

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PRISCILA DE PAULA FRANCO

**EFEITO DO TIME-RESTRICTED FEEDING DE CURTO PRAZO SOBRE OS
TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM E PERFIL GLICÊMICO EM
CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG

2019

PRISCILA DE PAULA FRANCO

**EFEITO DO TIME-RESTRICTED FEEDING DE CURTO PRAZO SOBRE OS
TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM E PERFIL GLICÊMICO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Co-orientador: Renato Rizo Ventura.

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

F826e Franco, Priscila de Paula.
Efeito do time-restricted feeding de curto prazo sobre os tecidos
adiposos branco e marrom e perfil glicêmico em camundongos. / Priscila de
Paula Franco – Alfenas/MG, 2019.
45 f.: il. –

Orientadora: Silvia Graciela Ruginsk Leitão.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Jejum. 2. Camundongos. 3. Tecido Adiposo. 4. Teste de Tolerância a
Glucose. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginski. II. Título.

CDD-612

PRISCILA DE PAULA FRANCO

“EFEITO DO TIME-RESTRICTED FEEDING DE CURTO PRAZO SOBRE OS TECIDOS
ADIPOSOS BRANCO E MARROM E PERFIL GLICÊMICO EM CAMUNDONGOS”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Biociências
Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas. Área de concentração: Neurociências e
Comportamento.

Aprovado em: 27/09/19

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

- UNIFAL-MG

Assinatura:



Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

- UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Luis Carlos Reis

Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de

Janeiro - UFRRJ

Assinatura:



Dedico este trabalho a Deus que me amparou em todos os momentos de dificuldade, trazendo paz ao coração e a certeza de que ao final tudo seria como Ele havia planejado. “Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para Deus, e não para os homens”. Colossenses 3:23

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que tem cuidado, sustentado e me amparado em toda minha trajetória acadêmica, trazendo amor, alegria e conforto ao meu coração através da vida de cada um que Ele tem colocado em meu caminho.

Em especial, agradeço à minha família, minha mãe Gilza, meu pai Ozias e minha irmã Glenda pelas orações e incentivo a sempre ir além.

Agradeço ao meu noivo Jota por sempre me ajudar em todas as situações, apoiar minhas decisões, me consolar nas crises de ansiedade e alegrar cada um dos meus dias.

Muito obrigada às minhas amigas-irmãs Jéssica e Thaís, que, mesmo longe, estão sempre presentes até nos momentos mais difíceis.

Obrigada ao Tato, meu terapeuta, pastor e amigo, por me ouvir, compreender e aconselhar nessa fase desafiadora.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, Bianca, Marina, Vanusa e Felipe por toda a ajuda e especialmente aos meus orientadores Silvia e Renato, a quem devo tudo que aprendi na pesquisa acadêmica, e por terem me orientado com sabedoria, carinho e dedicação.

Agradeço aos meus amigos alfenenses, especialmente à minha amiga Letícia Reis que sempre esteve à disposição para me ajudar com muito carinho. Ao meu migo Leandro por me receber na toca com muito bom humor e estar sempre disposto em ajudar. Aos meus amigos da IPI e da ABU, por fazerem meus dias mais leves.

Agradeço a Universidade Federal de Alfnas e ao Programa de Pós Graduação em Biociências pela oportunidade de me tornar mestre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nos últimos anos, modificações dietéticas têm sido cada vez mais promovidas como potenciais auxiliares na prevenção e tratamento da obesidade e disfunções metabólicas. Uma delas é a alimentação com restrição de tempo (*time-restricted feeding*, TRF) que restringe os períodos de alimentação diária para determinadas horas do dia, estendendo o típico jejum noturno por várias horas. Este trabalho visou elucidar os efeitos do TRF em curto prazo sobre a ingestão alimentar, massa corporal total, massa e histologia dos tecidos adiposos branco periepídimal (pTAB) e marrom interescapular (iTAM), glicemia de jejum e tolerância oral à glicose. Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos divididos em grupos de TRF de 12 horas por dia por uma ou quatro semanas com seus respectivos controles. Os dados foram analisados no software de análises estatísticas GraphPad Prism®. Os animais TRF após uma e quatro semanas não demonstraram alterações no ganho de massa corporal total e ingestão alimentar comparados aos respectivos animais *ad libitum* ($p > 0,05$). Entretanto, houve um aumento da massa de iTAM após uma ($0,44 \pm 0,01$ vs. $0,36 \pm 0,02$ g/100g MC; $p < 0,01$) e quatro ($0,53 \pm 0,03$ vs. $0,39 \pm 0,03$ g/100g MC; $p < 0,001$) semanas de TRF, além de uma diminuição do tamanho dos adipócitos e da massa de pTAB na primeira ($1,70 \pm 0,09$ g/100g MC vs. $2,03 \pm 0,16$ g/100g MC; $p < 0,05$) e na quarta ($2,02 \pm 0,20$ g/100g MC vs. $2,46 \pm 0,31$ g/100g MC; $p > 0,05$) semana. A glicemia de jejum aumentou nos animais TRF após a primeira semana ($175,90 \pm 6,59$ vs. $153,20 \pm 5,77$ mg/dL; $p < 0,05$), mas não após a quarta semana ($p > 0,05$). O teste de tolerância oral à glicose demonstrou menor elevação da glicemia após quatro semanas ($85,50 \pm 10,33$ vs. $121,80 \pm 15,82$ mg/dL; $p < 0,05$). Os resultados apontam para um possível aumento da termogênese e consequentemente do metabolismo energético, provavelmente utilizando-se das reservas energéticas de TAB. Além disso, ocorre uma adaptação inicial da glicemia de jejum dos animais submetidos ao TRF na primeira semana, mas na quarta semana há uma possível melhora no *clearance* de glicose plasmática, evidenciada pela menor elevação de glicemia do grupo TRF4, sugerindo um possível aumento da sensibilidade à insulina. Portanto, o TRF representa uma abordagem promissora para a prevenção e terapia de distúrbios metabólicos como a obesidade e o diabetes tipo II.

Palavras-chave: Jejum. Camundongos. Tecido Adiposo. Glicemia. Teste de Tolerância a Glucose.

ABSTRACT

In recent years, dietary modifications have been increasingly promoted as potential auxiliaries in the prevention and treatment of obesity and metabolic dysfunctions. One of them is time-restricted feeding (TRF), which restricts daily meals to certain hours of the day, extending the typical night fasting for several hours. This work aimed to elucidate the effects of short-term TRF on food intake, total body mass, mass and histological analysis of periepididymal white adipose tissue (pWAT) and interscapular brown adipose tissue (iBAT), fasting glycemia and oral glucose tolerance. Forty Swiss male mice were divided into groups of 12-hour TRF per day for one or four weeks, with their respective controls. Data were analyzed in the GraphPad Prism® statistical analysis software. TRF animals after one and four weeks did not demonstrate alterations in total weight gain and food intake compared to the respective *ad libitum* animals ($p > 0.05$). However, there was an increase in the iBAT mass after one (0.44 ± 0.01 vs. 0.36 ± 0.02 g/100g MC; $p < 0.01$) and four (0.53 ± 0.03 vs. 0.39 ± 0.03 g/100g MC; $p < 0.001$) weeks of TRF, in addition to a decrease in the size of the adipocytes and the pWAT mass in both first (1.70 ± 0.09 g/100g MC vs. 2.03 ± 0.16 g/100g MC; $p < 0.05$) and fourth (2.02 ± 0.20 g/100g MC vs. 2.46 ± 0.31 g/100g MC; $p > 0.05$) weeks. Fasting glycemia increased in TRF animals after the first week (175.90 ± 6.59 vs. 153.20 ± 5.77 mg/dL; $p < 0.05$), but not after four weeks ($p > 0.05$). The oral glucose tolerance test showed lower glucose elevation after four weeks (85.50 ± 10.33 vs. 121.80 ± 15.82 mg/dL; $p < 0.05$). These results point to a possible increase in thermogenesis and consequently in energy metabolism, probably using the energy reserves from WAT. In addition, there is an initial adaptation of fasting glycemia of the animals submitted to TRF in the first week, but in the fourth week there is a possible improvement in the clearance of plasma glucose, evidenced by the lower elevation in blood glucose in the TRF4 group, suggesting a possible enhancement in insulin sensitivity. Therefore, TRF represents a promising approach for the prevention and therapy of metabolic disorders such as obesity and type II diabetes.

Keywords: Fasting. Mice. Adipose Tissue. Blood Glucose. Glucose Tolerance Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação simpática da termogênese no tecido adiposo marrom, na mobilização lipídica do tecido adiposo branco, e na indução de células bege.....	11
Figura 2 - Desenho experimental.....	21
Figura 3 - Estimativa de ingestão alimentar e hídrica ao longo das quatro semanas de TRF.....	24
Figura 4 - Estimativa de consumo médio diário em quatro semanas de TRF.....	25
Figura 5 - Massa corporal total (MCT) e ganho de MCT dos animais em uma semana de TRF.....	26
Figura 6 - Massa corporal total (MCT) e ganho de MCT em quatro semanas de TRF.....	26
Figura 7 - Efeitos do TRF sobre o tecido adiposo branco periepididimal após uma e quatro semanas.....	28
Figura 8 - Efeitos do TRF sobre o tecido adiposo marrom interescapular após uma e quatro semanas.....	29
Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos tecidos adiposos após uma semana de TRF.....	30
Figura 10 - Fotomicrografias representativas dos tecidos adiposos após quatro semanas de TRF.....	30
Figura 11 - Glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose após uma semana de TRF.....	31
Figura 12 - Glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose após quatro semanas de TRF.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	TECIDO ADIPOSEO.....	10
2.2	METABOLISMO DA GLICOSE.....	13
2.3	CRONONUTRIÇÃO E <i>TIME-RESTRICTED FEEDING</i>	14
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	GERAL.....	19
3.2	ESPECÍFICOS.....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1	ANIMAIS.....	20
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
4.3	MEDIDA DO GANHO DE MASSA CORPORAL TOTAL E ESTIMATIVA DE INGESTÃO ALIMENTAR.....	21
4.4	MEDIDA DA GLICEMIA E TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG).....	22
4.5	EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS ADIPOSOS.....	22
4.6	HISTOLOGIA DOS TECIDOS ADIPOSOS.....	22
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	ESTIMATIVA DA INGESTÃO ALIMENTAR E HÍDRICA.....	24
5.2	MASSA CORPORAL TOTAL.....	25
5.3	TECIDO ADIPOSEO.....	27
5.4	GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG).....	31
6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXO A.....	45

1 INTRODUÇÃO

Estimativas recentes indicam que 36,5% dos americanos adultos são classificados como obesos, com índice de massa corpórea (IMC) igual ou superior a 30 kg/m^2 (OGDEN *et al.*, 2015). A obesidade está associada a alterações negativas em medidas de saúde geral, incluindo aumento da gordura abdominal, diminuição da aptidão física e, em certos casos, comprometimento da homeostase da glicose (HÄKKINEN *et al.*, 2010; MOYER, 2012). Uma vez que a prevalência da obesidade deverá aumentar nas próximas décadas, é evidente que novas intervenções são necessárias para impactar favoravelmente a composição corporal e a aptidão física em indivíduos obesos. Além disso, como a obesidade está fortemente ligada à resistência à insulina, desenvolver estratégias para reduzir o peso corporal é importante no que diz respeito à saúde metabólica e na redução do risco de diabetes *mellitus* tipo II (KAHN; FLIER, 2000).

Nos últimos anos, modificações dietéticas têm sido cada vez mais promovidas como potenciais auxiliares na prevenção e tratamento da obesidade e disfunções relacionadas à mesma. Uma delas é a alimentação com restrição de tempo (*time-restricted feeding*, TRF) que restringe os períodos de alimentação diária para determinadas horas do dia, estendendo o típico jejum noturno por várias horas. Pesquisas tanto em seres quanto em animais indicaram que o TRF pode ser um método bem-sucedido para reduzir a massa corporal e o tecido adiposo humanos (ARBLE *et al.*, 2009; MORO *et al.*, 2016; SHERMAN *et al.*, 2011; SHERMAN *et al.*, 2012; STOTE *et al.*, 2007). Além disso, estudos adicionais em humanos e animais observaram os benefícios do TRF no que diz respeito ao controle da glicemia (FAKHRZADEH *et al.*, 2003; FAROOQ *et al.*, 2006; HATORI *et al.*, 2012; MIRZAEI *et al.*, 2012; SHERMAN *et al.*, 2012; ZIAEE *et al.*, 2006).

Entretanto, a maioria dos estudos foca nos benefícios e modificações metabólicas em longo prazo, após pelos menos 6 semanas de TRF e variando até 18 semanas. Uma exceção é o trabalho de Farooq e colaboradores (2006) que avaliou o metabolismo de carboidratos após 30 dias de TRF. Mesmo assim, estudos com menos de quatro semanas sobre as alterações do TRF sobre o tecido adiposo e metabolismo de glicose ainda são escassos na literatura. Portanto, este trabalho propõe avaliar essas alterações após uma e quatro semanas de TRF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para compreender as possíveis ações da alimentação restrita ao tempo (*time-restricted feeding*, TRF) sobre o tecido adiposo e o metabolismo energético nas primeiras semanas quatro semanas, é necessário primeiramente lembrar a composição e função desse tecido, bem como uma visão geral do metabolismo da glicose, e revisar os achados sobre o TRF descritos até então na literatura.

2.1 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo, composto por adipócitos, pré-adipócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos, tem sido cada vez mais reconhecido como um importante atuante na regulação metabólica sistêmica. Como um reservatório de combustível, o tecido adiposo conserva o calor do corpo e controla a homeostase energética por meio do armazenamento e liberação de lipídios em resposta às necessidades metabólicas nutricionais sistêmicas (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007). A energia excedente é depositada eficientemente na forma de triglicérides neutros (TGs) no tecido adiposo através da via lipogênica. No entanto, o armazenamento de TGs neutros em adipócitos aumenta o tamanho da gota lipídica, o que resulta em expansão adiposa e subsequente obesidade (TAN; VIDAL-PUIG, 2008).

Durante períodos de jejum, os TGs reservados nos adipócitos são clivados a glicerol e ácidos graxos por uma via lipolítica, quando os requisitos de gasto energético são estimulados ou quando o armazenamento de TGs excede a capacidade de armazenamento dos adipócitos (LAFONTAN; LANGIN, 2009). O glicerol e os ácidos graxos liberados do tecido adiposo podem então ser transportados no sangue e, posteriormente, infiltrar-se em músculos, fígado e outros órgãos, impulsionando a distribuição lipídica e modulando o equilíbrio energético do corpo inteiro (FRAYN, 2002).

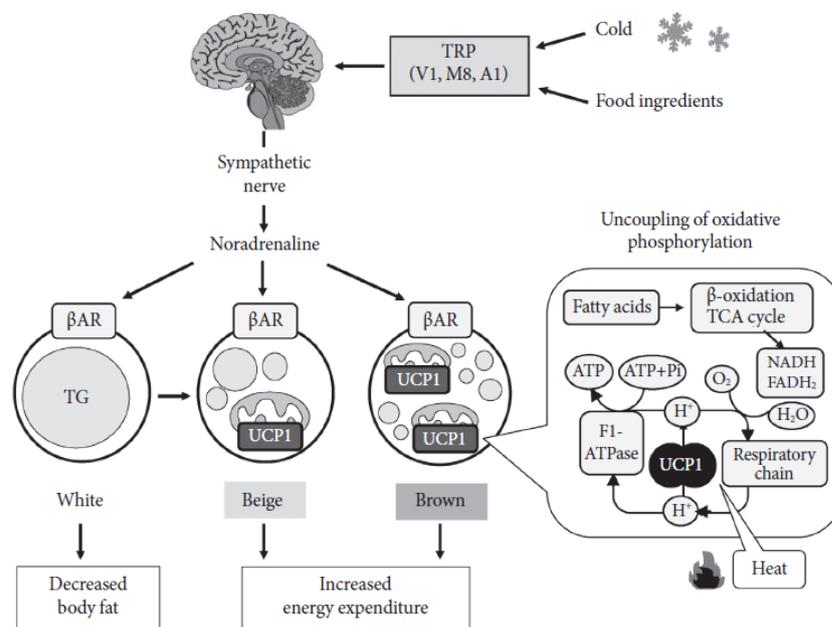
Este tecido se encontra distribuído por todo o corpo, em diversos depósitos, que em humanos incluem os tecidos adiposos do omento, mesentérico, retroperitoneal, perigonadal e pericardial, os quais em excesso são comumente associados a desordens metabólicas como o diabetes e doenças cardiovasculares (SHUSTER *et al.*, 2012; WAJCHENBERG, 2000).

O tecido adiposo pode ser classificado em dois subtipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Os adipócitos marrons, que em roedores são predominantemente contidos na região interescapular, contém gotas lipídicas multiloculares e

um alto número de mitocôndrias, sendo sua função primária dissipar a energia armazenada na forma de calor (ZWICK *et al.*, 2018). Nos seres humanos, quantidades significativas de TAM estão presentes em recém-nascidos e contribuem para a regulação da temperatura corporal durante o período neonatal. Também já foi confirmada a presença de tecido adiposo marrom em adultos, principalmente durante a exposição ao frio (VAN MARKEN LICHTENBELT *et al.* 2009; VIRTANEN *et al.*, 2009).

Nas mitocôndrias do TAM, há uma proteína de desacoplamento 1 (UCP1) na membrana interna (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000). Como a UCP1 é expressa seletivamente no TAM, e não em outros tecidos como o TAB, ela é reconhecida como um marcador molecular específico do adipócito marrom. A UCP1 atua desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, dissipando assim a energia como calor. A termogênese do TAM é regulada diretamente por nervos simpáticos distribuídos abundantemente neste tecido (Figura 1). Os eventos celulares associados com a ativação simpática da termogênese do TAM são a ligação da norepinefrina, liberada de terminais nervosos simpáticos, em receptores β -adrenérgicos, e a ativação de adenilato ciclase e lipase hormônio-sensível, que hidrolisa os triglicerídeos intracelulares. Os ácidos graxos liberados ativam a UCP1 e são oxidados na mitocôndria, servindo como uma fonte energética da termogênese (SAITO, 2013).

Figura 1 - Ativação simpática da termogênese no tecido adiposo marrom, na mobilização lipídica do tecido adiposo branco, e na indução de células bege.



Fonte: SAITO, 2013.

Nota: A atividade do nervo simpático nos tecidos adiposos é aumentada em resposta à exposição ao frio e à ingestão oral de alguns ingredientes alimentares através da ativação de canais potenciais de receptores transitórios (TRP). A noradrenalina liga-se a receptores β -adrenérgicos (β AR) e inicia a sinalização em cascata para a hidrólise de triglicerídeos (TG). Os ácidos graxos liberados ativam a proteína UCP1 e são oxidados para servir como fonte energética da termogênese. A UCP1 ativada desacopla a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e dissipa a energia como calor. A ativação simpática crônica não só causa hiperplasia do tecido adiposo marrom, mas também a indução de células bege no tecido adiposo branco, aumentando assim o gasto energético de todo o corpo e diminuindo a gordura corporal.

Curiosamente, há alguns anos tem sido reconhecido outro tipo de tecido adiposo chamado de gordura “bege”, no qual a expressão de UCP1 pode ser estimulada pelo estresse ao frio ou por agonistas do receptor beta-adrenérgico subtipo 3 que imitam o estresse ao frio (BARBATELLI *et al.*, 2010; BOSTROM *et al.*, 2012). Ambas as gorduras marrom e bege têm características termogênicas e podem oferecer uma nova maneira de controlar o sobrepeso, obesidade e outros distúrbios metabólicos.

A termogênese realizada pelos adipócitos marrons requer uma fonte de combustível, proveniente de lipídios derivados de seu próprio armazenamento, do armazenamento no tecido adiposo branco, ou da dieta (HIMMS-HAGEN, 1989). Assim, a termogênese pelo TAM é um componente de gasto global de energia que envolve especificamente a combustão de lipídios.

Ademais, nos últimos anos, o tecido adiposo branco tem sido identificado como um órgão secretor, pois produz e libera vários fatores peptídicos e não peptídicos denominados adipocinas. Desde que a primeira adipocina, a leptina, foi descoberta em 1994, foram atribuídas diversas funções vitais ao tecido adiposo, tornando-o um órgão endócrino propriamente dito. Novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de investigar os principais mecanismos moleculares e hormonais do tecido adiposo e a inter-relação destes com o sistema nervoso central, visando compreender a regulação entre o consumo e o gasto energético (TSCHOP; MORRISON, 2001). Dentre todas as adipocinas relacionadas com processos inflamatórios, como a obesidade, sem dúvida, a leptina, o TNF- α , e a adiponectina vêm recebendo atenção especial da literatura especializada.

A leptina caracteriza-se como um hormônio polipeptídeo de 167 aminoácidos, codificado pelo gene *ob*, que é expresso principalmente nos adipócitos, tanto de seres humanos quanto de roedores. Esse hormônio atua como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar, a saciedade, o gasto energético e, conseqüentemente, a massa corporal total (CAMPFIELD *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1994).

O TNF- α apresenta grande diversidade de atividades biológicas, as quais incluem: respostas imunológicas, reações inflamatórias e neovascularização (PRADO *et al.*, 2009). Ele é um potente regulador interno do tecido adiposo, atuando de forma autócrina e parácrina, desenvolvendo um papel fundamental relacionado com a produção de várias citocinas e adipocinas, sendo o regulador-chave da síntese de IL-6 (COOPACK, 2001).

A adiponectina, também conhecida como proteína complementar relacionada ao adipócito (Acrp 30) é o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo de humanos, macacos e roedores, e está envolvida na resposta inflamatória e regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório (PRADO *et al.*, 2009). Essa adipocina também aumenta a sensibilidade à insulina e inibe a inflamação vascular (SCHERER *et al.*, 1995).

2.2 METABOLISMO DA GLICOSE

O pâncreas endócrino secreta dois hormônios peptídicos principais, insulina e glucagon, cujas funções coordenadas regulam o metabolismo da glicose, dos ácidos graxos e dos aminoácidos. As células endócrinas do pâncreas estão dispostas em aglomerados, chamados ilhotas de Langerhans que contêm tipos celulares diferentes, e cada tipo celular secreta hormônio ou peptídeo diferente. As células beta compõem 65% das ilhotas e secretam insulina, já as células alfa compõem 20% das ilhotas e secretam glucagon (GUYTON; HALL, 2011).

A secreção de insulina pelas células beta é estimulada pelo aumento da concentração sanguínea de glicose. A membrana da célula beta contém GLUT2, um transportador específico para a glicose que transporta a glicose do sangue para a célula por difusão facilitada. Uma vez dentro da célula, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase podendo, a partir daí, ser oxidada e gerar como produto final o ATP. O aumento de ATP fecha os canais de K^+ sensíveis às variações de ATP, despolarizando a membrana. Os canais de Ca^{2+} regulados por voltagem então se abrem devido a despolarização, e o Ca^{2+} flui para a célula beta a favor de seu gradiente eletroquímico. Finalmente, o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} provoca exocitose dos grânulos secretores de insulina (GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2014).

O mecanismo de ação da insulina nas células alvo depende da interação entre a insulina e seu receptor. A insulina se liga às subunidades alfa de seu receptor, alterando sua conformação que ativa a enzima tirosina quinase da subunidade beta. A tirosina quinase

ativada fosforila muitas outras proteínas ou enzimas participantes nas ações fisiológicas da insulina. O complexo insulina-receptor é internalizado pelas células-alvo por endocitose e o receptor de insulina pode ser degradado pelas proteases, armazenado, ou reciclado de volta à membrana celular. A insulina regula para menos o seu próprio receptor, por diminuir sua intensidade de síntese e aumentar a intensidade da sua degradação. Essa regulação para menos da insulina é, em parte, responsável pela sensibilidade diminuída à insulina dos tecidos-alvo, na obesidade e no diabetes *mellitus* tipo II (GUYTON; HALL, 2011).

Quando a disponibilidade de nutrientes excede as demandas do organismo, a insulina assegura que os nutrientes em excesso sejam armazenados como glicogênio no fígado, como lipídio no tecido adiposo e como proteína no músculo. Esses nutrientes armazenados estarão disponíveis durante os períodos de jejum subsequentes, mantendo a oferta de glicose para o cérebro, músculo e outros órgãos. Portanto, a insulina possui ação hipoglicemiante que resulta de respostas coordenadas que estimulam a oxidação da glicose e inibem a gliconeogênese (formação de glicose) e a glicogenólise (degradação de glicogênio). A insulina aumenta o transporte de glicose nas células-alvo como músculo e tecido adiposo, por comandar a inserção de transportadores de glicose (GLUT4) nas membranas celulares, além de ainda promover a formação de glicogênio a partir da glicose no fígado e no músculo, inibindo a glicogenólise ao mesmo tempo (GUYTON; HALL, 2011).

Controversamente, as ações do glucagon são coordenadas para aumentar e manter a glicemia. O principal fator estimulador da secreção de glucagon é a concentração sanguínea de glicose diminuída, que, paralelamente, inibe a secreção de insulina. O glucagon promove a mobilização e a utilização de nutrientes armazenados para manter a concentração sanguínea de glicose no jejum. Em períodos de jejum, o glucagon aumenta a glicemia ao estimular a glicogenólise e, simultaneamente, a gliconeogênese. Além disso, o glucagon aumenta a lipólise e inibe a síntese dos ácidos graxos, o que também desvia os substratos para a gliconeogênese. Finalmente, cetoácidos são produzidos a partir da β -oxidação dos ácidos graxos (GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2014).

2.3 CRONONUTRIÇÃO E *TIME-RESTRICTED FEEDING*

Nos seres humanos, como em outros organismos vivos, o comportamento e a fisiologia são regulados pelo relógio circadiano, que permite a adaptação às diferentes fases do dia. Em particular, o metabolismo humano é cada vez mais reconhecido como sendo altamente influenciado por ritmos circadianos que possuem aproximadamente 24 h de duração

("circa diem"). Os ritmos circadianos separam processos bioquímicos e fisiológicos incompatíveis, otimizam o gasto energético e sincronizam vias metabólicas (PANDA, 2016). Assim, o bom funcionamento dos relógios circadianos é fundamental para manter a saúde metabólica. A perturbação circadiana, por exemplo, pelo trabalho de turnos crônico, leva à desregulação da homeostase metabólica e está associada ao aumento do risco de obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (ANTUNES *et al.*, 2010; DE BACQUER *et al.*, 2009; VETTER *et al.*, 2016).

Recentemente, um crescente corpo de evidências sugere que o horário de alimentação contribui fortemente à regulação do estado metabólico e do peso corporal (JIANG; TUREK, 2017; ASHER; SASSONE-CORSI, 2015; ALLISON; GOEL, 2018). Aparentemente, estratégias baseadas no horário das refeições podem ser empregadas para prevenir a obesidade e doenças em indivíduos jovens e idosos. A crononutrição, uma nova disciplina que investiga a relação entre ritmos circadianos, nutrição e metabolismo, tem, portanto, atraído a atenção nos últimos anos (GARRIDO; TERRON; RODRIGUEZ, 2013; JOHNSTON *et al.*, 2016). A palavra "crononutrição" significa que o horário da alimentação é coordenado com os ritmos circadianos do corpo e remete a ideia de que o horário da ingestão de alimentos é tão crítico quanto a quantidade e a qualidade desse alimento.

Nos mamíferos, o padrão de ritmicidade circadiana é gerado pelo núcleo supraquiasmático (NSC) do hipotálamo, com populações de neurônios que expressam determinados genes em sincronismo com o ciclo-claro-escuro ambiental, sendo considerado o nosso relógio mestre. Por meio de sinais neuro-humorais, que incluem a melatonina, hormônio indutor de sono em seres humanos, o NSC controla os demais osciladores periféricos encontrados em praticamente todos os tecidos, incluindo o fígado, coração, rins, intestino, músculos esqueléticos, células sanguíneas e adipócitos. Além da luz ambiental, o consumo de alimentos e o horário de alimentação representam estímulos externos que podem afetar o relógio circadiano, causando aquilo que os cronobiologistas chamam de arraste de fase, ou seja, mudanças no padrão oscilatório, principalmente nos relógios circadianos periféricos (e, em menor grau, no relógio central). Em outras palavras, apesar de seres humanos apresentarem um genoma determinante de hábitos diurnos, as mudanças no horário de alimentação, como por exemplo, aquelas induzidas por mudanças no turno de trabalho, podem causar um arraste no padrão de secreção de hormônios indutores da fome, como é o caso da grelina, sem que ocorra obrigatoriamente o ajuste metabólico necessário para um processo de digestão e absorção eficiente dos nutrientes. Assim, os ritmos diários do

metabolismo surgem de uma complexa interação do relógio autônomo endógeno, exposição à luz/escurecimento e padrões de jejum/alimentação.

O mecanismo do relógio circadiano se baseia em controlar a expressão rítmica de numerosos genes, isto é, genes controlados pelo relógio (*clock-controlled genes*, CCG), que são principalmente fatores de transcrição ou enzimas limitadoras de taxa de transcrição, que por sua vez organizam ritmos de genes e processos metabólicos (PANDA, 2016). Estudos em camundongos nocautes para o gene do relógio circadiano central demonstraram que diferentes genes do relógio contribuem para a regulação de diferentes processos metabólicos e que este regulamento é tecido-específico (LAMIA; STORCH; WEITZ, 2008; PASCHOS *et al.*, 2012; TUREK *et al.*, 2005). Portanto, perturbações nesse relógio genético podem levar a disfunções do metabolismo de glicose e lipídios e desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo II e doenças metabólicas associadas.

Embora seja comumente assumido que a maioria das pessoas comem café da manhã, almoço e jantar, além de lanchar aproximadamente duas vezes, a realidade é bem diferente. Usando um aplicativo de smartphone, Gill e Panda (2015) revelaram um frequente e errático padrão alimentar diário de adultos saudáveis americanos, com até 11 eventos alimentares por dia, sendo 25% da ingestão ocorrendo antes do meio-dia, e 35% da ingestão ocorrendo após as 18:00 h. Mais da metade dos adultos comem dentro de um período de 15 h ou mais a cada dia, e este período de alimentação é muitas vezes deslocado para ainda mais tarde nos fins de semana (ROENNEBERG *et al.*, 2012).

A maioria das recomendações para controle do peso frequentemente incluem a recomendação de se alimentar regularmente e em alta frequência para evitar a fome. Entretanto, evidências atuais sugerem que períodos regulares de jejum não levam necessariamente a um aumento na ingestão calórica. A revisão de Lushchak *et al.* (2018) traz a fome como o efeito colateral primário dos vários tipos de jejum intermitente por ser uma resposta adaptativa à privação de alimentos, regulada por várias mudanças neuroendócrinas, sensoriais e cognitivas. Os hormônios grelina, NPY e orexinas estimulam o apetite e promovem a deposição de gordura. A grelina é produzida no estômago e desenvolve um papel importante no ritmo circadiano de ingestão alimentar. Em condições normais, os níveis de grelina, ligante endógeno do receptor secretagogo de GH, estimula a secreção de GH estimulando o apetite e o comportamento de busca por alimento. Em contraste, a insulina e a leptina diminuem a fome. Um efeito colateral do TRF seria um desequilíbrio entre os hormônios de fome e saciedade que pode levar ao desenvolvimento de transtornos alimentares, como a compulsão alimentar.

Curiosamente, estudos avaliando a secreção de grelina em condições de jejum em humanos, revelam que a secreção pulsátil desse hormônio se mantém constante ou até mesmo diminui durante o jejum, e sua liberação não estimula a liberação de GH, nem está relacionada com os níveis de insulina ou glicose (ESPELUND *et al.*, 2005; NATALUCCI *et al.*, 2005; WIJNGAARDEN *et al.*, 2014). Esses achados contradizem a visão tradicional de que o jejum induziria um estado de compulsão alimentar, tendo como causa um aumento dos níveis circulantes de grelina. Outros efeitos colaterais também são discutidos na revisão de Lushchak *et al.* (2018), no entanto, boa parte desses efeitos é causada devido a períodos de jejum muito extensos, e podem ser prevenidos utilizando-se a variação de jejum intermitente que leva em conta as fases de atividade e descanso diárias e os ritmos circadianos: o TRF.

A alimentação com restrição de tempo ou *time-restricted feeding* (TRF) é um termo frequentemente usado na cronobiologia, que significa a restrição do acesso alimentar entre 2 a 12 h durante o dia ou noite (MANOOGIAN; PANDA, 2017). Se o período de acesso aos alimentos for < 6 h, os animais não conseguem comer a mesma quantidade de alimentos que os animais *ad libitum*; no entanto, se o período de acesso aos alimentos é maior que 8 h, a quantidade de alimentos consumidos no grupo TRF quase equivale à quantidade do grupo *ad libitum* (KESSLER; PIVOVAROVA-RAMICH, 2019). Conseqüentemente, este período de tempo é usado frequentemente nos experimentos com TRF. Ainda assim, restringir a alimentação para a fase circadiana "errada" pode causar efeitos metabólicos adversos, mas restringir a alimentação para a fase circadiana "certa" (fase escura em roedores) tem demonstrado proteger o metabolismo contra distúrbios induzidos por dietas obesogênicas.

Estudos experimentais confirmam que o desalinhamento entre ciclos comportamentais (jejum/alimentação e ciclos de sono/vigília) e os ciclos circadianos endógenos induz ganho de peso e distúrbios metabólicos em roedores bem como intolerância à glicose, deterioração do metabolismo de ácidos graxos, e até mesmo desregulação do transcriptoma circadiano nos seres humanos (ARCHER *et al.*, 2014; SALGADO-DELGADO *et al.*, 2010; SCHEER *et al.*, 2009; WEFERS *et al.*, 2018). Um estudo com dieta *high fat* (dieta com alto teor de gordura) em roedores demonstrou que o livre acesso à ração durante o dia e a noite perturba o ciclo de alimentação noturno normal nesses animais. Os roedores expostos à dieta *high fat* se tornam obesos, metabolicamente disfuncionais e podem desenvolver diabetes tipo II. Entretanto, os camundongos cuja dieta *high fat* foi restringida a 8 horas durante o período de alimentação noturno normal consumiram energia equivalente, porém não desenvolveram obesidade, hiperinsulinemia, esteatose hepática e inflamação quando comparados ao grupo *high fat ad libitum* (HATORI *et al.*, 2012). Entretanto, não foi possível distinguir se a disfunção

metabólica do grupo *high fat ad libitum* foi causada pelo conteúdo da dieta, pela perturbação do ciclo circadiano ou uma combinação desses fatores.

Duas publicações recentes revisaram o modelo de TRF em roedores (LONGO; PANDA, 2016; ROTHSCHILD *et al.*, 2014). Foi observado que vários estudos utilizavam intervalos de jejum diários abrangendo de 12 a 21 horas e variavam quanto à coordenação com o ciclo claro-escuro e a composição da ração. Apesar da heterogeneidade dos estudos, no geral, o TRF foi associado a reduções de massa corporal, colesterol total, triglicérides, glicose, insulina, interleucina 6 (IL-6) e TNF- α , bem como a uma melhora na sensibilidade à insulina. Além disso, quase todos os estudos de jejum em roedores foram conduzidos em camundongos machos. Porém, o estudo de Chung *et al.* (2016) aplicou o jejum por restrição de tempo como estratégia de intervenção em camundongos fêmeas, obesas e menopausadas e concluiu que os benefícios metabólicos gerais dessa dieta se aplicam tanto para machos quanto para fêmeas.

Mesmo assim, de acordo com a revisão de Patterson e Sears (2017), grande parte da evidência científica para os benefícios na saúde causados pelo TRF vem principalmente de estudos em roedores machos. Além disso, a revisão de Patterson e Sears concluiu que os estudos em roedores e outros mamíferos noturnos corrobora a hipótese de que o TRF, ao restringir a disponibilidade de alimentos para o ciclo normal de alimentação noturna, melhora perfis metabólicos e reduzem os riscos de obesidade e condições relacionadas, tais como a esteatose hepática não alcoólica, e doenças crônicas, como diabetes e câncer. Portanto, a escolha da realização do jejum de acordo com o ciclo claro/escuro (12 em 12 horas) de camundongos machos em nosso estudo é justificada.

Sendo assim, faz-se necessária uma maior investigação científica nessa área para elucidar os efeitos e eventuais mecanismos que o TRF causa em seus estágios iniciais, de modo a despertar o interesse da população a um possível método de controle de peso e parâmetros metabólicos associados.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o efeito do TRF em curto prazo sobre os tecidos adiposos branco e marrom, além do perfil glicêmico em camundongos submetidos a uma dieta padrão.

3.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar se o TRF altera a ingestão alimentar e hídrica;
- b) Investigar se o TRF em curto prazo diminui a massa corporal total;
- c) Avaliar se TRF diminui a massa de tecido adiposo branco periepididimal (pTAB);
- d) Investigar se o TRF altera a massa de tecido adiposo marrom interescapular (iTAM);
- e) Avaliar se o TRF diminui o tamanho da célula adiposa no pTAB;
- f) Determinar a porcentagem lipídica em cortes histológicos de iTAM;
- g) Avaliar o efeito do TRF sobre a glicemia de jejum e a tolerância oral à glicose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Nesse projeto foram utilizados 40 camundongos machos adultos da linhagem Swiss, pesando aproximadamente 40 gramas e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram alojados em caixas individuais com enriquecimento ambiental (rolinhos de papel cartonado), tratados com ração comercial (Nuvlab™) e água, e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo de 12 horas claro-escuro. Todos os animais utilizados nesse estudo foram manipulados segundo os preceitos éticos de experimentação animal aprovados pela CEUA-UNIFAL (protocolo nº 12/2018, ANEXO A).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para o tratamento, os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o Quadro 1. Os grupos submetidos ao TRF tiveram acesso à ração apenas no período noturno, das 19h às 7h de acordo com o ciclo claro-escuro do biotério. Os grupos controles tiveram acesso ininterrupto e *ad libitum* à ração.

Quadro 1 - Grupos experimentais.

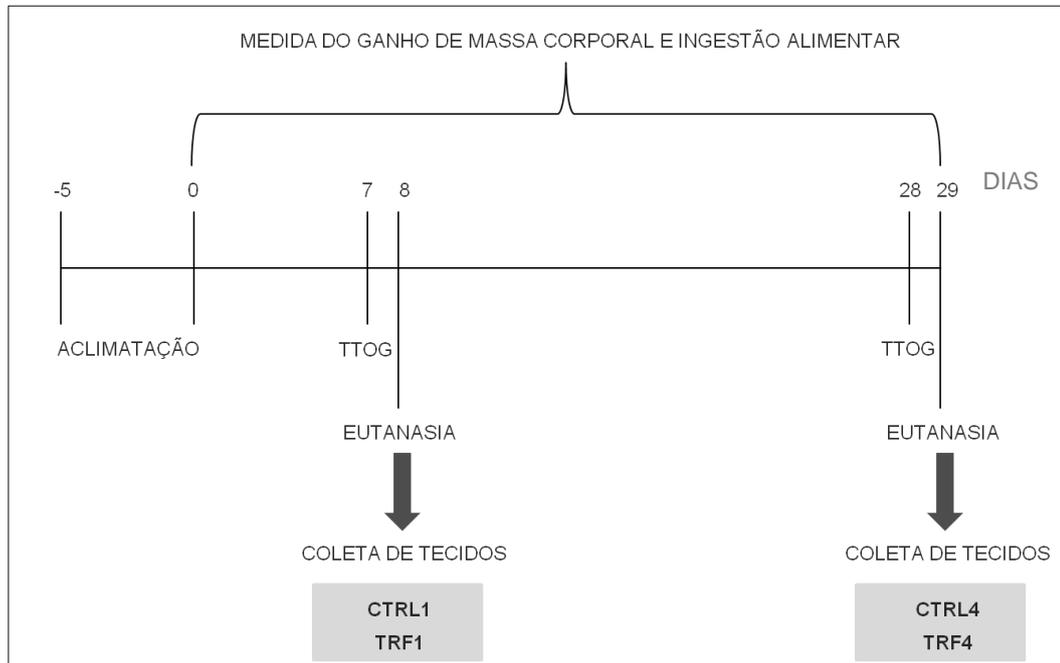
Grupos Experimentais	<i>n</i>
TRF por 1 semana (TRF1)	10
<i>Ad libitum</i> por 1 semana (CTRL1)	10
TRF por 4 semanas (TRF4)	10
<i>Ad libitum</i> por 4 semanas (CTRL4)	10

Fonte: Da autora.

Como demonstrado na figura 2, após a aclimação dos animais ao biotério por cinco dias, o experimento foi dividido em duas etapas: I) A primeira etapa teve duração de uma semana, onde dois grupos experimentais foram avaliados; o grupo TRF1 (que realizou jejum de 12 horas no período diurno) e o grupo CTRL1 (controle com dieta *ad libitum*); II) a segunda etapa teve duração de quatro semanas onde foram avaliados os grupos TRF4 e

CTRL4, seguindo os mesmos parâmetros da etapa I. Durante todo o tratamento foram mensurados a massa corporal total, o consumo de ração e a ingestão líquida de cada animal. Após a primeira e quarta semanas, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose e posteriormente foram eutanasiados para a coleta de tecidos.

Figura 2 - Desenho experimental.



Fonte: Da autora.

Nota: TTOG: teste de tolerância oral à glicose; TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

4.3 MEDIDA DO GANHO DE MASSA CORPORAL TOTAL E ESTIMATIVA DE INGESTÃO ALIMENTAR

A medida do ganho de massa corporal total (MCT) foi obtida semanalmente subtraindo-se a massa inicial do animal em gramas (g) da massa final (g). Semelhantemente, a ingestão de ração foi calculada a cada 2 dias subtraindo-se a quantidade de ração (g) restante na caixa da quantidade inicial (g) oferecida aos animais. Uma balança eletrônica de precisão (Modelo BL3200H, Marte™) foi utilizada para todos os processos de pesagem. Após essas medições, a estimativa da ingestão alimentar em gramas de ração por 100g de massa corporal foi calculada para cada animal. A estimativa da ingestão de água foi mensurada com o auxílio de uma proveta subtraindo-se a quantidade de água restante (ml) da quantidade inicial (ml) e esta medida também foi corrigida por 100g de massa corporal.

4.4 MEDIDA DA GLICEMIA E TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG)

Para a determinação da glicemia em jejum e durante o TTOG, foi utilizado um glicosímetro digital (G-TECH Free 1™). O TTOG foi realizado após uma e quatro semanas de tratamento. Nos dois dias anteriores ao teste, os camundongos foram adaptados à gavagem com solução salina 0,9%. No dia do teste, todos os grupos foram submetidos a jejum de 8 horas (iniciado às 7h) e foi então mensurada a glicemia de jejum. Logo após, foi administrada por gavagem uma solução de glicose 50% (1,5g/kg peso) e mensurada a glicemia após 30, 60 e 120 minutos.

4.5 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS ADIPOSOS

A eutanásia foi realizada após o último ciclo de 12h jejum/12h *ad libitum*, no horário em que seria feita a retirada da ração dos grupos TRF. Todos os animais foram anestesiados previamente com isoflurano inalatório (4% em dissecador de vidro), de acordo com a tabela de Doses de Agentes para Camundongos fornecida pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG, e em seguida foram decapitados em guilhotina. Após a decapitação, o tecido adiposo branco periepididimal (pTAB) e o tecido adiposo marrom interescapular (iTAM) foram dissecados, coletados e pesados em balança analítica (Shimadzu™, modelo AUY220). Os resultados foram normalizados e expressos em gramas de tecido por 100 gramas de massa corporal.

4.6 HISTOLOGIA DOS TECIDOS ADIPOSOS

Após a coleta e pesagem do material, este foi armazenado em paraformaldeído por 48h e transferido para álcool 70% por mais 24h. Em seguida, foram feitos banhos de álcool para desidratação e passagem por xilol de acordo com o Quadro 2, para inclusão em resina histológica:

Quadro 2 - Inclusão em resina histológica.

Processo	Tempo
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Xilol	1 hora
Álcool 100%	2 horas
Álcool 100%	2 horas
Álcool-Resina (1:1)	Overnight
Resina pura	24 horas
Resina pura	2 horas

Fonte: Da autora.

Após ser emblocado em resina, o material foi colado em blocos de madeira para que pudesse passar pelo processo de microtomia feita em micrótomo Yedi™, onde os cortes tiveram 6µm de espessura e foram colocados em lâminas histológicas. Os cortes foram corados com azul de toluidina (2 minutos), cobertos com lamínula e analisados utilizando-se os programas de imagens AxioVision® e ImageJ®.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

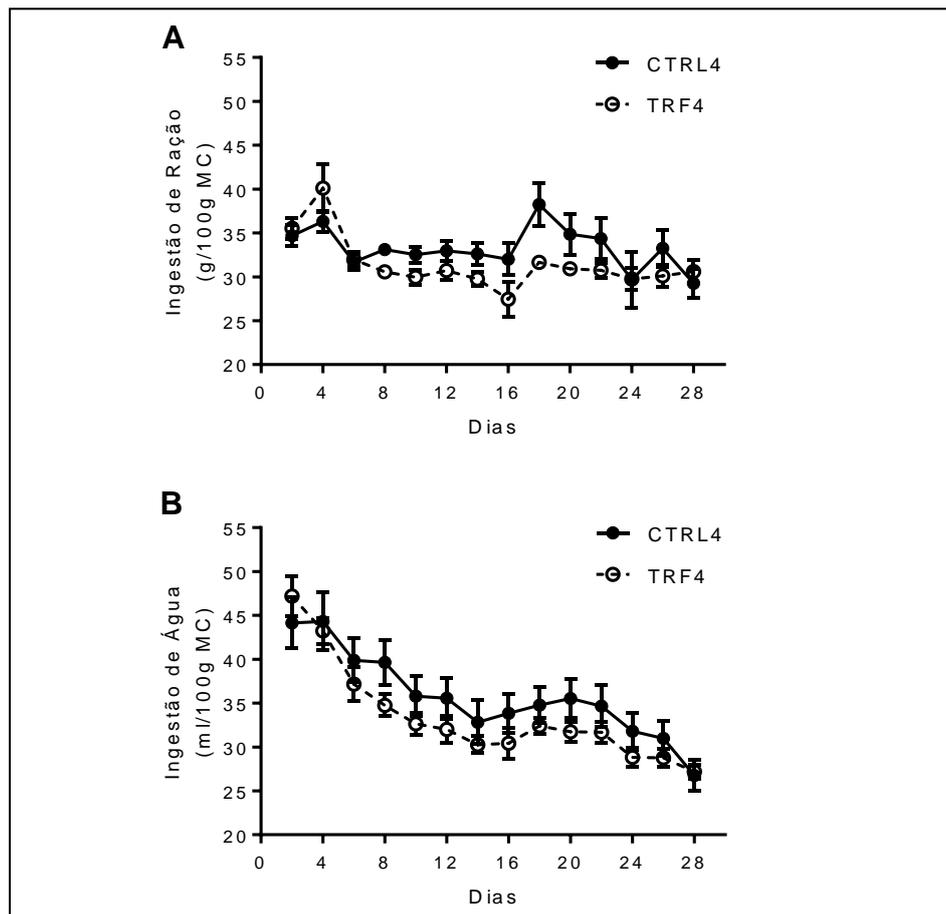
Todos os resultados obtidos nesses estudos foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). Primeiramente, os dados passaram pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados que seguiam a distribuição normal foram analisados com o teste-t de Student bi- ou unicaudal não pareado para a comparação de uma variável (ex: massa corporal) entre 2 grupos (ex: CTRL1 e TRF1). Os dados que não se adequavam à distribuição normal foram analisados com o teste não paramétrico de Mann-Whitney bi- ou unicaudal, nas mesmas condições de comparação anteriores. Para a comparação entre 2 variáveis (ex: massa corporal e tempo) entre grupos (ex: CTRL4 e TRF4), foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) e o pós-teste de Sidak, quando apropriado. Os dados foram analisados no software de análises estatísticas GraphPad Prism®. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significantes.

5 RESULTADOS

5.1 ESTIMATIVA DE INGESTÃO ALIMENTAR E HÍDRICA

A seguir, na figura 3, observamos a variação do consumo de ração (3A) e água (3B) a cada dois dias durante as quatro semanas de TRF e foi constatado que não houve diferença de consumo entre os grupos ($p > 0,05$). A estimativa de ingestão alimentar média diária com ração padrão também não foi diferente entre os animais CTRL4 ($16,63 \pm 0,65\text{g}/100\text{g MC}$) e TRF4 ($15,71 \pm 0,42\text{g}/100\text{g MC}$), como demonstrado na figura 4A. O mesmo ocorreu com o consumo médio diário de água, o qual foi semelhante entre os grupos CTRL4 ($17,87 \pm 1,09\text{ml}/100\text{g MC}$) e TRF4 ($16,72 \pm 0,52\text{ml}/100\text{g MC}$) e pode ser visualizado na figura 4B. Estes resultados demonstram que os demais achados nesse trabalho não foram devido a uma diferença de consumo alimentar, mas apenas ao TRF.

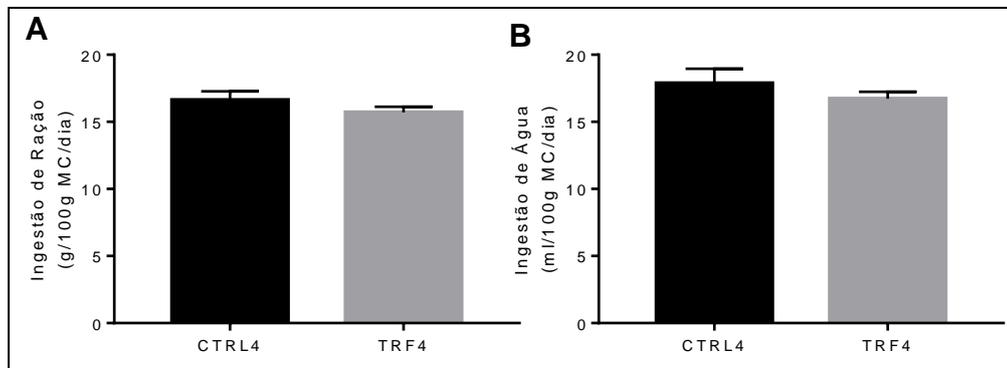
Figura 3 - Estimativa de ingestão alimentar e hídrica ao longo das quatro semanas de TRF.



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Consumo de ração a cada dois dias de TRF. Two-way ANOVA ($p > 0,05$ em relação ao tratamento; $n = 10$; $F(1, 18) = 1,417$). (B) Consumo de água a cada dois dias de TRF. Two-way ANOVA ($p > 0,05$ em relação ao tratamento; $n = 10$; $F(1, 18) = 0,9062$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

Figura 4 - Estimativa de consumo médio diário em quatro semanas de TRF.



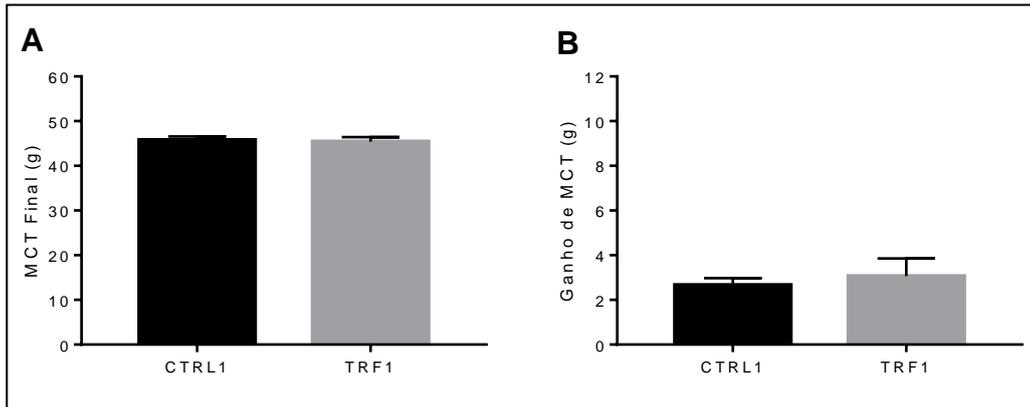
Fonte: Da autora.

Nota: (A) Ingestão média de ração diariamente. Teste de Mann-Whitney bicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (B) Média de ingestão diária de água. Teste de Mann-Whitney bicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

5.2 MASSA CORPORAL TOTAL

A massa corporal total (MCT) foi mensurada antes e após os experimentos, bem como o ganho de peso. Os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos, de maneira que a MCT inicial não foi diferente entre eles. Na figura 5, pode-se observar que a MCT final (5A) foi semelhante ($p > 0,05$) e que o ganho de MCT (5B) em uma semana de TRF também não foi diferente entre os grupos CTRL1 ($2,66 \pm 0,31g$) e TRF1 ($3,06 \pm 0,79g$). Adiante, na figura 6, são demonstrados os dados de MCT após quatro semanas de TRF. Da mesma forma, a MCT final (6A) foi equivalentes ($p > 0,05$), bem como o ganho de peso (6B) entre os grupos CTRL4 ($8,02 \pm 1,27g$) e TRF4 ($9,19 \pm 1,03g$). Além disso, a variação da MCT semanalmente, como mostrado na figura 6C, não foi alterada pelo TRF ($p > 0,05$ em relação ao tratamento). Esses resultados apontam que apenas uma e quatro semanas de TRF não são suficientes para se observar uma alteração na MCT.

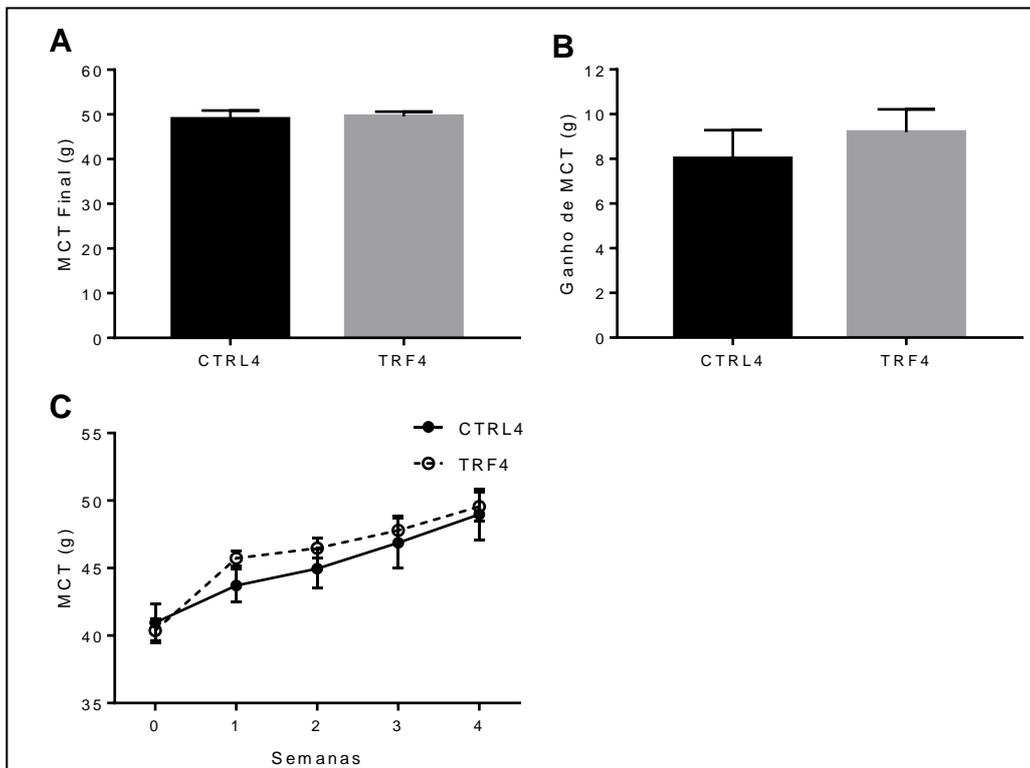
Figura 5 - Massa corporal total (MCT) e ganho de MCT dos animais em uma semana de TRF.



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Massa corporal total ao final de uma semana de TRF. Teste-t unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (B) Ganho de peso em uma semana de TRF. Teste de Mann-Whitney unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

Figura 6 - Massa corporal total (MCT) e ganho de MCT em quatro semanas de TRF.



Fonte: Da autora.

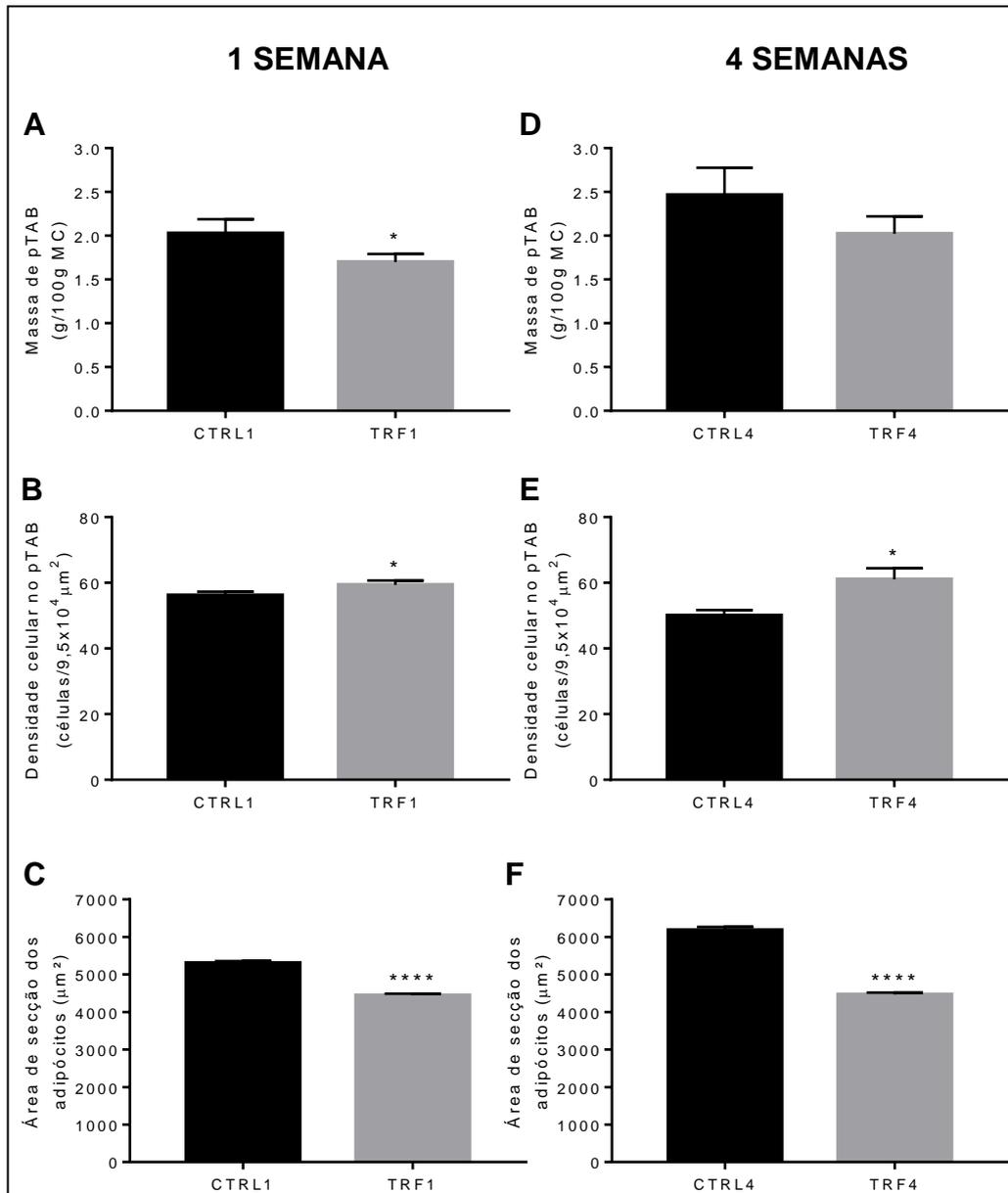
Nota: (A) Massa corporal total ao final de quatro semanas de TRF. Teste-t unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (B) Ganho de MCT em quatro semanas de TRF. Teste de Mann-Whitney unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (C) Massa corporal total ao longo das quatro semanas de TRF. Two-way ANOVA ($p > 0,05$ em relação ao tratamento; $n = 10$; $F(1, 18) = 0,2906$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

5.3 TECIDO ADIPOSEO

Um de nossos resultados mais interessantes foi a diminuição ($p < 0,05$) da massa do tecido adiposo branco periepididimal (pTAB) após apenas 1 semana de TRF (figura 7A, CTRL1 = $2,03 \pm 0,16\text{g}/100\text{g MC}$ vs. TRF1 = $1,70 \pm 0,09\text{g}/100\text{g MC}$), acompanhada pela diminuição da célula adiposa, que é evidenciada pela maior densidade celular por área ($p < 0,05$, figura 7B) e menor área de secção celular ($p < 0,0001$, figura 7C). Entretanto, a massa de pTAB dos grupos CTRL4 ($2,46 \pm 0,31\text{g}/100\text{g MC}$) e TRF4 ($2,02 \pm 0,20\text{g}/100\text{g MC}$) foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) como apresentado na figura 7D. Apesar disso, é perceptível que a massa de pTAB do grupo TRF4 tende a diminuir devido a evidências encontradas na análise histológica desse tecido. As figuras 7E e 7F, as quais mostram uma maior densidade celular ($p < 0,05$) e menor área de secção celular ($p < 0,0001$), apontam para uma diminuição do tamanho da célula adiposa nos animais TRF4, sugerindo um aumento da lipólise devido aos recorrentes períodos de jejum. As fotomicrografias representativas dos pTAB após 1 e 4 semanas de TRF podem ser vistas nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Ao observar a figura 8, que mostra os resultados sobre o tecido adiposo marrom interescapular (iTAM), pode-se perceber que a massa de iTAM dos grupos TRF1 ($0,44 \pm 0,01\text{g}/100\text{g MC}$) e TRF4 ($0,53 \pm 0,03\text{g}/100\text{g MC}$) vieram a ser maiores ($p < 0,01$, figuras 8A e 8C) em comparação aos seus respectivos controles CTRL1 ($0,36 \pm 0,02\text{g}/100\text{g MC}$) e CTRL4 ($0,39 \pm 0,03\text{g}/100\text{g MC}$). Essa diferença aponta para um provável aumento na termogênese dos animais que foram submetidos ao jejum intermitente. Para investigar em nível tecidual, foi realizada a histologia dos iTAM e observada a porcentagem de lipídios nas fotomicrografias histológicas. O resultado pode ser visto nas figuras 8B e 8D, as quais revelam que não houve diferença ($p > 0,05$) na porcentagem de lipídios após uma semana de TRF (CTRL1 = $52,32 \pm 0,85\%$ vs. TRF1 = $53,33 \pm 0,78\%$), porém, após 4 semanas de TRF, observa-se um pequeno aumento ($p < 0,05$) na porcentagem de lipídios do grupo TRF4 ($52,32 \pm 0,83\%$) em comparação ao grupo CTRL4 ($51,02 \pm 0,64\%$). Entretanto, esse pequeno aumento na porcentagem de lipídios não justifica o aumento da massa de iTAM, pois não foi observado em 1 semana de TRF. As fotomicrografias representativas dos iTAM após 1 e 4 semanas de TRF podem ser vistas nas figuras 9 e 10, respectivamente.

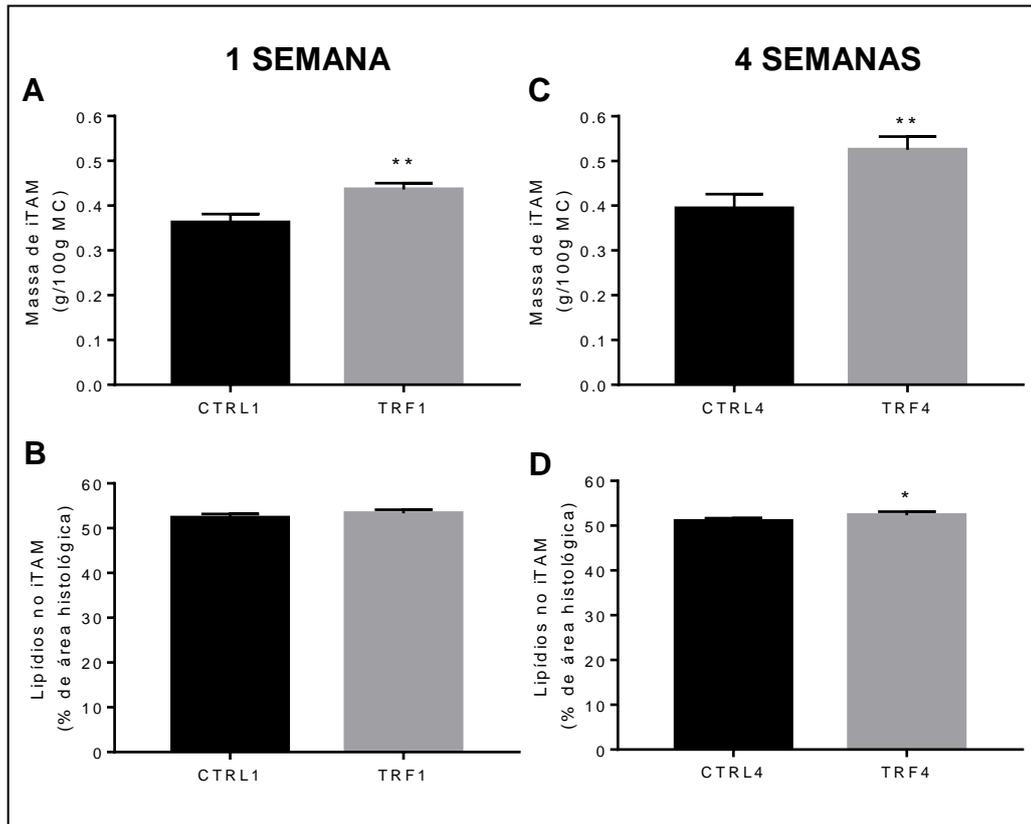
Figura 7 - Efeitos do TRF sobre o tecido adiposo branco periepididimal após uma e quatro semanas.



Fonte: Da autora.

Nota: Massa, densidade celular e área de secção dos adipócitos do tecido adiposo branco periepididimal após 1 (A, B e C) e 4 (D, E e F) semanas de TRF. (A, B) Teste-t unicaudal não pareado (* $p < 0,05$ em relação ao controle, $n = 10$). (C, D, E e F) Teste de Mann-Whitney unicaudal não pareado (* $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle; $n = 10$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

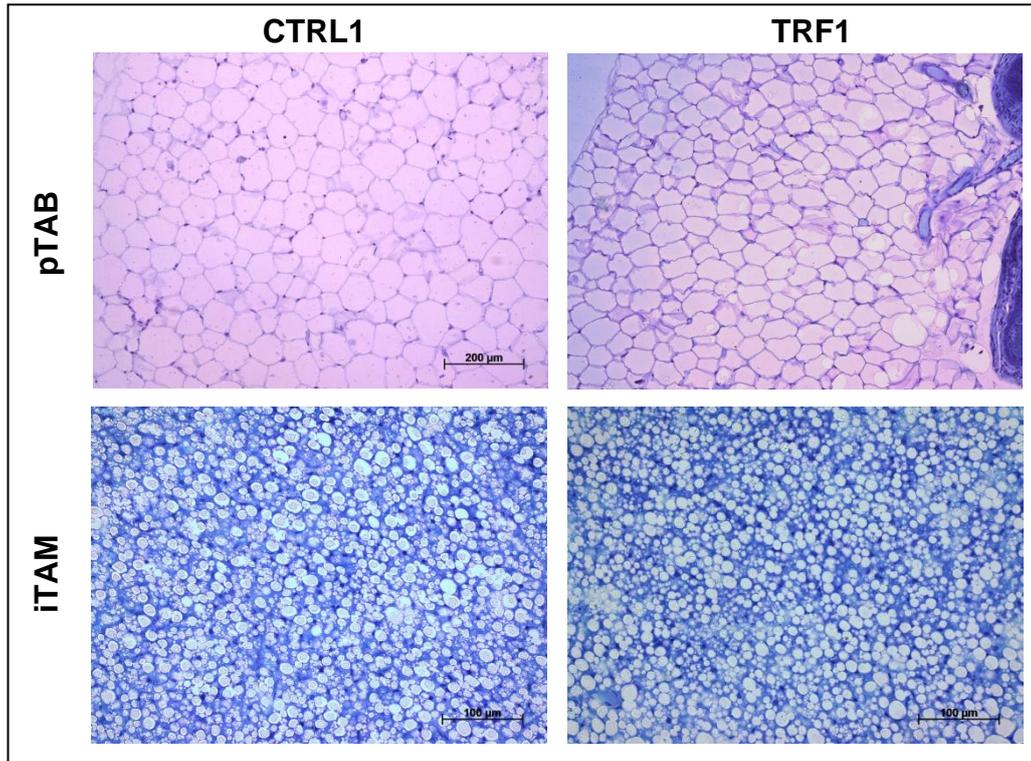
Figura 8 - Efeitos do TRF sobre o tecido adiposo marrom interescapular após uma e quatro semanas.



Fonte: Da autora.

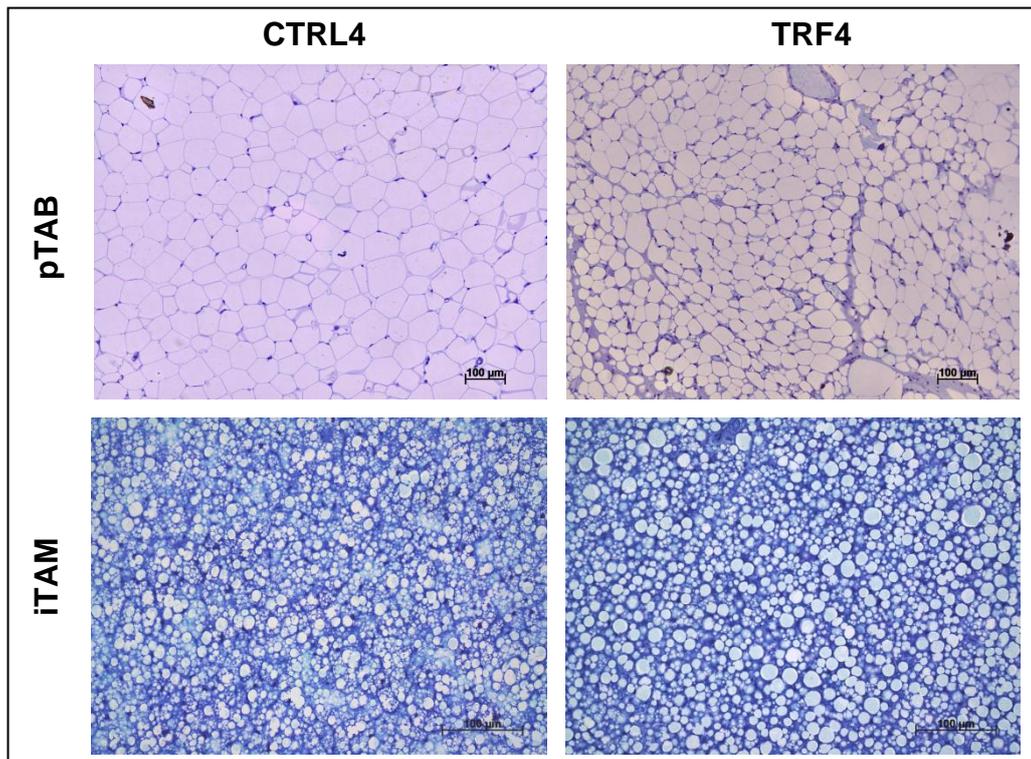
Nota: Massa e porcentagem de lipídeos em cortes histológicos do tecido adiposo marrom interescapular após 1 (A e B) e 4 (C e D) semanas de TRF. Teste de Mann-Whitney bicaudal não pareado (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle; $n = 10$). TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos tecidos adiposos após uma semana de TRF.



Fonte: Da autora.

Figura 10 - Fotomicrografias representativas dos tecidos adiposos após quatro semanas de TRF.



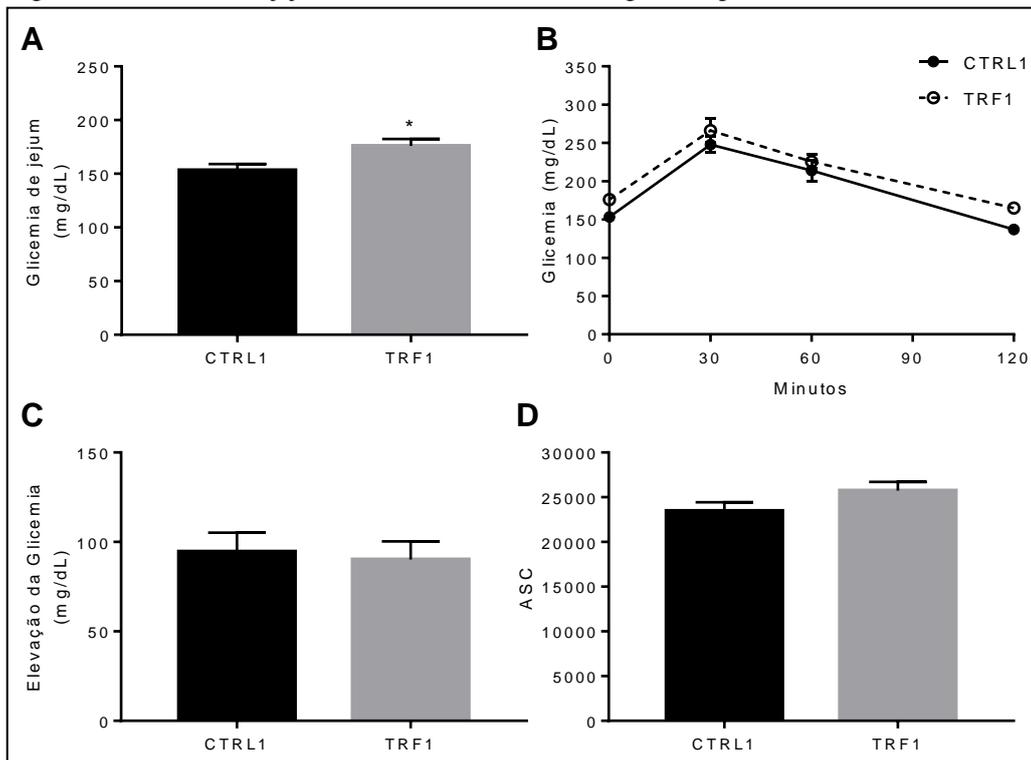
Fonte: Da autora.

5.4 GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG)

De acordo com a figura 11A, a glicemia de jejum do grupo TRF1 ($175,90 \pm 6,59$ mg/dL) foi maior ($p < 0,05$) que a glicemia de jejum de seu controle correspondente CTRL1 ($153,20 \pm 5,77$ mg/dL) após 1 semana de TRF. Entretanto, o mesmo não foi observado após 4 semanas de TRF, onde a glicemia de jejum do grupo TRF4 ($194,40 \pm 9,20$ mg/dL) foi semelhante ($p > 0,05$, figura 12A) à glicemia de jejum do grupo CTRL4 ($181,10 \pm 10,98$ mg/dL). Esses resultados demonstram um aumento adaptativo inicial da glicemia de jejum com 1 semana de TRF, mas que não se mantém após 4 semanas.

Ao analisarmos os testes de tolerância oral à glicose (TTOG), não encontramos diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as áreas sob a curva (ASC) dos grupos CTRL1 e TRF1 na primeira semana (figura 11D), nem entre os grupos CTRL4 e TRF4 na quarta semana (figura 12D). Mesmo assim, pudemos observar uma menor elevação da glicemia ($p < 0,05$, figura 12C) após 30 minutos da gavagem com solução de glicose 50% na quarta semana (TRF4 = $85,50 \pm 10,33$ vs. CTRL4 = $121,80 \pm 15,82$ mg/dL), sugerindo uma melhora na sensibilidade à insulina a partir da quarta semana de TRF.

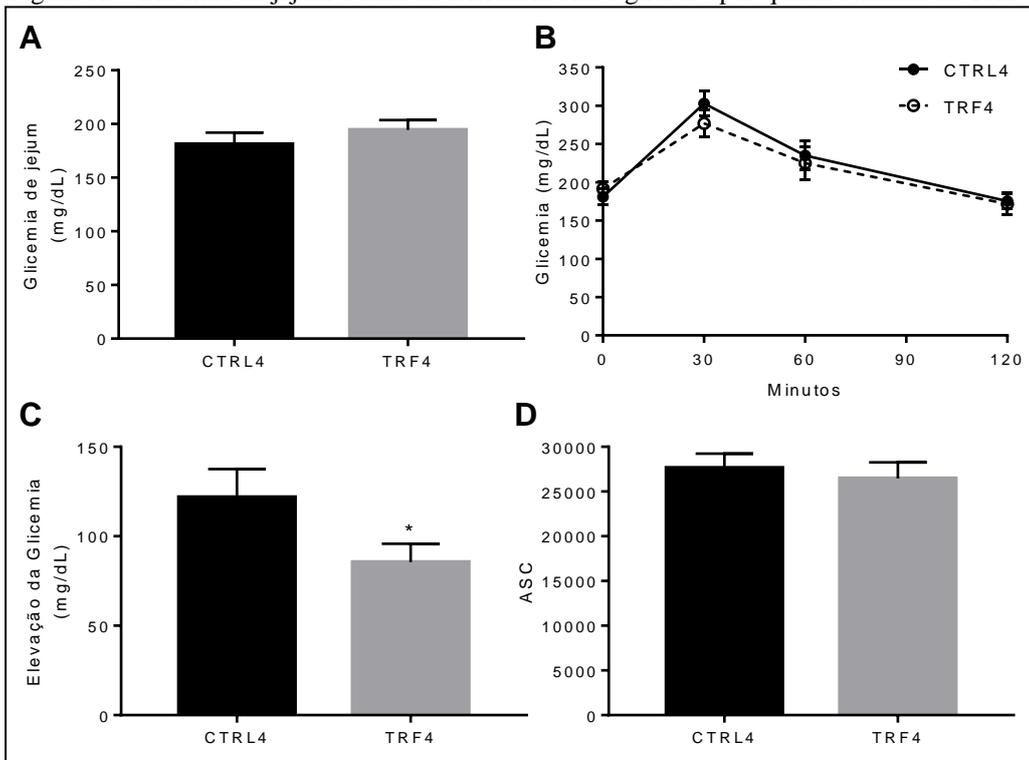
Figura 11 - Glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose após uma semana de TRF.



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Glicemia após 8h de jejum, após uma semana de TRF. Teste de Mann-Whitney bicaudal não pareado (* $p < 0,05$ em relação ao controle; $n = 10$). (B) Teste de tolerância oral à glicose. Two-way ANOVA ($p > 0,05$ em relação ao tratamento; $n = 10$; $F(1, 18) = 3,7$). (C) Elevação da glicemia no TTOG após 30 min da gavagem com solução de glicose 50%. Teste-t unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (D) Área sob a curva no TTOG. Teste-t unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). TTOG: teste de tolerância oral à glicose; TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

Figura 12 - Glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose após quatro semanas de TRF.



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Glicemia após 8h de jejum, após quatro semanas de TRF. Teste-t bicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). (B) Teste de tolerância oral à glicose. Two-way ANOVA ($p > 0,05$ em relação ao tratamento; $n = 8$; $F(1, 16) = 0,1593$). (C) Elevação da glicemia no TTOG após 30 min da gavagem com solução de glicose 50%. Teste-t unicaudal não pareado (* $p < 0,05$ em relação ao controle; $n = 8$). (D) Área sob a curva no TTOG. Teste-t unicaudal não pareado ($p > 0,05$; $n = 10$). TTOG: teste de tolerância oral à glicose; TRF: *time-restricted feeding*; CTRL1: grupo controle por uma semana; TRF1: grupo TRF por uma semana; CTRL4: grupo controle por quatro semanas; TRF4: grupo TRF por quatro semanas.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados trazem informações complementares para compreender os estágios iniciais dos benefícios metabólicos causados pelo TRF, uma vez que a maioria dos estudos traz dados relevantes após no mínimo 6 semanas de TRF. A restrição alimentar durante 12 h no ciclo escuro ativo de camundongos não altera, como esperado, a ingestão alimentar nas primeiras 4 semanas de TRF.

De acordo com Longo e Panda (2016), restringir o acesso alimentar à noite não só não altera a ingestão alimentar como ocorreu em nossos resultados, mas também aumenta a transcrição de genes hepáticos que seguem um padrão circadiano, melhora a amplitude e sincroniza as fases de oscilações (diurnas e noturnas) dessas transcrições gênicas rítmicas. Eles ainda afirmam que a alimentação diurna da mesma dieta inverte as fases de oscilação de quase todas as transcrições gênicas hepáticas em camundongos, ilustrando assim o papel dominante do horário de alimentação nas oscilações circadianas periféricas.

Esse relógio circadiano impulsiona a oscilação rudimentar de diversas transcrições gênicas no fígado, oferecendo assim uma movimentação antecipatória para alimentação ou jejum. Os ritmos diários de alimentação/jejum impulsionam as vias de sinalização que interagem com o oscilador circadiano hepático para aumentar a robustez ou as diferenças de picos e vales dessas oscilações transcricionais. Essas transcrições, por sua vez, medeiam processos anabólicos e catabólicos que são apropriados para fases específicas do ciclo de alimentação/jejum (LONGO; PANDA, 2016). Portanto, interações sinérgicas entre o relógio circadiano e os sinais de alimentação/jejum garantem que os tipos de metabolismo anabólico e catabólico sejam coordenadamente regulados em harmonia com o ciclo de atividade/repouso do animal, garantindo assim uma maior flexibilidade metabólica.

Outros estudos acerca dos efeitos do TRF demonstraram que restringir o acesso a alimentos de alto teor de gordura para apenas 8 – 12 horas por dia não reduz a ingestão calórica global em comparação com os animais alimentados *ad libitum*, mas melhora os ritmos circadianos e ajuda a prevenir ou reverter doenças metabólicas (CHAIX *et al.*, 2014; HATORI *et al.*, 2012; ZARRINPAR *et al.*, 2014).

Adicionalmente, nossos resultados mostram que a ingestão alimentar não é alterada em 24 h, um indicativo de que a fome não está exacerbada durante as primeiras semanas de TRF e, portanto, não causa compulsão e consequente aumento da ingestão alimentar.

Em relação ao ganho de massa corporal, pudemos demonstrar que a restrição alimentar de 12 h no período noturno não causa redução de peso em camundongos tratados com dieta padrão após apenas 4 semanas. Comparativamente, o estudo de Sundaram *et al.* (2016) avaliou o ganho de peso em animais alimentados com dieta *high fat* (alto teor de gordura) e cuja alimentação foi restrita a 12 h no período noturno. Corroborando nossos resultados, não foi observada diferença de massa corporal total em comparação com animais alimentados *ad libitum* até a sexta semana de TRF. A diferença entre o peso corporal só foi observada a partir da sétima semana de TRF. Diversos outros estudos observaram menor ganho de peso e massa corporal após pelo menos 6 semanas restringindo a alimentação de camundongos ao período noturno (ARBLE *et al.*, 2009; SHERMAN *et al.*, 2012; HATORI *et al.*, 2012).

Apesar de em quatro semanas de TRF os animais não terem tido uma diminuição da massa corporal total, o TRF foi capaz de diminuir a massa de TAB periepídimal após apenas uma semana. Ainda que a diminuição do pTAB após quatro semanas não tenha sido estatisticamente diferente, a diminuição do tamanho da célula adiposa branca foi observada tanto após uma quanto após quatro semanas de TRF. Sendo assim, a não significância estatística da diminuição massa de pTAB após quatro semanas de TRF pode ser devido ao alto desvio padrão das amostras que pode ter mascarado essa diminuição, que possui significância clínica.

Outros estudos avaliaram a adiposidade em camundongos submetidos ao TRF e perceberam o efeito protetor do TRF contra o aumento da adiposidade em dietas hipercalóricas (CHAIX *et al.*, 2014; SUNDARAM *et al.*, 2016). Sundaram *et al.* (2016) quantificou a porcentagem de tecido adiposo por ressonância magnética após 8 semanas de TRF numa dieta *high fat*. O TRF foi capaz de impedir o aumento da adiposidade causada pela dieta *high fat ad libitum*, uma vez que os animais submetidos ao TRF obtiveram porcentagem adiposa semelhante a animais com dieta normal *ad libitum*. Além disso, o TRF diminuiu os níveis de leptina e insulina, enquanto aumentou os níveis de adiponectina. Como a leptina regula a saciedade e a ingestão energética, elevações nas concentrações de leptina, as quais são proporcionais às da insulina, correlacionam com distúrbios metabólicos em modelos de obesidade em roedores (YAN *et al.*, 2013). A adiponectina regula o metabolismo de glicose e de lipídios, aumenta a sensibilidade à insulina e protege contra a inflamação crônica. Portanto, o TRF foi capaz de melhorar o metabolismo energético em situação de alta ingestão calórica, impedindo o aumento da adiposidade. Como nosso estudo utilizou dieta normocalórica,

demonstramos que em menos de 4 semanas o TRF já é capaz de reduzir a adiposidade em animais saudáveis.

Apesar de não haver encontrado diferença na massa corporal total após 38 semanas de TRF em dieta normal, Chaix e colaboradores (2014) observaram diferentes composições corporais entre os animais *ad libitum* e TRF. Camundongos submetidos ao TRF apresentaram mais massa magra e menos massa adiposa quando comparados aos seus controles. Esses resultados corroboram nossos achados de menor massa de pTAB com massa corporal semelhante em menos de 4 semanas de TRF.

Outro achado importante em nosso trabalho foi o aumento da massa de TAM interescapular a partir da primeira semana de TRF, e que se manteve na quarta semana. Dessa forma, o TRF em camundongos parece promover um aumento da termogênese, que consequentemente contribui para um maior gasto energético a partir de uma reserva lipídica, uma vez que a massa de pTAB e seus adipócitos foram reduzidos pelo TRF.

Ao revisar estudos de TRF de até 12 horas de acordo com os ritmos circadianos em roedores, os autores concluem que essa restrição alimentar também aumenta os níveis de atividade do TAM (aumentando assim a taxa metabólica), aumenta a β -oxidação de ácidos graxos e reduz a produção de glicose hepática (FROY, 2011; FROY *et al.*, 2006; FROY; MISKIN, 2010 apud LONGO; PANDA, 2016). Esses achados corroboram os resultados encontrados neste trabalho, pois o aumento da massa de iTAM pode indicar um aumento de sua atividade termogênica, influenciando assim na taxa metabólica dos camundongos em jejum intermitente através da utilização das reservas lipídicas do pTAB.

Os fatores conhecidos responsáveis pelo aumento da termogênese no TAM são a exposição ao frio e alto consumo energético. Quando os mamíferos são expostos ao frio, eles mantêm a temperatura do corpo autonomicamente não só diminuindo a perda de calor da superfície do corpo, mas também aumentando a produção de calor. O papel crítico do TAM para termogênese induzida por frio foi claramente confirmado pela constatação de que os camundongos que não possuem UCPI não conseguem manter a temperatura corporal em um ambiente frio e morrem em horas (ENERBACK *et al.*, 1997).

Outro exemplo de termogênese adaptativa é a termogênese induzida pela dieta, um aumento no gasto energético observado após a ingestão de alimentos, que às vezes é chamado de "termogênese pós-prandial" ou "efeito térmico do alimento". Desde o primeiro relato da hiperplasia de TAM em roedores pequenos mantidos em superalimentação prolongada com dieta de cafeteria, o TAM foi proposto como um local de termogênese induzida pela dieta (CANNON; NEDERGAARD, 2004; ROTHWELL; STOCK, 1979). Mudanças na ingestão

energética resultam em uma mudança adaptativa no metabolismo para que o conteúdo energético do corpo seja mantido em níveis estáveis. De fato, existem relatos que a massa de TAM e/ou a expressão UCP1 são diminuídas em animais privados de alimentos, mas aumentaram naqueles alimentados com dietas de alto teor de gordura (LOWELL; SPIEGELMAN, 2000).

Entretanto, o aumento da massa de iTAM observado em nossos resultados não pode ser atribuído ao frio, uma vez que todos os animais foram mantidos em mesma temperatura controlada (22 ± 1 °C). Também não observamos uma diferença de consumo alimentar entre os animais TRF e *ad libitum*, sendo incorreto afirmar que houve aumento da termogênese induzido pela dieta. Sendo assim, especulamos que o próprio TRF pode ter sido capaz de aumentar a estimulação simpática sobre o TAM, o que pode ser futuramente avaliado através da expressão de c-fos nos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular e da rafe pálida, áreas hipotalâmicas que enviam projeções para o TAM, sendo importantes efetores da termogênese (CANO *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao metabolismo da glicose, nossos resultados demonstram, interessantemente, que na primeira semana de TRF a glicemia de jejum passa a ser mais elevada do que nos animais controle. Isso sugere uma fase adaptativa em resposta aos novos padrões de alimentação diária, a qual tende a desaparecer na quarta semana de TRF. Mesmo assim, pudemos observar pelo TTOG que o *clearance* de glicose plasmática passa a ser mais eficiente após 4 semanas de TRF em comparação aos animais controle, pois a elevação da glicemia após 30 minutos de administração da solução de glicose foi menor, sugerindo uma melhor sensibilidade à insulina.

Ao avaliar ratos submetidos ao TRF de 12h por 30 dias, Farooq *et al.* (2006) também não encontrou diferença significativa na massa corporal dos animais, mas observou uma diminuição da glicemia e do colesterol. A atividade de enzimas pertencentes a diversas vias metabólicas como a glicólise, gliconeogênese e ciclo de Krebs aumentou profundamente tanto no intestino quanto no fígado devido ao TRF. Controversamente, seus resultados sugerem que o metabolismo oxidativo juntamente com a glicólise estão envolvidos na produção de energia durante o TRF.

Comparativamente, o trabalho de Chaix *et al.* (2015), que avaliou o efeito do TRF numa dieta de alto teor calórico, observou não apenas melhora na homeostase de lipídios e colesterol, mas também no metabolismo de glicose. Camundongos em dieta hipercalórica *ad libitum* demonstraram maior ativação da via de gliconeogênese, uma característica de resistência à insulina. Entretanto, aqueles submetidos ao TRF foram protegidos da resistência

à insulina, determinada pelo índice HOMA-IR. Além disso, durante o teste de tolerância à glicose, os camundongos TRF foram capazes de restaurar a normoglicemia muito mais rapidamente do que os animais *ad libitum*.

Finalmente, Hatori *et al.* (2013) também encontraram resultados relevantes ao metabolismo da glicose. A expressão gênica coordenada de diversos fatores demonstrou que o TRF reprograma temporariamente o metabolismo da glicose para longe da gliconeogênese, em direção à glicólise e vias anabólicas. Camundongos em dieta *high fat* submetidos ao TRF não demonstraram tolerância à glicose e obtiveram níveis de insulina semelhantes ao controle com dieta normal. Juntos, nossos estudos sugerem que o TRF é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e o metabolismo de glicose.

De maneira geral, o TRF representa uma abordagem promissora para a prevenção e terapia de distúrbios metabólicos como a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo II, mesmo em curto prazo. Ele retira o foco da ingestão calórica, tornando-se uma modificação de estilo de vida facilmente adaptável e atrativa. Portanto, restringir a alimentação aos horários de atividade é uma estratégia promissora para modular os ritmos circadianos e funções metabólicas controladas pelo relógio circadiano, de maneira que, desde as primeiras semanas podem ser observadas mudanças adaptativas favoráveis ao metabolismo de lipídios e da glicose.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o TRF de 12 horas de acordo com o ritmo circadiano por uma ou quatro semanas em camundongos machos não altera o ganho de peso, pois o consumo alimentar e líquido são semelhantes ao consumo de animais com dieta *ad libitum*. Mesmo assim, a massa de TAM aumentou após uma e quatro semanas de TRF, apontando para um possível aumento da termogênese e conseqüentemente do metabolismo energético, provavelmente utilizando-se das reservas energéticas de TAB, uma vez que foi encontrada uma diminuição do tamanho dos adipócitos após uma e quatro semanas de TRF. O TTOG demonstrou que há uma adaptação inicial da glicemia de jejum dos animais submetidos ao TRF e que há uma possível melhora no *clearance* de glicose plasmática, evidenciada pela menor elevação de glicemia do grupo TRF4, sugerindo um possível aumento da sensibilidade à insulina nesses animais a partir da quarta semana. Portanto, o TRF de curto prazo apresenta resultados promissores para a prevenção e controle da obesidade e diabetes *mellitus* tipo II.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, K. C.; GOEL N. Timing of eating in adults across the weight spectrum: Metabolic factors and potential circadian mechanisms. **Physiol. Behav.**, Filadélfia, v. 192, p. 158–166, 2018.
- ANTUNES, L. C. *et al.* Obesity and shift work: Chronobiological aspects. **Nutr. Res. Rev.**, Porto Alegre, v. 23, p. 155–168, 2010.
- ARBLE, D.M. *et al.* Circadian timing of food intake contributes to weight gain. **Obesity**, Evanston, v. 17, p. 2100–2102, 2009.
- ARCHER, S. N. *et al.* Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Dallas, v. 111, p. E682–E691, 2014.
- ASHER, G.; SASSONE-CORSI P. Time for food: The intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. **Cell**, Rehovot, v. 161, p. 84–92, 2015.
- BARBATELLI, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Ancona, v. 298 p. E1244–E1253, 2010.
- BARNOSKY, A. R. *et al.* Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings. **Transl. Res.**, Chicago, v. 164, p. 302–311, 2014.
- BOSTROM, P. *et al.* A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, Massachusetts, v. 481, p. 463–468, 2012.
- CAMPFIELD, L. A. *et al.* Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, Nutley, v. 269, p. 546-549, 1995.
- CANO, G. *et al.* Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. **J Comp Neurol**, Pittsburgh, v. 460, p. 303-326, 2003.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, Estocolmo, v. 84, p. 277-359, 2004.
- CHAIX, A. *et al.* Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. **Cell Metabolism**, San Diego, v. 20, p. 991–1005, 2014.
- CHUNG, H. *et al.* Time-restricted feeding improves insulin resistance and hepatic steatosis in a mousemodel of postmenopausal obesity. **Metabolism**, San Diego, v. 65, p. 1743–1754, 2016.

COOPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc Nutr Soc.**, Whitechapel, v. 60, p. 349-356, 2001.

DE BACQUER D. *et al.* Rotating shift work and the metabolic syndrome: A prospective study. **Int. J. Epidemiol.**, Gante, v. 38, p. 848–854, 2009.

ESPELUND, U. *et al.* Fasting unmasks a strong inverse association between ghrelin and cortisol in serum: Studies in obese and normal-weight subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Arhus, v. 90(2), p. 741–746, 2005.

ENERBACK, S. *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. **Nature**, Maine, v. 387, p. 90-94, 1997.

FAKHRZADEH, H. *et al.* Effect of ramadan fasting on clinical and biochemical parameters in healthy adults. **Ann. Saudi Med.** Teerã. v. 23, p. 223–226, 2003.

FAROOQ, N. *et al.* 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.**, Aligarh, v. 96, p. 1087–1094, 2006.

FRAYN K. N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, Oxford, v. 45, p. 1201–1210, 2002.

GARRIDO, M.; TERRON, M. P.; RODRIGUEZ, A. B. Chrononutrition against oxidative stress in aging. **Oxidative Med. Cell. Longev.**, Badajoz, v. 2013, p. 729804, 2013.

GILL, S.; PANDA, S. A smartphone app reveals erratic diurnal eating patterns in humans that can be modulated for health benefits. **Cell Metab.**, San Diego, v. 22, p. 789–798, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HÄKKINEN, A. *et al.* Association of physical fitness with health-related quality of life in finnish young men. **Health Qual. Life Outcomes**, Jyväskylä, v. 8, p. 15, 2010.

HATORI, M. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell Metab.**, San Diego, v. 15, p. 848–860, 2012.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. **Progress in Lipid Research.**, Ottawa, v. 28, n. 2, p. 67–115, 1989.

JIANG, P.; TUREK, F. W. Timing of meals: When is as critical as what and how much. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Evanston, v. 312, p. E369–E380, 2017.

JOHNSTON J. D. *et al.* Circadian rhythms, metabolism, and chrononutrition in rodents and humans. **Adv. Nutr.**, Guildford, v. 7, p. 399–406.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J. Clin. Investig.**, Boston, v. 106, p. 473–481, 2000.

KESSLER, K.; PIVOVAROVA-RAMICH, O. Meal Timing, Aging, and Metabolic Health. **International Journal of Molecular Sciences**, Nuthetal, v. 20(8), p. 1911.

KIM, K. H. *et al.* Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. **Cell Research**, Toronto, v. 27, p. 1309-1326, 2017.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in Lipid Research**, Toulouse, v. 48, p. 275–297, 2009.

LAMIA, K. A.; STORCH, K. F.; WEITZ, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Boston, v. 105, p. 15172–15177, 2008.

LONGO, V. D.; PANDA, S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. **Cell Metab.**, Los Angeles, v. 23, p. 1048–1059, 2016.

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. **Nature**, Boston, v. 404, p. 652-560, 2000.

LUSHCHAK, O. *et al.* Intermittent Fasting. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Ivano-Frankivsk, doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.62133-5, 2018.

MANOOGIAN, E. N. C.; PANDA, S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. **Ageing Res.Rev.**, San Diego, v. 39, p. 59–67, 2017.

MIRZAEI, B. *et al.* The effect of ramadan fasting on biochemical and performance parameters in collegiate wrestlers. **Iran. J. Basic Med. Sci.** Resht, v. 15, p. 1215–1220, 2012.

MORO, T. *et al.* Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. **J. Transl. Med.**, Pádua, v. 14, p. 290, 2016.

MOYER, V. A. Screening for and management of obesity in adults: US preventive services task force recommendation statement. **Ann. Intern. Med.** Maryland, v. 157, p. 373–378, 2012.

NATALUCCI, G. *et al.* Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. **European Journal of Endocrinology**, Viena, v. 152, n. 6, p. 845–850, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OGDEN, C. L. *et al.* Prevalence of Obesity among Adults and Youth: United States, 2011–2014. **NCHS Data Brief**, Washington, v. 219, p. 1-8, 2015.

PANDA, S. Circadian physiology of metabolism. **Science**, San Diego, v. 354, p. 1008–1015, 2016.

PASCHOS, G. K. *et al.* Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component. **Arntl. Nat. Med.**, Filadélfia, v. 18, p. 1768–1777, 2012.

PATTERSON, R. E.; SEARS, D. D. Metabolic effects of intermittent fasting. **Annu Rev Nutr**, San Diego, v. 37, p. 371-393, 2017.

PRADO, W. L. *et al.* Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina Do Esporte**, Niterói, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochem J**, Meudon, v. 345, Pt 2, p. 161-179, 2000.

ROENNEBERG, T. *et al.* Social jetlag and obesity. **Curr. Biol.**, Munique, v. 22, p. 939–943, 2012.

ROTHSCHILD, J. *et al.* Time-restricted feeding and risk of metabolic disease: a review of human and animal studies. **Nutr. Rev.**, Los Angeles, v. 72, p. 308–318, 2014.

SAITO, M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. **Diabetes Metab J**, Sapporo, v. 37, p. 22-29, 2013.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet induced thermogenesis. **Nature**, Londres, v. 281, p. 31-35, 1979.

SALGADO-DELGADO, R. *et al.* Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. **Endocrinology**, Cidade do México, v. 151, p. 1019–1029, 2010.

SCHEER, F. A. *et al.* Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Evanston, v. 106, p. 4453–4458, 2009.

SCHERER, P. E. *et al.* A novel serum protein similar to Cq1, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem.**, Cambridge, v. 270, p. 26746-26749, 1995.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, Cambridge, v. 48, p. 1253–1262, 2007.

SHERMAN, H. *et al.* Long-term restricted feeding alters circadian expression and reduces the level of inflammatory and disease markers. **J. Cell. Mol. Med.** Rehovot, v. 15, p. 2745–2759, 2011.

SHERMAN, H. *et al.* Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. **FASEB J.** Rehovot, v. 26, p. 3493–3502, 2012.

SHUSTER, A. *et al.* The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. **Br. J. Radiol.**, Hamilton, v. 85, p. 1–10, 2012.

STOTE, K. S. *et al.* A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, Beltsville, v. 85, p. 981–988, 2007.

SUNDARAM, S.; YAN, L. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. **Nutr Res**, Grand Forks, v. 36, n. 6, p. 603-611, 2016.

TAN, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochemical Society Transactions**, Cambridge, v. 36, p. 935–940, 2008.

TSCHOP, M.; MORRISON, K. M. Weight loss at high altitude. **Adv Exp Med Biol.**, Indianapolis, v. 502, p. 237-247, 2001.

TUREK, F. W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science**, Evanston, v. 308, p. 1043–1045, 2005.

VAN MARKEN LICHTENBELT W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**, Maastricht, v. 360 p. 1500-1508, 2009.

VETTER, C. *et al.* Association between rotating night shift work and risk of coronary heart disease among women. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Boston, v. 315, p. 1726–1734, 2016.

VIRTANEN K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**, Turku, v. 360, p. 1518-1525, 2009.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, São Paulo, v. 21, p. 697–738, 2000.

WEFERS, J. *et al.* Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Dallas, v. 115, p. 7789–7794, 2018.

WIJNGAARDEN, M. A. *et al.* Regulation of skeletal muscle energy/nutrient-sensing pathways during metabolic adaptation to fasting in healthy humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, Leiden, v. 307, n. 10, p. E885–E895, 2014.

YAN, L. *et al.* Effects of voluntary running and soy supplementation on diet-induced metabolic disturbances and inflammation in mice. **J Agric Food Chem.** Grand Forks, v. 61, p. 9373-9379, 2013.

ZARRINPAR, A. *et al.* Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. **Cell metabolism**, San Diego, v. 20, p. 1006–1017, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, Nova York, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZIAEE, V. *et al.* The changes of metabolic profile and weight during ramadan fasting. **Singap. Med. J.**, Teerã. v. 47, p. 409–414, 2006.

ZWICK, R. K. *et al.* Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. **Cell Metabolism**, New Haven, v. 27, p. 68-83, 2018.

ANEXO A - Carta de aprovação CEUA 12/2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do jejum intermitente sobre parâmetros metabólicos de camundongos machos", registrada com o nº 12/2018, sob a responsabilidade de Renato Rizo Ventura, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 20/06/2018 a 15/06/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	60
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 20 de Junho de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG