroup in light phase and dark phase (B, C, D, E). (A) C: control; RC: restricted control; W: westernized; RW: restricted westernized. Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's post-hoc test. *: vs C; [§]: vs RC; [#]: vs W (p < 0.05). (B) C_L: light control; C_D: dark control. (C) RC_L: restricted light control; RC_D: restricted dark control. (D) W_L: light westernized; W_D: dark westernized. (E) RW_L: restricted light westernized; RW_D: restricted dark westernized. Δ: dark period; □: light period. Two-way ANOVA for repeated measurements followed by Tukey's *post-hoc* test/Graphpad Prism 7.0.

ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST (OGTT)

The OGTT obtained in the dark phase of the 24-hour cycle (Fig. 3A) showed that the RW group presented higher blood glucose levels differing from the RC group. In the light phase of the cycle (Fig. 3B) group W differed from C at 90 and 120 min, and

RW differed from W at 90 min. The results are corroborated by the incremental glucose area-under-the-curve of the above-mentioned groups (Fig. 3A and 3B), and the differences between the results of the OGTT performed in either the light or dark phase suggest that these values may be associated with the endogenous rhythm of insulin secretion or sensitivity of insulin-dependent tissues.

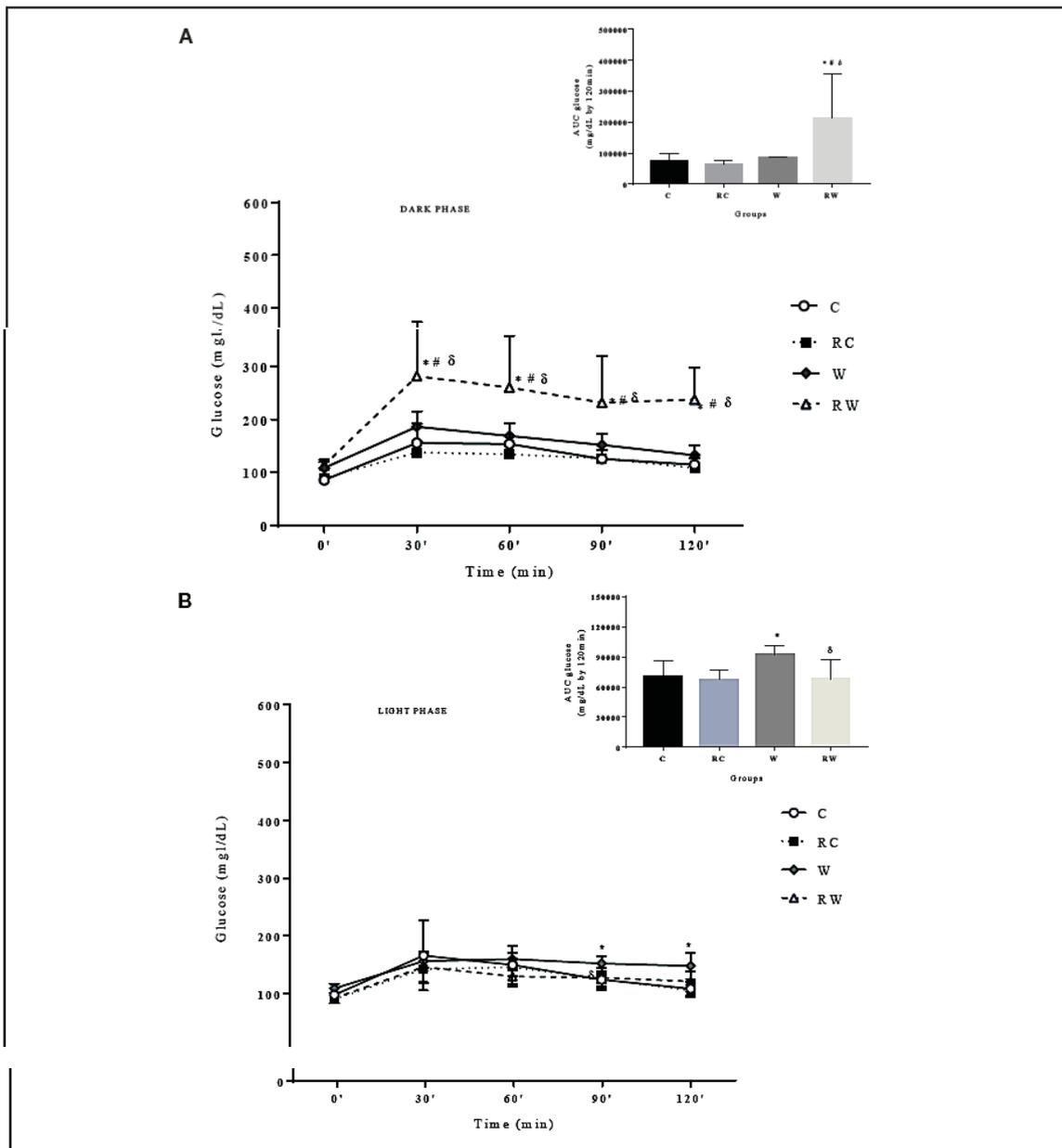


Figure 3. Oral glucose tolerance test (OGTT) and glucose area-under-the-curve according to the dark (A) and light (B) phases among groups (n = 8-10 per group). C: control; RC: restricted control; W: westernized; RW: restricted westernized. Repeated measurements two-way ANOVA for OGTT and one-way ANOVA for glucose area-under-the-curve followed by Tukey's *post-hoc* test/Graphpad Prism 7.0. *: vs C; #: vs RC; δ : vs W (p < 0.05).

Table II. Biochemical parameters of the adult rats submitted to westernized diet and/or time-restricted feeding

Biochemical parameters (mg/dL)	Groups				p-value
	C (n = 9) MD ± SD	RC (n = 9) MD ± SD	W (n = 10) MD ± SD	RW (n = 8) MD ± SD	
Glucose	189.5 ± 29.9	205.3 ± 34.4	180.3 ± 24.4	202.0 ± 18.4	> 0.05
Urea	40.9 ± 8.9	32.3 ± 4.6*	28.1 ± 5.4*	22.1 ± 3.4*†	< 0.000
Creatinine	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1*	0.8 ± 0.1*†	0.6 ± 0.1†	< 0.000
Triacylglycerol	45.2 ± 15.0	73.2 ± 21.5*	83.6 ± 23.4*	57.5 ± 13.6‡	0.001
Total cholesterol	40.8 ± 7.4	76.7 ± 10.8*	61.3 ± 20.2*	42.2 ± 8.2†‡	< 0.000
HDLc	15.5 ± 4.6	23.3 ± 5.4*	25.2 ± 5.2*	22.6 ± 3.1*	< 0.000
LDLc	17.4 ± 7.5	38.8 ± 7.2*	45.3 ± 15.8*	11.0 ± 5.8†‡	< 0.000
VLDLc	9.5 ± 3.2	15.2 ± 4.1*	16.1 ± 4.9*	11.3 ± 2.8	0.001
TG/HDL Ratio	3.3 ± 1.8	3.1 ± 0.5	3.3 ± 0.6	2.5 ± 0.6	0.333

C: control group; RC: time-restricted feeding in control group; W: westernized; RW: time-restricted feeding in westernized group. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. *: vs. C; †: vs. RC; ‡: vs. W ($p < 0.05$). Values expressed as mean (MD) ± standard deviation (SD).

BIOCHEMICAL PROFILE

The biochemical analysis showed a reduction in serum urea levels in RC, W, and RW, and increased creatinine levels in RC and W as compared to C. On the other hand, we highlight that the experimental interventions were more deleterious for lipid rates than for blood glucose. Fasting glucose levels (C: 189.5 ± 29.9 mg/dL; RC: 205.3 ± 34.4 mg/dL; W: 180.3 ± 24.4 mg/dL; RW: 202.0 ± 18.4 mg/dL, $p > 0.05$) did not show any differences between groups, but mixed dyslipidemia was observed in groups W and RC when compared to group C. The results found for the TG/HDLc ratio, however, were not significant, probably because of an increase in HDLc. Interestingly, the results of time-restricted feeding in the group fed the control diet proved to be more deleterious for lipid changes than those recorded in the group fed the westernized diet (Table II) when RW was compared to the C group and unrestricted W group.

DISCUSSION

The original experimental design of the present study is the first to investigate the relationship between westernized diet and dietary restriction, and their impacts on anthropometric measures and glycemic and lipid profiles. Concerning the repercussions on the body weight of the study animals, the westernized diet and the time-restricted feeding produced these effects: the westernized diet was effective in increasing body weight; and temporal restriction of food caused a reduction in body weight. Changes in the biochemical profile and differences in oral glucose tolerance, however, according to the phases of the circadian cycle, indicated a dependence on the diet as well as on the food restriction and its interactions.

Previously (23), it was observed that the induction of obesity by consumption of a high-fat diet is more effective when started

early and continued for several weeks; this may result in a weight increase of 10-20 % when rodents reach adulthood. Similarly, the present study also found a weight increase starting at 60 days of life. Both groups, restricted and unrestricted, fed a westernized diet were heavier than their respective pairs fed a control diet.

In this study, the higher body weight found in the westernized group was not associated to the amount of food or energy that was taken in, but rather associated with higher metabolic efficiency, which is characterized by a reduction in the energy expended by metabolically active tissues, with an increase in energy conservation (24). Schilperoot et al. (25) verified that a temporal restriction of food during the dark period, alternating with weeks of food restriction during the light period, with no reduction in the total amount of food ingested, caused a long-term reduction in basal energy expenditure, a reduction in lean mass, and an increase in fat mass. The effect of westernized diet on body composition was also verified by a high amount of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal), as well as by greater abdominal and thoracic circumferences. This result is consistent with that observed in 2012 by Angélico et al. (26), who found an increase in abdominal and thoracic circumferences by 17 % and 20 %, respectively, in animals fed a westernized diet containing 50 % of lipids.

The lower food intake seen in the westernized groups may in part be associated with high satiety as caused by the presence of lipids in the gastrointestinal tract. A previous study observed a relationship between fat molecules in the gastrointestinal tract and slow gastric emptying (27,28), as well as an increase in the secretion of hormones such as cholecystokinin, glucagon-like peptide 1 (GLP-1), and peptide YY (PYY) in intestinal mucosal cells, with suppression of hunger and reduced food intake (29).

On the other hand, an increase in the metabolization of fatty acids, as a function of the excess fat available or of increased mobilization, raises the concentrations of malonil-CoA, and can

alter metabolism in hypothalamic neurons by modulating the expression of peptides that regulate food intake (30). For instance, a reduction in the levels of transcripts encoding orexigenic neuropeptides, such as neuropeptide Y and agouti-related peptide (NPY/AgRP) (31,32), while increasing transcript encoding for anorexigenic neuropeptides, such as pro-opiomelanocortin and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (POMC/CART) (32,33), can lead to suppressed hunger and smaller amounts of food ingested.

The composition of the diet as well as the temporal restriction of food also influenced the circadian rhythm of glucose. The follow-up of glucose rhythm between the light and dark photoperiods of the 24-hour cycle in each group demonstrates that the composition and photoperiod of the diet exerts an influence on the circadian curve of glycemia. Besides food intake as modulator of insulin secretion, this hormone has a cyclic oscillation. The insulin secretion rhythm has been previously demonstrated over 24 hours (34). The sensitivity of insulin-dependent tissue can be modulated both by the suprachiasmatic nucleus (central clock of the circadian timing system) and by oscillators or clock genes located in peripheral organs (35). Thus, the biological rhythms of blood glucose and glucose tolerance present a circadian pattern where the highest concentration and highest glucose tolerance are found at the beginning of the active period, and gradually decrease towards the end of the day or light day (34). Given this, the differences seen within each group, relative to the light or dark phase, are not only derived from food restriction but also from cyclical sensitivity to insulin (5), causing glucose intolerance (19) and incremental glucose area-under-the-curve levels.

Environmental cues such as diet can modify the expression of key enzymes in glucose metabolism (36), as well as affect the genes that maintain glycemic homeostasis in the fasting state (37). Rodents fed a high-fat diet have reduced glucose tolerance, but when subjected to time-restricted feeding show improvement in glucose tolerance and a reduction in insulin resistance (16), in contrast to what was found in the present study. The restricted westernized group (RW) did not improve its glycemic response in the oral glucose tolerance test, especially during the dark phase of the cycle. However, the phase of the circadian cycle when blood glucose is monitored seems to affect the results. Intriguingly, although animals fed westernized diets presented glucose intolerance, fasting hyperglycemia was not observed. This fact suggests the development of hyperinsulinemia, which characterizes the condition of mild glucose intolerance, which in turn appears before any detectable elevation of plasma glucose concentration (5).

Mixed hyperlipidemia (high triglycerides and cholesterol) was found in animals fed a westernized diet. It is possible that hypertriglyceridemia may be related, at least in part, to the absence of any interruption of the lipogenic and lipolytic mechanisms in the liver and adipose tissue, respectively, as a consequence of hyperinsulinemia (38). In the liver, the synthesis of fatty acids from glucose and amino acids, called new lipogenesis, results in the packaging of triglycerides in very low-density lipoproteins (VLDL) that are exported in the blood and captured by peripheral tissues (39). This lipogenic route, in the presence of high levels of fat and simple sugar in the diet, as occurs in the westernized

diet pattern, may have its usual stimulation amplified, leading to overproduction of lipids (5).

In adipose tissue, marked lipolysis can occur because of a low retention of triglycerides in the unilocular droplets of fat due to a decrease in the expression of the adipocytic proteins of lipid droplets such as perilipin, which are responsible for the storage and retention of lipids in this tissue (40). These and other metabolic pathways may be concomitant and are responsible for various alterations found in our research as a result of the westernized diet offered to the animals.

The body's biological response to time-restricted feeding was diet-dependent. The time-restricted feeding performed in the RW group improved the regulation of lipid levels. However, this result was not observed in the RC group, which presented higher values of total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, and triglycerides when compared to the unrestricted control group. In contrast, another study has shown that animals exposed to food restriction for 12 hrs during four weeks underwent a reduction in serum cholesterol levels by 29 % and 36 % according to the light or dark phase of the 24-hour cycle, respectively, even with no reduction in body weight (41). On the other hand, the animals submitted to time-restricted feeding for 16 weeks showed a lower body weight and reduced levels of triglycerides, total cholesterol, and LDL, similar to what was found in the present study (42).

In summary, this study describes the destructive repercussions of westernized diet on glycemic homeostasis, anthropometric parameters, and biochemistry profile. Curiously, time-restricted feeding caused more adverse metabolic effects on animals fed the control diet than in animals fed the westernized diet. We also demonstrated that the circadian rhythm of glucose and the oral glucose tolerance test vary according to the phase of the circadian cycle, and are related to diet and food restriction. Moreover, food restriction in animals fed a westernized diet ameliorated the lipidic parameters, but this "benefit" needs to be evaluated, together with other metabolic factors such as other periods and the number of hours daily when the restriction occurs, as well as the investigation of intracellular events in key organs for metabolism such as liver tissue, adipose tissue, and skeletal muscle tissue.

REFERENCES

1. Nazni P. Association of western diet & lifestyle with decreased fertility. *Indian J Med Res* [Internet] 2014;140:S78-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673548>
2. Nascimento CMO, Ribeiro EB, Oyama LM. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *An Acad Bras Cienc* 2009;81:453-66. DOI: 10.1590/S0001-37652009000300010
3. Ferro Cavalcante TC, Marcelino Da Silva AA, Alheiros Lira MC, Do Amaral Almeida LC, Jaques Marques AP, Do 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* 2014;65(8):989-93. DOI: 10.3109/09637486.2014.950208
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2018.
5. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med* 2017;23(7):804-14. DOI: 10.1038/nm.4350

6. Silva JM, Saldanha C. Dieta, aterosclerose e complicações aterotrombóticas. *Rev Port Cardiol* 2007;26(3):277-94.
7. Tain YL, Sheen JM, Yu HR, Chen CC, Tiao MM, Hsu CN, et al. Maternal melatonin therapy rescues prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet induced programmed hypertension in male rat offspring. *Front Physiol* 2015;6(12):1-8. DOI: 10.3389/fphys.2015.00377
8. Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC. Role of sleep timing in caloric intake and BMI. *Obesity* 2011;19(7):1374-81. DOI: 10.1038/oby.2011.100
9. US Department of Agriculture. US Department of Agriculture ARS, Beltsville Human Nutrition Research Center, Food Surveys Research Group & US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. *What We Eat in America* 2012. Available at: www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrg
10. Rocha LS da, de Matos RJB, de Souza JA, Costa ACO, Lopes de Souza S, Muniz G de S, et al. Daytime increase in caloric intake without change in total 24-h caloric intake can increase adiposity but not total bodyweight in rats with inverted feeding pattern. *Appl Physiol Nutr Metab* 2017;42(9):931-40. DOI: 10.1139/apnm-2016-0536
11. Yoshino J, Klein S. A Novel Link Between Circadian Clocks and Adipose Tissue Energy Metabolism. *Am Diabetes Assoc* 2013;62(7):2175-7. DOI: 10.2337/db13-0457
12. Tahara Y, Shibata S. Chronobiology and nutrition [Internet]. Vol. 253, Neuroscience. IBRO; 2013. p. 78-88. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.049
13. Poggiogalle E, Jamshed H, Peterson CM. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism* [Internet] 2018;84:11-27. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049517303293>. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.11.017
14. Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. Vol. 39, American Physiological Society Physiologist Physiologist; 1996. p. 208-211.
15. Reeves PG, Suppl M. Symposium : Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet 1, 2. *Exp Biol* 1997;127:838-41.
16. Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab* 2014;20(6):991-1005. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.11.001
17. Ferro Cavalcante TC, Lima Da Silva JM, Da Marcelino Da Silva AA, Muniz GS, Da Luz Neto LM, Lopes De Souza S, et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids* 2013;48(11):1157-68. DOI: 10.1007/s11745-013-3833-z
18. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41(1):111-9. DOI: 10.1258/00236770779399518
19. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2008;295(6):1323-32. DOI: 10.1152/ajpendo.90617.2008
20. Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care* 1990;13(2):172-5. DOI: 10.2337/diacare.13.2.172
21. Nascimento E, Guzman-Quevedo O, Delacourt N, da Silva Aragão R, Perez-Garcia G, de Souza SL, 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* 2013;8(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0056231
22. William T. Friedewald, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502. DOI: 10.1093/clinchem/18.6.499
23. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* 2007;15(4):798-808. DOI: 10.1038/oby.2007.608
24. MacLean PS, Higgins JA, Johnson GC, Fleming-Elder BK, Donahoo WT, Melanson EL, et al. Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(6 56-6). DOI: 10.1152/ajpregu.00463.2004
25. Schilperoot M, van den Berg R, Dollé MET, van Oostrom CTM, Wagner K, Tambyrajah LL, et al. Time-restricted feeding improves adaptation to chronically alternating light-dark cycles. *Sci Rep* 2019;9(1):1-12. DOI: 10.1038/s41598-019-44398-7
26. Angélico LRN, Deminice R, Leme IDA, Lataro RC, Jordão AA. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: Effects of high-fat and high-sucrose diets. *Rev Nutr* 2012;25(3):331-9. DOI: 10.1590/S1415-52732012000300003
27. Little TJ, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Modulation by high-fat diets of gastrointestinal function and hormones associated with the regulation of energy intake: Implications for the pathophysiology of obesity. *Am J Clin Nutr* 2007;86(3):531-41. DOI: 10.1093/ajcn/86.3.531
28. Araújo CRR, Esteves EA, Dessimoni-Pinto NAV, Batista ÁG. Myrciaria cauliflora peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. *J Med Food* 2014;17(2):262-7. DOI: 10.1089/jmf.2012.0256
29. Gault VA, Bhat VK, Irwin N, Flatt PR. A novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1)/Glucagon hybrid peptide with triple-acting agonist activity at glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GLP-1, and glucagon receptors and therapeutic potential in high fat-fed Mice. *J Biol Chem* 2013;288(49):35581-91. DOI: 10.1074/jbc.M113.512046
30. Lane MD, Wolfgang M, Cha SH, Dai Y. Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. *Int J Obes* 2008;32:S49-54. DOI: 10.1038/ijo.2008.123
31. Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, et al. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(44):17358-63. DOI: 10.1073/pnas.0708385104
32. Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, Shulman GI, et al. Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(49):19285-90. DOI: 10.1073/pnas.0709778104
33. Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, et al. Tamoxifen-Induced Anorexia Is Associated With Fatty Acid Synthase Inhibition in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus and Accumulation of Malonyl-CoA. *Diabetes* 2006;55(5):1327-36. DOI: 10.2337/db05-1356
34. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance: A role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 2001;50(6):1237-43. DOI: 10.2337/diabetes.50.6.1237
35. Stenvers DJ, Scheer FAJL, Schrauwen P, la Fleur SE, Kalsbeek A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15(2):75-89. DOI: 10.1038/s41574-018-0122-1
36. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2004;2(11). DOI: 10.1371/journal.pbio.0020377
37. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012;15(6):848-60. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.019
38. Puri V, Ranjit S, Konda S, Nicoloso SMC, Straubhaar J, Chawla A, et al. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(22):7833-8. DOI: 10.1073/pnas.0802063105
39. Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2006;281(15):10105-17. DOI: 10.1074/jbc.M600272200
40. Kimmel AR, Sztalryd C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2016;36(1):471-509. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071813-105410
41. Farooq N, Priyamvada S, Arivarasu NA, Salim S, Khan F, Yusufi ANK. Influence of Ramadan-type fasting on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in small intestine and liver of rat used as a model. *Br J Nutr* 2006;96(6):1087-94. DOI: 10.1017/bjn.20061942
42. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012;15(6):848-60. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.019

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de maio de 2019

Ofício nº 23/19

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

Para: **Prof. Elizabeth do Nascimento**
 Departamento de Nutrição
 Centro de Ciencia da Saúde
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0010/2019

Certificamos que a proposta intitulada **“Melatonina: Efeitos sobre o metabolismo, comportamento alimentar e locomotor, de ratos alimentados com dieta ocidentalizada com e sem restrição temporal do alimento.”** registrado com o nº 0010/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Elizabeth do Nascimento** o 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/04/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/05/2019 a 28/02/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato isogenico
Nº de animais	80
Peso/Idade	50-60g/ 3 semanas
Sexo	Macho (80)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente,



Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

