



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL DE MARCADORES
ADIPOGÊNICOS E DO EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA
ASSOCIADA A ESTRESSE CRÔNICO**

Carla de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL DE MARCADORES
ADIPOGÊNICOS E DO EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA
ASSOCIADA A ESTRESSE CRÔNICO**

Autora: Carla de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas.**

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Carla

Avaliação do padrão temporal de marcadores adipogênicos e do efeito da síndrome metabólica associada a estresse crônico / Carla de Oliveira. -- 2013.

116 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Cronobiologia. 2. Síndrome metabólica. 3. Estresse crônico. 4. Marcadores adipogênicos. I. Lucena da Silva Torres, Iraci, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Lucia Abujamra

(PPGCM-UFRGS)

Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

(PPG FISILOGIA-UFRGS)

Profa. Dra. Patrícia Pereira

(DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA - ICBS/UFRGS)

Dra. Joanna Ripoll Rozisky

(UFRGS)

Suplente

“Começamos a pensar em nossos ritmos cotidianos e descobriremos que existe uma pulsação subjacente a todos, que nos identifica e nos diferencia dos demais.”

Carlos Fregtman

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

- Por todos os conselhos e comentários inteligentes, pela brilhante orientação, pelo apoio e empenho, pelo incentivo constante, agradeço muito à minha Orientadora Dra Iraci Lucena da Silva Torres. Obrigada por tudo.
- Por apoiar e acreditar neste trabalho desde o início agradeço a minha Co-Orientadora Dra Izabel Cristina Custodio de Souza. Obrigada pela confiança.
- Agradeço a colega de grupo Isabel Cristina de Macedo por me receber para trabalhar no decorrer do seu Mestrado, me dando oportunidade de aprendizado e crescimento.
- Gostaria muito de agradecer ao meu colega Cleverson Moraes de Oliveira por ter compartilhado comigo o desenvolvimento experimental da nossa pesquisa. Obrigada pelo coleguismo.
- Especiais agradecimentos às colegas e amigas, Andressa de Souza e Liciane Fernandes Medeiros, que trabalharam com energia e engenhosidade inesgotáveis para que pudéssemos concluir com êxito este trabalho.
- Gostaria de destacar a estimada colaboração da amiga e colega Vanessa Leal Scarabelot, por ter sido tão compreensiva e solícita comigo. Por me auxiliar durante este período indicando a melhor direção no caminho em busca do saber. Agradeço-te pela paciência inesgotável, sugestões e dedicação a este trabalho. Muito Obrigada.
- Obrigada também as queridas colegas e amigas, Lauren Naomi Spezia Adachi e Ana Cláudia de Souza, pela atenção e companheirismo.
- À aluna de Iniciação Científica Fernanda Ribeiro da Silva, Paulo Ricardo Marques Filho e Stefania Giotti Cioato, meu especial e afetuoso agradecimento por tudo que fizeram no transcorrer deste trabalho. A dedicação mostrada, a disponibilidade, a responsabilidade e o carinho que tiveram comigo. Muito Obrigada.

- Também gostaria de agradecer aos colegas Joanna Ripoll Rozisky, Gabriela Laste, Alícia Deitos, Vinícius Souza dos Santos, Yasmine Nonose, pela ajuda nos experimentos, permitindo a realização deste estudo.
- Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (10-0383), por dispor da Unidade de Experimentação Animal (UEA) e da Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) onde o trabalho foi desenvolvido com eficácia e firmeza.
- Pela assistência, atenção e dedicação na minha pesquisa, sou grata à Marta Cioato e à Fabíola Meyer da Unidade de Experimentação Animal. Também agradeço a Angêla M M Costa, Vera L Gonçalves, Rosalina A Braga, Juliana Mautone e Eduardo M A Silveira.
- Pela benevolência e generosidade, agradeço ao Everaldo B de Almeida (CPE), Jeferson B da Silva (UAMP) e Flávia R Giusti (UPE).
- A CAPES, pela concessão da bolsa. Agradeço aos órgãos de fomento CNPq e FINEP que contribuíram para realização deste trabalho.
- PIBIC CNPq/UFRGS, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.
- Devo a mais profunda gratidão àqueles que me encorajaram e me apoiaram nestes dois anos de pesquisa e escrita: minha mãe, Maria Rejane de Oliveira, e meu pai, Luiz Carlos de Oliveira que acreditaram em mim e neste trabalho e que carregaram fardos extras a fim de que eu pudesse concluir com mérito a minha pesquisa. Obrigada sempre por tudo.
- Agradeço o incentivo dos meus irmãos Patrícia Cassidy e Eduardo Augusto de Oliveira.
- Ao meu grande amor e amigo Miguel Vargas da Fonseca, sem mais palavras.
- Por fim, muitas pessoas contribuíram para a realização desta pesquisa. Algumas compartilhando generosamente conhecimento, outras oferecendo incentivo constante através de palavras e gestos e outras apoiando e dando sustentação dia após dia na concretização deste ideal. A todos expresso meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUÇÃO.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES.....	20
2.2. CRONOBIOLOGIA	22
2.3. ESTRESSE CRÔNICO.....	26
2.4. SÍNDROME METABÓLICA	29
2.5. MARCADORES ADIPOGÊNICOS	31
2.5.1 ADIPONECTINA.....	32
2.5.2 LEPTINA	32
2.5.3 PERFIL LIPÍDICO	34
III. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
IV. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	38
V. ARTIGO CIENTÍFICO.....	50
VI. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	83
VII. PERSPECTIVAS	85
VIII. DIVULGAÇÕES	87
IX. ANEXOS.....	91
A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	92
B) ARTIGO DE REVISÃO	93
C) CO-AUTORIAS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da Síndrome Metabólica segundo o NCEP-ATP III.....32

Manuscrito: EFFECT OF OBESITY AND CHRONIC STRESS ON THE TEMPORAL PATTERN OF ADIPOGENIC MARKERS.

Table 1: Peso Relativo do Tecido Adiposo Mesentérico, Subcutâneo e Pericárdico em Ratos Wistar.....83

Artigo de Revisão: Síndrome metabólica e estresse crônico como desreguladores de ritmos circadianos de marcadores adipogênicos: uma revisão

Tabela 1. Componentes da Síndrome Metabólica de acordo com o NCEP-ATP III.....107

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura:

Figura 1. Fluxograma da pesquisa realizada sobre o tema nas principais bases de dados	22
Figura 2. Localização dos Núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e conexões entre a retina e a glândula pineal	24
Figura 3. Principais mecanismos envolvidos no sistema de temporização circadiana em mamíferos.....	25
Figura 4. Representação esquemática da ativação de eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e simpático-adrenal (SA) pelo estresse.....	30

Manuscrito: EFFECT OF OBESITY AND CHRONIC STRESS ON THE TEMPORAL PATTERN OF ADIPOGENIC MARKERS.

Figura 1: Avaliação dos parâmetros ponderais para controle da obesidade.

Painel A. Peso Semanal.....	78
Painel B. Delta de Peso.....	78
Painel C. Índice de Lee.....	79

Figura 2: Análises Hormonais e Bioquímicas em Ratos.

Painel A. Colesterol Total.....	80
Painel B. Triglicerídeos.....	80
Painel C. Corticosterona.....	81
Painel D. Adiponectina.....	81
Painel E. Leptina.....	82

Artigo de Revisão: Dieta Hipercalórica E Estresse Crônico Como Desreguladores De Padrões Circadianos.

Figura 1. Localização dos Núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e conexões entre a retina e a glândula pineal.....	100
Figura 2. Mecanismos do Sistema de Temporização Circadiana em Mamíferos.....	101
Figura 3. Esquematização da ativação pelo estresse do eixo HHA.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico

ATP = Adenosina 5'-trifosfato

C = Control/Controle

CRH = Hormônio Liberador de Corticotrofina

GCs = Glicocorticóides

HHA = Hipotálamo-hipófise-adrenal

HD = Dieta hipercalórica

HDL = Lipoproteína de alta densidade (do inglês *High Density Lipoprotein*)

IGL = Folheto Intergeniculado

LDL = Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein*)

NSQ = Núcleo Supraquiasmático

PVN = *Paraventricular nucleus*/núcleo para-ventricular hipotalâmico

S = Stress/Estresse

SHD = Dieta hipercalórica e Estresse Crônico

SA = Simpático-adrenal

SBC = Sociedade Brasileira de Cardiologia

SBH = Sociedade Brasileira de Hipertensão

SM = Síndrome Metabólica

SN = Sistema Nervoso

SNC = Sistema Nervoso Central

TG = Triglicerídeos

ZT = Zeitgeber Time

RESUMO

Alterações nos ritmos circadianos estão envolvidas no desenvolvimento de transtornos metabólicos como obesidade e síndrome metabólica. Além disto, fatores ambientais como o consumo de alimentos altamente palatáveis ricos em gordura e a exposição a situações estressantes podem contribuir na incidência e severidade destas doenças crônicas. Neste estudo avaliamos os efeitos da associação de modelos animais de obesidade e estresse crônico sobre o padrão temporal dos níveis séricos de marcadores adipogênicos (adiponectina, leptina, triglicerídeos e colesterol total) e de corticosterona (para controle do modelo de estresse crônico) de ratos. Adicionalmente, para controle da eficácia do modelo de obesidade os seguintes parâmetros foram avaliados: ganho de peso (avaliação semanal); o delta de peso e o Índice de Lee e o peso de frações de tecido adiposo (mesentérico, MAT; subcutâneo, SAT; e pericárdico, PAT). Foram utilizados 98 ratos Wistar machos com 60 dias de idade tratados por 80 dias e divididos em 4 grupos: dieta padrão (C), dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) (D), estresse crônico (estresse crônico por restrição 1h/dia/5 dias por semana, entre as 9h e as 12h) associado a dieta padrão (E), e estresse crônico associado a dieta hipercalórica (DE). Os animais foram mortos em 3 períodos do dia (7h -ZT0, 19h - ZT12 e 1h - ZT18). Nossos resultados comprovam que a exposição crônica a dieta hipercalórica é um modelo eficaz na indução de obesidade e de síndrome metabólica em ratos, aumentando o delta de peso, o índice de Lee, peso de frações de tecido adiposo, e os níveis de triglicerídeos e leptina. Adicionalmente confirmam a presença de um padrão temporal na liberação de triglicerídeos, corticosterona, adiponectina e leptina em animais controles. O estresse crônico reduziu o delta de peso, peso do tecido adiposo mesentérico e os níveis de triglicerídeos, colesterol total e de leptina. Houve interação entre estresse crônico e obesidade em colesterol total, e houve interação entre os pontos temporais e obesidade nos níveis de adiponectina e corticosterona, também houve interação entre os pontos temporais e estresse crônico nos níveis de leptina. Concluindo, ambos os parâmetros foram capazes de alterar o padrão temporal de triglicerídeos e leptina. Assim, o impacto da dessincronização de um organismo com fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas como obesidade e síndrome metabólica.

Palavras-chave: Ritmos circadianos, obesidade, síndrome metabólica, dieta hipercalórica e estresse crônico.

ABSTRACT

Changes in the circadian rhythms are involved in the development of metabolic disorders such as obesity and metabolic syndrome. Furthermore, environmental factors such as consumption of highly palatable food rich in fat and exposure to stressful situations may contribute to the incidence and severity of these diseases. In this study we evaluated the effects of the association animal models of obesity and chronic stress on the temporal pattern of serum levels of adipogenic markers (adiponectin, leptin, triglycerides and cholesterol), and of corticosterone (to control of chronic stress model) of rats. Additionally, to control the efficacy of obesity model the following parameters were evaluated: weight gain (weekly evaluation), the delta weight, the Lee index, and the weight fractions of adipose tissue (mesenteric, MAT; subcutaneous, SAT and pericardial, PAT). A total of 98 male Wistar rats at 60 days of age treated for 80 days and divided into 4 groups: standard diet (C), hypercaloric diet (cafeteria diet) (HD), chronic stress (chronic stress by restraint 1h/day/5 days a week between 9am and 12pm) associated with the standard diet (S), and chronic stress associated with hypercaloric diet (SHD). The animals were killed at 3 time points (7:00 a.m. -ZT0, 7:00 p.m. - ZT12 e 1:00 a.m. - ZT18). Our results show that chronic exposure to hypercaloric diet is an effective model to induce obesity and metabolic syndrome in rats, increasing the weight delta, Lee index, weight fractions of adipose tissue, triglycerides and leptin levels. Additionally, it was confirmed the presence of a temporal pattern in the release of triglycerides, corticosterone, adiponectin, leptin in naïve animals. The chronic stress reduced weight delta, the mesenteric adipose tissue weight and levels of triglycerides, cholesterol and leptin. There was interaction between chronic stress and obesity in the total cholesterol, and there was interaction between time points and obesity in adiponectin and corticosterone levels, also there was interaction between time points and chronic stress in leptin levels. In conclusion, both parameters were able of desynchronize the rhythms of leptin and triglycerides on temporal pattern. Thus, the impact of desynchronization of an organism with environmental factors contributes to the development of metabolic diseases such as obesity and metabolic syndrome.

Keywords: Circadian rhythms, obesity, metabolic syndrome, hypercaloric diet and chronic stress.

I. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Cronobiologia é a ciência que estuda as características temporais dos seres vivos em todos os seus níveis de organização, investigando e quantificando mecanismos de estruturas temporais biológicas. Os ritmos biológicos são indispensáveis para a manutenção da saúde e bem estar do organismo por permitirem temporização ótima das atividades biológicas, no contexto dos ciclos geofísicos e ambientais, e por fornecerem um arcabouço para a organização temporal da fisiologia e do comportamento, contribuindo, desse modo, para a manutenção de um meio interno equilibrado (Wollnik, 1989). Além disto, ritmos biológicos apresentam frequências que podem variar de milissegundos até anos, sendo geneticamente determinados, evolutivamente conservados e endogenamente gerados (Cardoso, 2009). Oscilações periódicas que variam de 20 a 28 horas são chamadas de ritmos circadianos. Estas oscilações circadianas são encontradas em outras partes do cérebro e nos tecidos periféricos e são, pelo menos em parte, coordenadas e sincronizadas pelo relógio central (Hastings, 2007). Ritmos circadianos recebem informações do ambiente externo, sobretudo do ciclo claro-escuro, e do ambiente interno associado com as reações fisiológicas que ocorrem no organismo (Hanifin & Brainard, 2007). A influência das oscilações periódicas em processos biológicos tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência (Ichikawa, 2001), uma vez que os fenômenos periódicos circundam toda a nossa existência.

A alimentação, o metabolismo de lipídios e de glicose, a temperatura corporal e as taxas metabólicas estão sujeitos à regulação circadiana a qual visa sincronizar a energia disponível e o gasto necessário para mudanças no meio externo de acordo com a fase claro-escuro. Adicionalmente, muitos hormônios envolvidos no metabolismo, como a adiponectina, leptina, insulina, glucagon, cortisol (em humanos), corticosterona (em ratos), melatonina e a grelina exibem oscilação circadiana (Froy, 2007), sugerindo um papel importante para os ritmos circadianos no controle de várias funções no organismo, incluindo adipogênese, metabolismo energético e regulação imune.

Nos mamíferos, os ritmos são controlados por um grupo de estruturas, incluindo o núcleo supraquiasmático (NSQ), o folheto intergeniculado (IGL) e a glândula pineal (Bob & Fedor-Freybergh, 2008). Este relógio comunica-se com o meio ambiente recebendo informações fóticas da retina e controlando o organismo através de vias neurais e humorais. A principal função da glândula pineal é produzir o hormônio do escuro, a melatonina, que prontamente é liberada na corrente circulatória. Este hormônio é o principal marcador do

ritmo circadiano, temporizando as atividades do organismo (Markus, *et al.*, 2007). A luz exerce um papel fundamental na complexidade do ritmo circadiano. Especificidades geográficas da luminosidade podem ser relevantes no processo de adaptação, fortalecendo ou enfraquecendo o impacto de componentes da rede circadiana que podem influenciar as diferentes respostas orgânicas, incluindo a resposta ao estresse (Moser *et al.*, 2006). O estresse também está entre os mais importantes reguladores exógenos dos ritmos circadianos (Albers, 2001; Hauffa, 2001). Deve-se notar que, sobre certas condições, por exemplo, quando a tensão é grave ou crônica, a organização e regulação das respostas ao estresse podem ser interrompidas.

Exposição ao estresse ativa o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) resultando no aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior e de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) pelo córtex da adrenal (De Kloet *et al.*, 1993). Os Glicocorticóides (GCs) são hormônios catabólicos que contribuem na mobilização de substratos energéticos, com finalidade de recuperar lesões teciduais e promover a homeostase, provocando distribuição anômala de gordura, principalmente em região abdominal (Pauli *et al.*, 2006). Marcadores adipogênicos como adiponectina, leptina e as lipoproteínas circulantes, estão sob a influência de relógios endógenos respondendo a diferentes variações de intensidade de luz e podem desencadear alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Hastings *et al.*, 2003; Goldbeter, *et al.*, 2010).

Ritmos circadianos desempenham um importante papel em manter e coordenar processos biológicos necessários para o funcionamento eficiente de um organismo, no entanto rupturas dos ritmos circadianos podem levar a desordens metabólicas como diabetes, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (Ramsey *et al.*, 2007; Straif *et al.*, 2007). Síndrome Metabólica (SM) envolve a presença de obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão entre outras alterações (Lorenzo *et al.*, 2007). Obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo e está associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, como a intolerância à glicose, hiperinsulinemia, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensão (Eikelis *et al.*, 2003). Embora as causas da obesidade sejam complexas, a crescente disponibilidade de alimentos altamente palatáveis, caloricamente densos e ricos em gordura, em conjunto com estilo de vida mais sedentário têm tido um papel determinante para crescente prevalência da SM e suas complicações. (Stein *et al.*, 2004). Em síntese, o sistema circadiano está fortemente ligado a processos que controlam o metabolismo, e o rompimento no relógio circadiano ou desajustes no metabolismo

predispõem a distúrbios metabólicos como a obesidade e a SM. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de estudos com modelos em animais que possibilitem uma melhor compreensão do funcionamento e da dinâmica dos ritmos biológicos na regulação de atividades fisiológicas, como a alimentação e o gasto energético, bem como o efeito da exposição a estresse crônico e da dieta nestes padrões temporais. Estes estudos vêm proporcionar substrato para novas e importantes aplicações clínicas na área da cronobiologia, tanto no desenvolvimento quanto na utilização de fármacos para o tratamento de doenças metabólicas.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Nesta revisão de literatura buscou-se apresentar os principais aspectos da síndrome metabólica, estresse crônico, ritmo circadiano e a relação com marcadores adipogênicos. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, SciELO. Foram selecionados artigos publicados entre 1990 e 2012, além disso, livros-texto e monografias foram utilizados para esclarecer questões relevantes ao assunto.

Nos sites PubMed, LILACS, SciELO e Banco de Teses da CAPES foram realizadas buscas utilizando os termos: *metabolic syndrome*, *chronic stress*, *circadian rhythm*, *adiponectin*, *leptin*, *corticosterone* e *lipid profile*. Em relação ao termo *metabolic syndrome*, foram encontrados 26.014 artigos no PubMed e 885 artigos no LILACS, já no SciELO foram encontrados 668 artigos. Utilizando-se o termo: *chronic stress* foram encontrados 4.115 artigos no PubMed, 52 artigos no LILACS e 50 no SciELO. Com o descritor *circadian rhythms* a busca no PubMed encontrou 8.146 artigos, 45 no LILACS e 57 no SciELO. Com o descritor: *adiponectin* o site PubMed identificou 10.220 artigos, no LILACS 95, e no SciELO 87 artigos. Para *Leptin*, foram encontrados 22.433 no PubMed, 314 no LILACS e 224 no SciELO. Em relação à *Corticosterone*, 27.239 artigos foram encontrados no PubMed, 90 no LILACS e 49 no SciELO. Por último, a busca simples de *Lipid Profile* revelou 159 artigos no PubMed, 70 no LILACS e 37 no SciELO.

Refinando-se a busca, com cruzamentos entre as palavras-chave foi encontrado um reduzido número de artigos como mostrado na Figura 1.

PALAVRAS-CHAVE

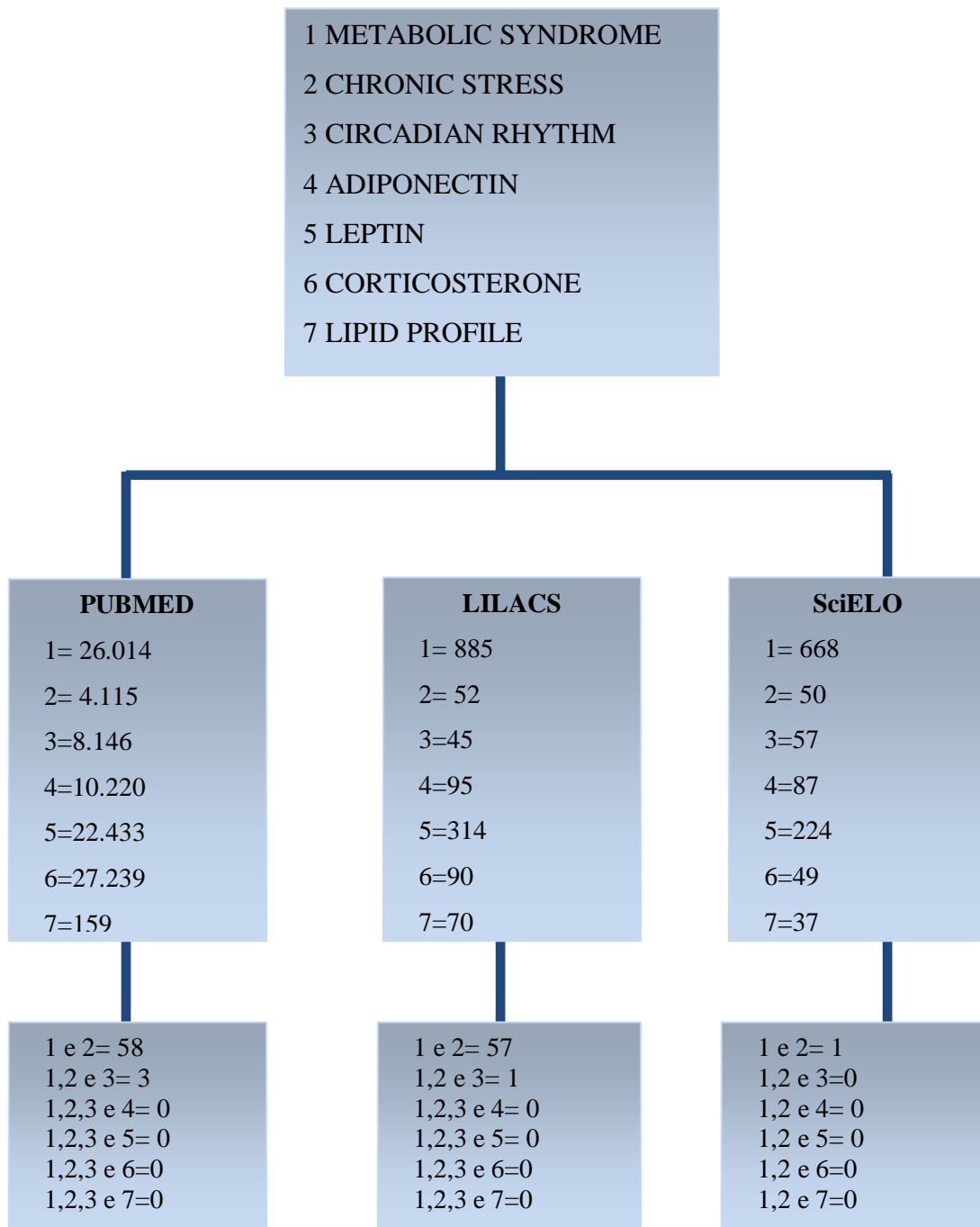


FIGURA 1: Fluxograma da pesquisa realizada sobre o tema nas principais bases de dados.

2.2. CRONOBIOLOGIA

Cronobiologia é uma área do conhecimento que estuda as características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização (Halberg, 1969). As primeiras descrições dos ritmos biológicos encontrados na natureza constam desde a antiguidade, mas somente em 1960 a cronobiologia foi caracterizada como disciplina científica (Pittendrigh, 1960). Como organização temporal compreende-se a capacidade dos seres vivos de expressarem seus comportamentos e controlarem sua fisiologia de uma forma recorrente e periódica (Araujo & Marques, 2002). A essa recorrência periódica damos o nome de ritmos biológicos.

Todos os seres vivos estão expostos a variações cíclicas que ocorrem no meio ambiente, como a alternância dia-noite, as variações de temperatura e as estações do ano. Para a sua adaptação, alguns mecanismos desenvolvidos ao longo da sua evolução permitem antecipar e ajustar os seus processos fisiológicos às alterações rítmicas e cíclicas, preparando adequadamente esses ritmos biológicos (Martínez-Carpio, 2004). Tais ritmos biológicos são mencionados como circadianos (do Latim “circa diem”, que significa “cerca de um dia”). Todavia, nos organismos também estão presentes ritmos com períodos inferiores a 20 horas, conhecidos como ritmos ultradianos (exemplos são os ritmos de batimentos cardíacos, respiração e disparo de neurônios, entre outros) e ritmos cujo período é superior a 28 horas e são denominados ritmos infradianos (ciclo menstrual humano e ciclos estrais em roedores) (Marques, 2003).

Para que haja uma ritmicidade circadiana é necessário que uma estrutura proceda como um marcapasso capaz de gerar oscilações de aproximadamente 24 horas (Markus *et al.*, 2003) e também relógios periféricos atuando e desempenhando papéis importantes (Duguay & Cermakian, 2009). Marcapassos podem ser determinados como osciladores primários endógenos que exibem um padrão oscilatório geneticamente determinado e autossustentado, mesmo na ausência de pistas temporais externas (Markus *et al.*, 2003). No hipotálamo, dois pequenos aglomerados de neurônios constituem os marcapassos geradores da ritmicidade circadiana em mamíferos, representados pelos relógios biológicos circadianos que são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Markus *et al.*, 2003) (Figura 2).

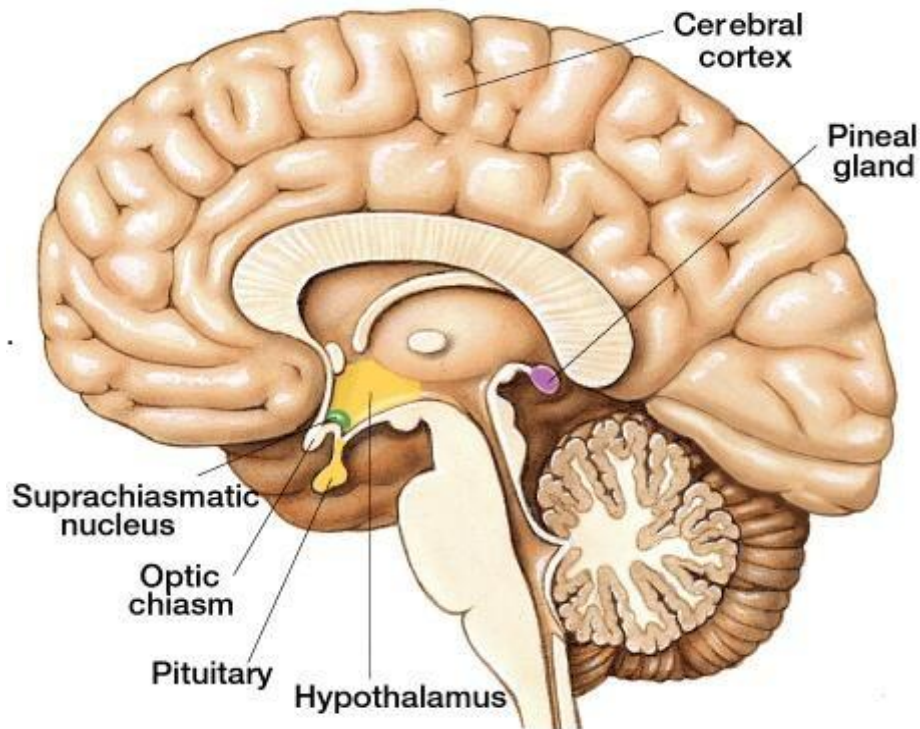


Figura 2. Posicionamento dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) no sistema nervoso humano e conexões entre a retina e a glândula pineal. Fonte: <http://healthysleep.med.harvard.edu/image/200>.

O NSQ recebe informação fótica diretamente através do trato retino-hipotalâmico, sincronizando-o para as 24 horas; este, por sua vez, coordena a ação dos osciladores presentes em outras áreas cerebrais e nos órgãos periféricos, como fígado, rim, pulmão, coração, entre outros, denominados como osciladores periféricos. Estes osciladores sincronizados, por sua vez, regulam os ritmos locais na fisiologia constituindo-se como entidades multi-oscilatórias (Reppert *et al.*, 2001). As respostas a estas oscilações ocorrem por vias eferentes neurais e humorais (Richter *et al.*, 2004). A eferência neural para os órgãos periféricos abrange o sistema nervoso autônomo, principalmente via sistema nervoso simpático, por meio da conexão dos NSQ à coluna intermediolateral da medula (Bartness *et al.*, 2001). A melatonina é responsável pela eferência humoral. A pineal é parte integrante do sistema de temporização endógeno, constituindo o principal meio de comunicação entre o meio externo (ciclo claro-escuro) e os sistemas internos (nervoso central e endócrino). A síntese e secreção da melatonina ocorrem durante o período noturno, sendo suprimida pela luz (Lavie, 2001).

O ajuste entre o relógio biológico e o meio ambiente é realizado via neural (Markus *et al.*, 2003), ocorrendo diariamente e é fundamental para sincronizar o sistema circadiano ao período de aproximadamente 24 horas (Hofstra e de Weerd, 2008). Os eventos externos que

são capazes de promover o ajustamento das variáveis circadianas foram designados por Aschoff como *zeitgeber* (palavra alemã que significa “doador do tempo”). Um potente “Zeitgeber” ou ZT é a alternância claro-escuro. Outros zeitgebers compreendem temperatura, interação social e comportamento alimentar (Moser *et al.*, 2006b; Smolensky e Peppas, 2007). Os ritmos de 24 horas da fisiologia e do comportamento são influenciados por vários fatores ambientais como horários de alimentação, fatores genéticos e interações sociais, como as condições de luz. Nos seres vivos, há necessidade de sensores que percebam a variação temporal (Ohdo, 2007). Além disto, a presença de sistemas humorais e neurais é necessária para que informem a todo organismo o estado de iluminação ambiental para que possam acompanhar estas variações.

Assim, o sistema de temporização dos vertebrados abrange três elementos fundamentais como componentes capazes de perceber pistas/dicas ambientais (aferências), uma estrutura marcapasso de ritmos (relógio biológico, o NSQ) e vias de comunicação neural e hormonal (eferências) das informações para órgãos periféricos e tecidos (Boden e Kennaway, 2006) (Figura 3).

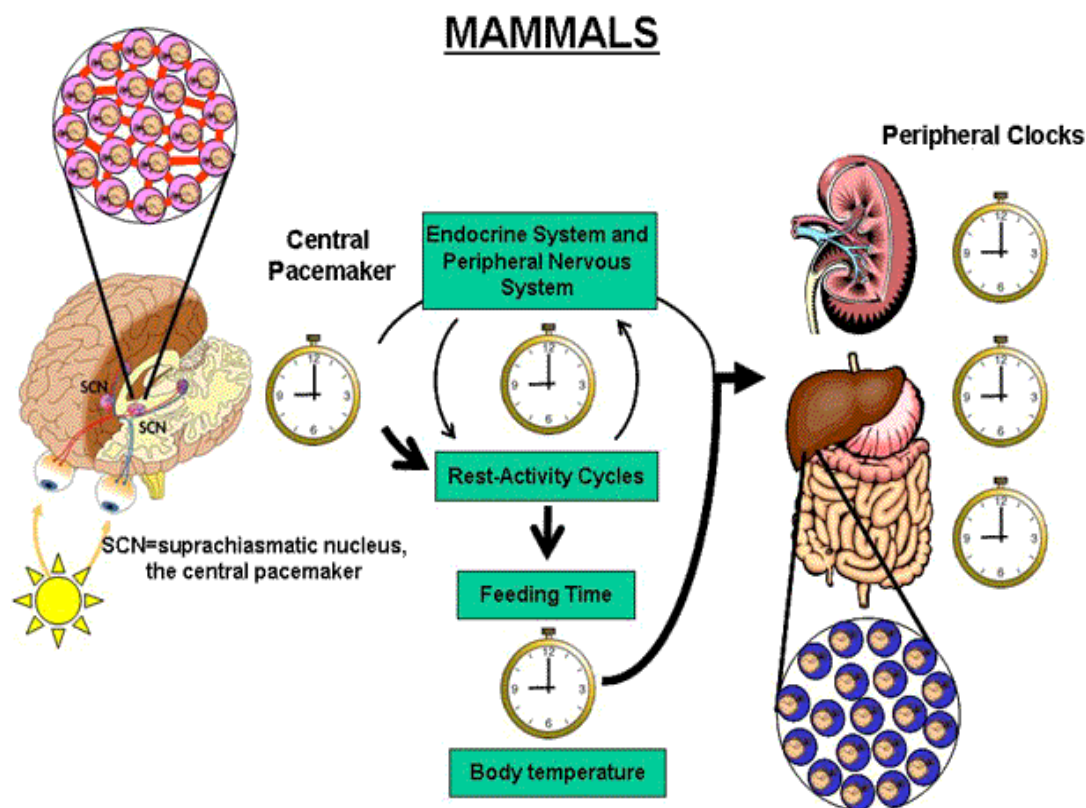


Figura 3: Principais mecanismos envolvidos no sistema de temporização circadiana em mamíferos (Ishida *et al.*, 2005). O ciclo atividade/repouso, tempo de alimentação e o ritmo da temperatura corporal, são influenciados diretamente pelos núcleos supraquiasmáticos.

Tem sido sugerido que a função do sistema rítmico circadiano é proporcionar uma organização temporal de processos fisiológicos e comportamentais de modo que gere uma efetiva adaptação do organismo às variações ambientais (Moore-Ede, 1986; Hastings *et al.*, 2003). Por exemplo, ao avançar a noite, o hormônio melatonina é secretado e a temperatura corporal diminui para facilitar o sono, que promoverá a secreção do hormônio do crescimento, assim como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) que é ativado para preparar o organismo antes do amanhecer para o despertar (Hastings, 1991).

A produção e liberação dos hormônios são distribuídas em um ciclo de 24h, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida ou exposição a determinados fatores, como a luz durante a noite, atividades físicas ou alimentos em diferentes horários, causando transtornos no ritmo circadiano (Czeisler e Klerman, 1999). Trabalhadores noturnos, por exemplo, estão expostos a ciclos claro/escuros não habituais, resultando em transtornos circadianos no ciclo atividade/repouso, no comportamento alimentar e no ritmo social (Haus e Smolensky, 2006). Estes transtornos circadianos prejudicam o desempenho do indivíduo e podem levar a alterações em diversos sistemas, incluindo o metabolismo de lipídeos e de carboidratos e a secreção de glicocorticóides (Haus e Smolensky, 2006). Estudos têm demonstrado que trabalhadores noturnos exibem maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e síndrome metabólica (Rüger e Scheer, 2009; Ramsey *et al.*, 2007).

A exposição noturna à luz é um fator dessincronizador do sistema circadiano. Existem algumas situações em que ocorre a dessincronização da ritmicidade alimentar, tendo em vista que a quantidade, a qualidade e o horário das refeições parecem ser motivados por reflexos condicionados (Bernardi *et al.*, 2009). Assim, ritmos circadianos e diurnos afetam a ingestão alimentar. Muitos comportamentos, incluindo a ingestão energética, variam em nível e intensidade ao longo do dia nesses processos. Alteração nos níveis de adipocinas é considerada um importante mecanismo capaz de alterar o padrão de ingestão alimentar e levar a desajustes nutricionais. A ritmicidade e o sincronismo na secreção destas adipocinas são importantes para o padrão diário das refeições (Crispim *et al.*, 2007). A instabilidade na ritmicidade circadiana, com repetida dessincronização/ressincronização, pode enfraquecer os mecanismos homeostáticos (Kern, 1996). Um exemplo deste fenômeno é a exposição a situações de estresse, cada vez mais comum na organização da sociedade atual. Desta forma, o ritmo circadiano tem se mostrado importante na prática dos cuidados relacionados ao processo de saúde e doença.

Finalmente, é importante ressaltar que a cronobiologia tem colaborado para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na manifestação dos ritmos biológicos e

suas interações com os ritmos ambientais, nas respostas fisiológicas e comportamentais. Por conseguinte, estudos cronobiológicos podem contribuir com diferentes áreas do conhecimento na compreensão de patologias e terapêuticas.

2.3. ESTRESSE CRÔNICO

Em 1936, Hans Selye definiu o estresse como uma resposta estereotipada, não específica, do corpo a mudanças no ambiente externo ou interno. As respostas aos eventos estressantes foram chamadas de síndrome de adaptação geral (Selye, 1974), compreendendo uma grande variedade de alterações fisiológicas, comportamentais, emocionais e cognitivas. Além disso, para promover o enfrentamento e reduzir o impacto do estressor, estas respostas são geralmente organizadas e bem reguladas (Goshen *et al.*, 2003). Portanto, a ativação de sistemas envolvidos com estresse leva a mudanças comportamentais e periféricas que buscam manter a homeostase, aumentando a chance de sobrevivência (Tsigos & Chrousos, 2002).

Os eixos HHA e simpático-adrenal (SA) são ativados mediante uma ampla variedade de estressores. Como resposta imediata, a taxa de descarga dos neurônios simpáticos é alterada resultando na liberação de catecolaminas no sangue (Kvetnansky *et al.*, 1993). Um regulador da resposta ao estresse é o eixo HHA: o estresse provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) que libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH induz a secreção de glicocorticóides (GCs), cortisol para humanos e corticosterona para ratos, pelo córtex da adrenal (de Kloet *et al.*, 1993; Einarsson *et al.*, 2008). Os GCs inibem a liberação e a síntese de ACTH por atuarem no hipocampo, hipotálamo e hipófise, exercendo retroalimentação negativa sobre a liberação de ACTH (Nestler *et al.*, 2002) (Figura 4). O eixo HHA é responsável pela resposta à exposição ao estresse crônico, desencadeando alterações na reatividade neuroendócrina aos estressores subsequentes (Ostrander *et al.*, 2006).

Exposições sucessivas ao estresse com intensidade moderada produzem atenuada responsividade do HHA gerando uma habituação ao estressor. No entanto, em presença de um novo estressor, sua resposta pode estar aumentada, originando uma sensibilização, sendo ambos considerados mecanismos adaptativos (Weiberg *et al.*, 2009). Estresse agudo, em geral, não traz consequências adversas, sendo um processo adaptativo benéfico em certos casos (Esch *et al.*, 2002). No entanto, quando repetido ou prolongado, o estresse adquire caráter crônico, podendo ser extremamente prejudicial (Sabban e Kvetnansky, 2001) e estar envolvido na gênese de muitas manifestações clínicas (Chrousos *et al.*, 2007), como sintomas

de ansiedade, alterações na memória e aprendizado, bem como respostas emocionais alteradas (Perreau-Lenz *et al.*, 2003; McEwen, 2000). A ativação crônica do eixo HHA tem sido associada a distúrbios metabólicos e alterações na homeostase energética (Bjorntorp, 2001; McEwen, 1998). O estresse também está entre os mais importantes reguladores exógenos dos ritmos circadianos (Albers, 2001; Hauffa, 2001). O eixo HHA é um sistema hormonal chave que está bem caracterizado no padrão circadiano. Sob a influência do estresse, este padrão é alterado e a homeostase relacionada à função neuroendócrina é interrompida, com um impacto negativo na saúde (Albers, 2001; Hauffa, 2001).

Cortisol (humanos) ou corticosterona (roedores) é um hormônio GC produzido pelo córtex da glândula adrenal que apresenta um forte ritmo circadiano (Mohawk *et al.*, 2007). O relógio biológico central (NSQ) é um dos responsáveis por originar esta ritmicidade circadiana, pois por meio de uma via multisináptica envolvendo os núcleos supraquiasmáticos e as glândulas adrenais as secreções provenientes do eixo HHA exibem um padrão circadiano (Buijs *et al.*, 1999). Em humanos, a secreção noturna de ACTH e de cortisol se faz de modo pulsátil, alcançando seu nível mais baixo na primeira metade da noite e aumentando rapidamente ao aproximar-se o horário do despertar (entre 6h e 10h da manhã), quando sua secreção é máxima (Scheer *et al.*, 1999). Em roedores, que são animais noturnos, a secreção de corticosterona ocorre no turno inverso, com pico plasmático no início da noite (Perreau-Lenz *et al.*, 2003). O eixo HHA apresenta um padrão pulsátil de secreção de CRH, ACTH e GCs. A secreção de GCs é altamente controlada e possivelmente as diferenças individuais de respostas das adrenais observadas também sejam consequências dos sistemas regulatórios que modulam o controle central do eixo HHA (Miller, Chen e Zhou, 2007).

O eixo HHA e o sistema circadiano interagem em vários níveis com seus hormônios, seguindo um padrão circadiano de liberação (Bailey e Heitkemper, 2001; Verhagen *et al.*, 2004), sendo a magnitude da resposta ao estresse dependente da hora do dia (Bradbury *et al.*, 1991). Do mesmo modo, os GCs atuam na manutenção do arrastamento circadiano nos tecidos periféricos, além de uma variedade de funções, incluindo a regulação do metabolismo de glicose, de gordura e de proteína, de ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, bem como efeitos no humor e em funções cognitivas (Tempel e Leibowitz, 1994; von Zerssen *et al.*, 1987). Os GCs têm intensa influência sobre o comportamento alimentar (la Fleur *et al.*, 2004). Adicionalmente, dieta e período da alimentação têm um impacto no ritmo de sua secreção (Le Minh *et al.*, 2001; Leal e Moreira, 1997). Desajustes na sinalização de GCs têm sido implicados na patogênese de doenças, tais como diabetes e SM (Kotelevtsev *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 2001).

Estudos prévios suportam uma ligação entre o estresse e o aumento do consumo de alimentos palatáveis. O aumento do estresse na vida diária tem sido associado com uma maior motivação por tais alimentos (Zellner *et al.*, 2006, Epel *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 1999). Há relatos de pessoas em situações de estresse que alteraram sua seleção de alimentos, ingerindo mais chocolate, doces, bolos e salgadinhos (alimentos conhecidos por “comfort foods”) (Gibson, 2006). Além disso, concentrações elevadas de GCs podem promover a liberação de CRH no núcleo central da amígdala, que é reduzido pelo consumo de alimentos palatáveis, constituindo desta maneira um ciclo de feedback negativo pelo qual o estresse leva à seleção e ingestão de alimentos palatáveis ricos em energia que, por sua vez, reduz o estresse (Dallman *et al.*, 2005; Cottone *et al.*, 2009). Estudos sugerem também que o estresse crônico está associado ao consumo de uma dieta rica em gordura (Dallman *et al.*, 2003). Do mesmo modo, Epel *et al.* (2001) demonstraram que, sob condições de estresse crônico e agudo, os indivíduos apresentam um aumento na ingestão de alimentos hipercalóricos. Sabendo-se que o estresse tem efeitos profundos sobre o apetite, tanto em ratos quanto em humanos, perturbações na regulação do eixo HHA têm sido implicadas também em alterações metabólicas (Adam e Epel, 2007; Ramsey *et al.*, 2007) e tem sido sugerida uma correlação entre o estresse e síndrome metabólica (Mikurube *et al.*, 2005).

Desta forma, a secreção de GCs está vinculada à fase de atividade do ritmo atividade/repouso, com níveis plasmáticos máximos coincidentes com o despertar do organismo (manhã para os animais diurnos e anoitecer para os noturnos) (Wilkinson, 2008). Em humanos, o ritmo circadiano do cortisol atinge o seu nível máximo nas primeiras horas da manhã, diminuindo durante o dia até alcançar níveis mínimos, ocorrendo um aumento durante a segunda metade da noite (Van Cauter, 1990). Nos animais noturnos, como os roedores, o aumento dos níveis de corticosterona no fim do período de inatividade serve para preparar o animal para um período de atividade, no qual a mobilização de fontes energéticas e o estímulo ao comportamento alimentar são imprescindíveis (Verhagen *et al.*, 2004).

Portanto, os níveis máximos e mínimos de cortisol podem ser utilizados para monitorar alterações no sistema temporizador circadiano (Van Cauter e Refetoff, 1985). Conseqüentemente, variações circadianas de GCs, como o cortisol e a corticosterona, são importantes para permitir uma rápida adaptação do organismo às mudanças ambientais a fim de conservar a homeostase (Mohawk *et al.*, 2007). Assim, marcadores do ritmo circadiano como cortisol/corticosterona tornam-se ferramentas importantes para estudos clínicos (Mirick e Davis, 2008), pois permitem o monitoramento da organização rítmica circadiana dos organismos.

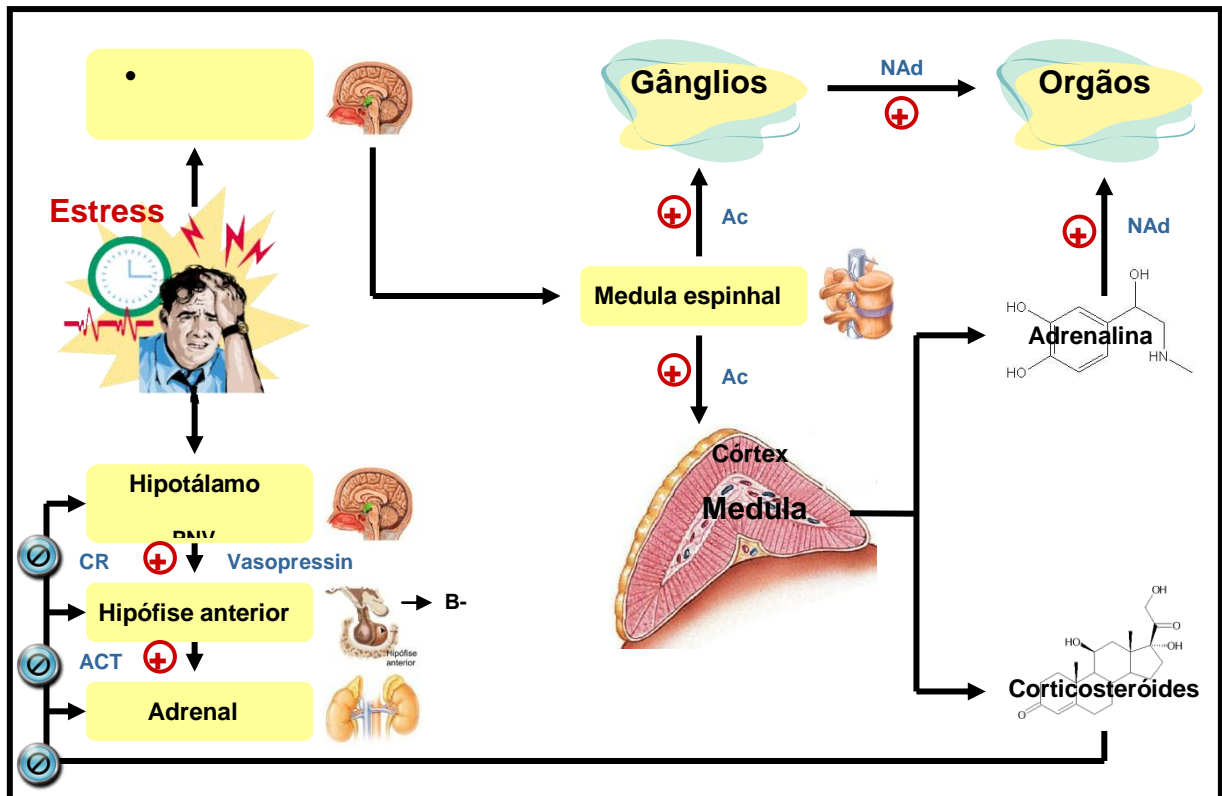


Figura 4: Representação esquemática da ativação de eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e simpático-adrenal (SA) pelo estresse. PVN= núcleo paraventricular hipotalâmico (Autor desconhecido).

2.4. SÍNDROME METABÓLICA

A incidência de síndrome metabólica (SM) representa um espectro de desordens que têm aumentado de forma crescente em todo o mundo industrializado. A SM é composta por várias alterações metabólicas, incluindo obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão. Esta síndrome tornou-se um desafio na saúde pública em todo mundo; uma estimativa de 25% a 40% de indivíduos entre 25 e 64 anos de idade tem síndrome metabólica (*San Antonio Heart Study*) (Lorenzo *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2007; Alberti *et al.*, 2005; Zimmet *et al.*, 2005). SM é também definida pela presença de componentes como elevados níveis circulantes de triglicerídeos, redução dos níveis de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL), pressão arterial elevada, comprometimento na glicemia de jejum, elevada circulação de marcadores inflamatórios e/ou trombóticos ou redução dos níveis de moléculas anti-inflamatórias, tais como adiponectina que são marcadores de SM (Alberti *et al.*, 2005; Zimmet *et al.*, 2005).

Evidências sugerem que alterações no sistema circadiano e no sono podem participar na patogênese da doença (Knutson *et al.*, 2007). Estudos clínicos epidemiológicos sustentam a hipótese de que uma das principais alterações no mundo industrializado que contribui para patogênese da SM envolve a introdução de luz artificial no trabalho noturno. O trabalho noturno é uma condição clínica comum indicativa de interações entre ritmos circadianos e metabolismo em seres humanos, sendo que estudos indicam que a maioria dos trabalhadores do turno da noite relata dificuldades em tolerar essa condição (Knutsson, 2003). Recentemente, em um estudo no qual os participantes foram submetidos a um desalinhamento circadiano (simulação do trabalho noturno), os pesquisadores observaram uma dessincronização circadiana, diminuindo os níveis de leptina, resultando em hiperglicemia e hiperinsulinemia. Adicionalmente, o ritmo de cortisol foi diariamente invertido e foi constatado um aumento da pressão arterial (Scheer *et al.*, 2009). Também é interessante observar que pacientes com diabetes demonstraram diminuição na amplitude dos ritmos de tolerância a glicose e secreção de insulina (Boden *et al.*, 1999); de tal modo, a relação entre a interrupção circadiana e patologias metabólicas parece ser bidirecional em humanos, sugerindo que a perturbação circadiana pode levar a um ciclo vicioso e contribuir para o aumento e progressão da doença metabólica.

Do mesmo modo, a obesidade resulta em desequilíbrio energético, promovendo consequências graves à saúde (Klein *et al.*, 2007). Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica. Entre os fatores ambientais, inclui-se a dieta, a qual pode contribuir na incidência e na gravidade dessas doenças crônicas (Afman e Müller, 2006). O excesso de ingestão alimentar e a inatividade física tornaram-se a base da crescente epidemia mundial de obesidade e síndrome metabólica, não só nas nações industrializadas, mas também nos países em desenvolvimento. O excesso alimentar é estimulado pela disponibilidade de alimentos ricos em gordura e açúcar. A obesidade e a alimentação rica em gordura também afetam o sistema circadiano em ratos, e dietas hipercalóricas têm sido utilizadas com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade e síndrome metabólica (Estadella *et al.*, 2004). Estudos em roedores mostram que esta dieta palatável rica em gordura promove hiperfagia voluntária, que resulta em rápido aumento de peso, aumento da massa adiposa e parâmetros pré-diabéticos como glicose e intolerância à insulina (Morris *et al.*, 2008; Caimari *et al.*, 2010; Heyne *et al.*, 2009). Além disso, há um acúmulo de gordura visceral (Polacow e Lancha, 2007) que provoca uma série de alterações metabólicas, como a produção de adipocinas como a adiponectina e leptina (Costa e Duarte, 2006; Rothenbacher *et al.*, 2005). As adipocinas

desempenham um papel importante na homeostase energética, sensibilidade à insulina, resposta imunológica e doenças vasculares (Prins, 2002; Fantuzzi, 2005).

O diagnóstico de SM é estabelecido pela presença de três dentre quaisquer dos cinco componentes entre os descritos pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III* (NCEP, 2001), segundo recomendação da I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica [I-DBSM, 2005; SBH, 2004, SBC, 2005, (Quadro 1)]. A *Internacional Diabetes Federation* desenvolveu novos critérios para o diagnóstico da SM (IDF, 2005), considerando a obesidade abdominal associada a dois ou mais componentes da SM (SBC, 2005) (vide Quadro 1).

Quadro 1 - Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III

Componentes	Níveis
Obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL Colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL

A presença de *Diabetes mellitus* não exclui o diagnóstico de SM

Fonte: SBC-Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2005.

2.5. MARCADORES ADIPOGÊNICOS

Nos últimos anos, o tecido adiposo branco tem sido reconhecido por desempenhar um papel central em vários estados patológicos, incluindo síndrome metabólica e obesidade. Além das suas funções primárias como um reservatório para o excesso de energia, o tecido adiposo também serve como um órgão endócrino, produzindo adipocinas, regulando importantes processos biológicos como metabolismo energético e respostas imune/inflamatórias (Wang *et al.*, 2008). Este tecido é submetido à atuação de outros hormônios que promovem efeitos diversos, não só sobre o seu metabolismo, mas também na função endócrina e na regulação da adipogênese (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006). A produção e liberação destes hormônios são distribuídas em um ciclo de 24 horas, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida ou exposição a determinados fatores, como a luz durante a noite, atividades físicas ou alimentos em diferentes horários.

2.5.1 ADIPONECTINA

É a mais abundante proteína secretada pelo tecido adiposo (Ahima, 2006; Kadowaki *et al.*, 2006). É de produção específica pelos adipócitos, com função antiaterogênica e reguladora da homeostase dos lipídeos e da glicose. Adiponectina também potencializa a ação da insulina no fígado e reduz a produção de glicose hepática, além de induzir a oxidação de gorduras diminuindo os triacilgliceróis em nível hepático e muscular (Havel, 2004). Os níveis de adiponectina são inversamente relacionados com a massa de gordura, diminuindo à medida que o tecido adiposo aumenta (Arita *et al.*, 1999; Ouchi *et al.*, 1999). Tem sido demonstrado que essa proteína encontra-se reduzida no soro de indivíduos e roedores obesos ou resistentes à insulina. A queda da adiponectina plasmática (hipoadiponectinemia) é causada por interações de fatores genéticos e ambientais (Ohashi *et al.*, 2004). Em indivíduos que apresentam baixos níveis circulantes de adiponectina foram observadas várias disfunções associadas como diabetes, aterosclerose, hipertensão, dislipidemias, sugerindo a existência de associação entre hipoadiponectinemia e estabelecimento de SM (Miyoschi *et al.*, 2003). Do mesmo modo, recentes estudos mostram uma relação entre administração da adiponectina e redução do peso corporal (Qi *et al.*, 2004).

Há muitas evidências ligando regimes alimentares e componentes alimentares com alterações no sistema circadiano (Froy, 2007; Ramsey *et al.*, 2007). Dietas hipercalóricas podem influenciar nas respostas do relógio biológico (Yanagihara *et al.*, 2006) e as oscilações circadianas da adiponectina, que está envolvida no metabolismo, tornam-se interrompidas no desenvolvimento da obesidade e SM (Froy, 2007). Além da sua função como sensibilizadora da insulina, a adiponectina está implicada na patogênese da maioria das principais patologias relacionadas à obesidade, incluindo hipertensão, aterosclerose, esteatose hepática, falência cardíaca, inflamação das vias aéreas e câncer de mama (Zhu *et al.*, 2008). Os níveis de adiponectina são controlados por vários mecanismos, como a secreção de adiponectina pelos adipócitos e a regulação por outras adipocinas inflamatórias (Tilg e Moschen, 2006; Fasshauer *et al.*, 2003).

2.5.2 LEPTINA

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo, tanto em roedores quanto em humanos (Eguchi *et al.*, 2008), atuando como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e

o SNC (Da Mota e Zanesco, 2007), agindo fundamentalmente no hipotálamo. Promove a redução na ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, regulando a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (Romero *et al.*, 2006). Além disso, inibe a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e *Agouti related peptide* (AgRP), envolvidos nos mecanismos de aumento da ingestão alimentar e de ação redutora no gasto energético (Banks *et al.*, 2002). Recentemente foi relatado que a inibição da expressão do receptor de leptina em adipócitos poderia produzir muitos dos sintomas que acompanham a deficiência total de leptina (Huan *et al.*, 2003).

O papel da leptina na regulação do peso corporal é evidenciado em modelos animais com deficiência de leptina, observando-se que a falta de leptina provoca obesidade, tanto em humanos como em roedores (Ioffe e Moon, 1998; Montague *et al.*, 1997). Na maioria dos casos de obesidade, a leptina é secretada na proporção da massa de gordura, tal que os níveis circulantes de leptina correlacionam-se com a adiposidade corporal (Maffei *et al.*, 1995; Considine *et al.*, 1996; Frederich *et al.*, 1995). Por conseguinte, sujeitos obesos têm elevados níveis de leptina associados com redução na sensibilidade deste hormônio (Maffei *et al.*, 1995). Estudos sugerem que alterações na ação da leptina na região hipotalâmica poderiam estar relacionadas com a suscetibilidade no desenvolvimento da obesidade (Levin *et al.*, 2004; Tulipano *et al.*, 2004).

A leptina é controlada por diversas substâncias, como insulina, GCs e citocinas pró-inflamatórias. Assim, um aumento nos níveis desta reduz a ingestão alimentar, enquanto níveis mais baixos induzem à alimentação (Stunkard *et al.*, 2003). Os níveis de concentração da leptina encontram-se aumentados durante a noite em indivíduos com hábitos diurnos e peso saudável (Qin *et al.*, 2003). Dietas hipercalóricas provocam um aumento nos níveis séricos de leptina e do peso corporal (20%) quando comparada com a dieta padrão, como ilustrado em roedores (Moraes *et al.*, 2003), sugerindo que a leptina está envolvida no controle de feedback de ingestão de gordura.

Estudos em ratos mostraram que a leptina apresenta oscilações circadianas em concentrações plasmáticas, com picos plasmáticos tardios que ocorrem no período escuro (período ativo) e o seu nadir (menor nível, no fim do período de luz). Uma vez que o período escuro representa também o período alimentar ativo em roedores, os resultados sugerem que o ritmo circadiano expresso na leptina pode ser um comportamento antecipatório, com níveis mais baixos do hormônio no início do período alimentar para facilitar a alimentação máxima durante este período e os níveis aumentando gradualmente até a concentração máxima no

final do período de alimentação para facilitar a supressão da ingestão de alimentos durante o período inativo (Sánchez *et al.*, 2004).

2.5.3 PERFIL LIPÍDICO

Muitos trabalhos têm discutido qual deve ser a composição ideal da dieta da população em geral. Não é sabido, tampouco, se a substituição de gorduras por carboidratos pode trazer benefícios e até que ponto é plausível restringir a ingestão de lipídios, aumentando o consumo de carboidratos, sem causar efeitos adversos no perfil lipídico e na adiposidade corporal. Assim, a importância do processo de lipogênese *de novo* é o possível papel no desenvolvimento de dislipidemias e no acúmulo de gordura corporal (Schutz, 2004b). Estudo realizado em 1973 mostrou que alimentos ingeridos em um tempo incomum podiam provocar diferentes efeitos metabólicos (Nelson, Cadotte e Halberg, 1973). O perfil lipídico é afetado pelo hábito alimentar, percentual de gordura na dieta diária e sua saturação, percentagem de açúcares simples e exercício (Tsai *et al.*, 2003; Afrasiabi *et al.*, 2003). Dietas ricas em lipídios foram usadas em combinação com estresse em alguns estudos (Starzec *et al.*, 1981; Hershock e Vogel, 1989) e foi observado um aumento da atividade do eixo HHA com ingestão da dieta com alto teor de gordura (Tannenbaum *et al.*, 1997; Kamara *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 2002). Alterações nos níveis de lipídios circulantes têm ligação com distúrbios metabólicos. Dietas hipercalóricas estão associadas com obesidade e SM. Do mesmo modo, SM abrange hipertrigliceridemia, diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL), aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), produção anormal de glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina (Reaven, 1988).

Estudos mostram que rupturas nos padrões de sono, muitas vezes ligadas ao estilo de vida, estão associadas com aumento da gordura corporal e alterações no metabolismo. Trabalho noturno, por exemplo, é caracterizado por mudanças nos ritmos biológicos (Yamasaki *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2002). Trabalhadores noturnos aumentam o risco de hipertensão (Kitamura *et al.*, 2002), além disso, desencadeiam outros efeitos metabólicos como, obesidade abdominal, dislipidemia (diminuição do HDL colesterol e aumento dos triglicérides) e alterações na tolerância à glicose (Karlsson *et al.*, 2003; Nagaya *et al.*, 2002; Di Lorenzo *et al.*, 2003), todos sugestivos de que o trabalho noturno pode contribuir para o desenvolvimento da SM. Similarmente, está bem estabelecido que haja uma significativa relação entre o desenvolvimento da obesidade e parâmetros circulantes de lipídios. Estudos em ratos com peso normal sugerem o envolvimento de lipídios circulantes, particularmente

triglicerídeos (TG), que são marcadamente elevados pela administração de uma dieta hipercalórica comparado com dieta padrão e são encontrados por estimular peptídeos hipotalâmicos conhecidos por aumentar a alimentação (Chang *et al.*, 2007; Gaysinkaya *et al.*, 2007). Outras evidências sugerem que níveis elevados de triglicerídeos podem ter impacto sobre mecanismos cerebrais que controlam a alimentação e podem desta forma, contribuir com o desenvolvimento de hiperfagia, promovendo superalimentação e levando ao aumento do peso corporal, desenvolvendo alterações metabólicas que podem desencadear obesidade e síndrome metabólica (Chang *et al.*, 2004; Onat *et al.*, 2006; Gaysinkaya *et al.*, 2007).

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Considerando que a incidência de obesidade e de síndrome metabólica continua a aumentar no mundo industrializado e que essas patologias estão intensamente ligadas ao estilo de vida da sociedade atual submetida a altos níveis de estresse diário, ingestão de calorias em excesso, sedentarismo e a predisposição genética, resultando em perturbações do ritmo circadiano, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da associação de um modelo animal de obesidade e estresse crônico sobre o padrão temporal de marcadores adipogênicos em ratos Wistar.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para avaliar o efeito de um modelo de estresse crônico por restrição associado a um modelo de obesidade no padrão temporal de marcadores adipogênicos em ratos Wistar os animais foram mortos em três horários: ZT0, ZT12 e ZT18. *Zeitgeber* time (ZT) é o tempo (em horas) referente ao início da fase clara, ou seja, ZT0 equivale ao horário das 7 horas da manhã, quando a luz do biotério era ligada e ZT12 ao horário das 19 horas da noite, quando a luz do biotério era desligada, sendo ZT18 equivalente à 1 hora da manhã. Para todos os horários, foram também utilizados animais controles (sem aplicação de estresse e expostos a dieta padrão).

Foram avaliados, em soro de ratos, os padrões temporais de:

- ✓ Adiponectina;
- ✓ Leptina;
- ✓ Corticosterona;
- ✓ Colesterol Total e Triglicerídeos.

Como controle da eficácia do modelo de dieta hipercalórica em induzir obesidade também foi avaliado o peso semanal, delta de peso (Δ = peso final – peso inicial), índice de Lee (razão entre a raiz cúbica do peso corporal (g), sobre o comprimento naso-anal (cm), para avaliação da massa corporal) e o peso de frações dos tecidos adiposos específicos: regiões mesentérica, subcutânea e pericárdica.

IV. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007;91 (4):449–58.
2. Afman L, Müller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc.* 2006;106(4):569-76.
3. Ahima RS. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(Suppl 1):9S–15S.
4. Albers N 2001 Overview of pulse actions in the human. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S39-42.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059 –1062.
6. Araújo, John Fontenele; Marques, Nelson. *Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária*, São Paulo: Margem. nº 15. páginas 95-112, Junho 2002.
7. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*1999; 257: 79 – 83.
8. Afrasiabi A, Hassanzadeh S, Sattarivand R, Mahboob S. Effects of Ramadan fasting on serum lipid profiles on 2 hyperlipidemic groups with or without diet pattern. *Saudi Med J* 2003; 24:23-6.
9. Bailey SL, Heitkemper MM. Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. *Chronobiol Int* 2001;18:249–61.
10. Banks WA, Lebel CR. Strategies for the delivery of leptin to the CNS. *J Drug Target.* 10(4): 297-308,2002.
11. Bartness, T. J., Somg, C. K., Demas, G. E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms* 16, 196-204.
12. Bernardi, F., Harb, A.B.C., Levandovski, R.M. & Hidalgo, M.P. (2009). Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. *Ver. Psiquiatr. Rio Gd. Sul* 31, 170-176.
13. Bjorntorp P (2001) Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* 2: 73–86.
14. Bob P, Fedor-Freybergh P. Melatonin, consciousness, and traumatic stress. *J Pineal Res* 2008; 44: 341-347.
15. Boden G, Chen X, Polansky M. Disruption of circadian insulin secretion is associated with reduced glucose uptake in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48(11):2182–2188.
16. Boden, M.J., Kennaway, D.J., 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132, 379-392.
17. Bradbury MJ, Cascio CS, Scribner KA, Dallman MF. Stress-induced adrenocorticotropin secretion: diurnal responses and decreases during stress in the evening are not dependent on corticosterone. *Endocrinology* 1991; 128:680–8.

18. Buijs, R.M; Wortel, J; van Heerikhuize, J.J; Feenstra, M. G P.; Ter Horst, G.J; Romijn, H.J; Kalsbeek, A; 1999. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience* 11, 1535-1544.
19. Caimari A, Oliver P, Keijer J, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *OMICS* 2010;14:129–14.
20. Cardoso FRG, Cruz FAO, Silva D, Cortez CM. A simple model for circadian timing by mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009. 42: 122-127.
21. Chang, G.Q., Karatayev, O., Davydova, Z., Leibowitz, S.F., 2004. Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology* 145,3904–3912.
22. Chang, G.Q., Karatayev, O., Ahsan, R., Gaysinskaya, V., Marwil, Z., Leibowitz, S.F., 2007. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E561–570.
23. Chrousos DP, MD. Organization and integration of the endocrine system. *National Institute of Health. Sleep Med Clin.* June:2(2): 125-145, 2007.
24. Clement, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Penicaud, L., Ktorza, A., 2002. Intracerebroven tricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch.* 445, 375–380.
25. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292–295.
26. Costa JV, Duarte JS. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port* 2006; 19:251-6.
27. Cottone P, et al. Crf system recruitment mediates dark side of compulsive eating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2009.
28. Crispim, C.A., Zalcman, I; Dattilo, M., Padilha, H.G., Tufik, S. & Mello, M.T. (2007). [Relation between sleep and obesity: a literature review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 51, 1041-9.
29. Czeisler, C. A., Klerman, E. B., 1999. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Progress in Hormone Research*, Vol 54 54, 97-132.
30. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, and Manalo S. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11696–11701, 2003.
31. Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: selfmedication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 2005;19(4):275–80.
32. Da Motta GR, Zanesco A. Leptina, grelina, e exercício físico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 25-33.

33. De Kloet ER, Sutanto W, van den Berg DT, Carey MP, van Haarst AD, Hornsby CD, Meijer OC, Rots NY, Oitzl MS. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993; (1-6):183-90. Review.
34. Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C, L'Abbate N, Basso A, Pannacciulli N, Cignarelli M, Giorgino R & Soleo L (2003). Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 1353–1358.
35. Duguay D, Cermakian N. (2009). The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol. Int.* 26:1479–1513.
36. Eguchi R, Cheik NC, Oyama L M, Nascimento CMO, Mello MT, Tufik S, Dâmaso A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Rev Bras Med Esporte*, Jun 2008, vol.14, no.3, p.182-187. ISSN 1517-8692.
37. Eikelis, N., Schlaich, M., Aggarwal, A., Kaye, D., & Elser, M. (2003). Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension*, 41, 1072-1079.
38. Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N, Madej a. Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet Scand*; 50:48, 2008.
39. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26(1):37–49.
40. Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H. Stress in cardiovascular diseases. *Med Sci Monit* 2002;8:RA93–RA101.
41. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004; 20(2):218-24.
42. Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(5):911-919.
43. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1045–50.
44. Fonseca-Alaniz, M.H; Takada, J; Alonso-Vale, M.I.C; Lima, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabolismo.* São Paulo, v. 50, n. 2, 2006.
45. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, et al: Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1: 1311–1314.
46. Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 61- 71.

47. Gaysinskaya, V.A., Karatayev, O., Chang, G.Q., Leibowitz, S.F., 2007. Increased caloric intake after a high-fat preload: relation to circulating triglycerides and orexigenic peptides. *Physiol. Behav.* 91, 142–153.
48. Gibson EL. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav* 2006;89(1):53–61.
49. Goldbeter A, Gérard C, Leloup JC. Circadian rhythms and systems biology. *Med Sci (Paris)*. 2010; 1:49-56.
50. Goshen I, Yirmiya R, Iverfeldt K, Weidenfeld J (2003). The role of endogenous interleukin-1 in stress-induced adrenal activation and adrenalectomy-induced adrenocorticotrophic hormone hypersecretion. *Endocrinology* 144:4453–4458.
51. Halberg, F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol*, 31, 675-725.
52. Hanifin JP, Brainard GC. Photoreception for circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral regulation. *J Physiol Anthropol* 2007; 26: 87-94.
53. Hastings, M. H., 1991. Neuroendocrine rhythms. *Pharmacology & Therapeutics* 50, 35-71.
54. 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* 4, 649-661 (August 2003).
55. Hastings JW. The *Gonyaulax* clock at 50: translational control of circadian expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72: 141–144, 2007.
56. Hauffa BP 2001 Clinical implications of pulsatile hormone signals. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S1-8.
57. Haus, E., Smolensky, M., 2006. Biological clocks and shift work: Circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes & Control* 17, 489-500.
58. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S143-51.
59. Heyne A, Kiesselbach C, Sahún I et al. An animal model of compulsive foodtaking behaviour. *Addict Biol* 2009;14:373–383.
60. Hershock D, Vogel WH: The effects of immobilization stress on serum triglycerides, nonesterified fatty acids, and total cholesterol in male rats after dietary modifications. *Life Sci* 45:157-165, 1989.
61. Hofstra, W.A., de Weerd, A.W., 2008. How to assess circadian rhythm in human: A review of literature. *Epilepsy & Behavior* 13, 438-444.
62. Huan, J.-N., J. Li, Y. Han, K. Chen, N. Wu, and A. Z. Zhao. 2003. Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 278:45638–45650.
63. Ichikawa T. Mutual coupling among insect neurosecretory cells with an ultradian firing rhythm. *Neurosci Lett* 2001; 299: 73-76.

64. I-DBSM, I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005.
65. IDF Internacional Diabetes Federation: The consensus world-wide definition of the metabólica syndrome. April 14, 2005.
66. Ioffe, E., Moon, B., Connolly, E. and Friedman, J. M. (1998): Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 11852-11857.
67. Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2:297-307.
68. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784–1792.
69. Kamara, K., Eskay, R., Castonguay, T., 1998. High-fat diets and stress responsivity. *Physiol. Behav.* 64, 1–6.
70. Karlsson BH, Knutsson AK, Lindahl BO & Alfredsson LS (2003). Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study. *Int Arch Occup Environ Health* 76, 424–430.
71. Kern W, Offenheuser S, Born J, Fehm HL. Entrainment of ultradian oscillations in the secretion of insulin and glucagon to the nonrapid eye movement/rapid eye movement sleep rhythm in humans [Resumo]. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1541-7.
72. Kevenansky R, Fukuhara K, Pacak K, Cizza G, Goldstein DS, Kopin IJ. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology* 1993;133:1411–9.
73. Kitamura T, Onishi K, Dohi K, Okinaka T, Ito M, Isaka N & Nakano T (2002). Circadian rhythm of blood pressure is transformed from a dipper to a non-dipper pattern in shift workers with hypertension. *J Hum Hypertens* 16, 193–197.
74. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, Kahn R. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2007;30:1647–1652.
75. Knutsson A 2003 Health disorders of shift workers. *Occup Med* 53:103–108.
76. Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 2007; 11:163–178.
77. Kotelevtsev Y, et al. (1997) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14924–14929.

78. la Fleur, S.E., Akana, S.F., Manalo, S., Dallman, M.F., 2004. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology* 145, 2174–2185.
79. Lavie, P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol*, 52, 277-303.
80. Leal AM, Moreira AC (1997) Food and the circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Braz J Med Biol Res*30:1391–1405.
81. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U (2001). Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*20:7128–7136.
82. Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A. and Banks, W. A. (2004): *Aro. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 143-150.
83. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:8–13.
84. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1.
85. Markus, Regina Pekelmann, Barbosa, Eduardo José Mortani, Ferreira, Zulma Silva. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein* 2003. 1:143 – 148.155–1161.
86. Markus, Regina P., Ferreira, Zulma S., Fernandes, Pedro A.C.M., Cecon, Erika. The Immune-Pineal Axis: A Shuttle between Endocrine and Paracrine Melatonin Sources. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:126–133.
87. Marques, M. D; Golombek, D. e Moreno, C; 2003. Adaptação temporal. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org). *Cronobiologia: princípios e aplicações* (pp. 55-98). São Paulo: Edusp.
88. Martínez-Carpio PA, Corominas A. Introducción general a la cronobiología clínica y a la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. *MedClin (Barc)* 2004; 123 (6): 230-5.
89. Masuzaki H, et al. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166–2170.
90. McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 886, 172–189.
91. Mikurube, H. et al. 2005. Association of change in the type of job with prevalence of components of the metabolic syndrome: special reference to job stress.
92. Miller GE, Chen E, Zhou ES 2007 If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull* 133:25–45.
93. Mirick, D.K; Davis, S; 2008. Melatonin as a Biomarker of Circadian Dysregulation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 3306-3313.
94. Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Noguchi S. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 15;9(15):5699-704.

95. Mohawk, J.A; Pargament, J.M; Lee, T.M; 2007. Circadian dependence of corticosterone release to light exposure in the rat. *Physiology & Behavior* 92, 800-806.
96. Moore-ede, M.C; 1986. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* 250, R737-752.
97. Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B. and O'Rahilly, S. (1997): *Nature*, 387, 903-908.
98. Moraes, R. C., A. Blondet, K. Birkenkamp-Demtroeder, J. Tirard, T. F. Orntoft, A. Gertler, P. Durand, D. Naville & M. Begeot: Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcriptionpolymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 2003, 144, 4773–4782.
99. Morris MJ, Chen H, Watts R, Shulkes A, Cameron-Smith D. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:249–258.
100. Moser M, Penter R, Fruehwirth M, Kenner T. Why life oscillates--biological rhythms and health. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2006; 1:424-428.
101. Moser, M., Penter, R., Fruehwirth, M., Kenner, T., 2006b. Why life oscilattes biological rhythms and health. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 424-428.
102. Nagaya T, Yoshida H, Takahashi H & Kawai M (2002). Markers of insulin resistance in day and shift workers aged 30–59 years. *Int Arch Occup Environ Health*75, 562–568.
103. NCEP, National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III -ATPIII, 2001.
104. Nelson W, Cadotte L, Halberg F. Circadian timing of single daily meal affects survival of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 144:766-9.
105. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002 Mar 28;34(1):13-25. Review.
106. Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(7):1195-200.
107. Ohdo, S. (2007). Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 3-14.
108. Oliver G, Wardle J. Perceived effects of stress on food choice. *Physiol Behav* 1999;66(3):511–5.
109. Onat, A., Sari, I., Yazici, M., Can, G., Hergenc, G., Avci, G.S., 2006. Plasma triglycerides, an independent predictor of cardiovascular disease in men: a prospective study based on a population with prevalent metabolic syndrome. *Int. J. Cardiol.* 108, 89–95.

110. Ostrander M.M, Ulrich-Lai Y.M, Choi D.C, Richtand N.M, Hermann J.P. Hypoatividade of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, 2006 April; 147(4): 2008-2017.
111. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 100(25), p. 2473-6, 1999.
112. Pauli RJ, Souza L, Rogatto G, Gomes R, Luciano E. Glicocorticóides e síndrome metabólica: aspectos favoráveis do exercício físico nesta patofisiologia. *Rev Port Cien Desp* 6(2) 218-228, 2006.
113. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2003; 17(2):221-8.
114. Pittendrigh, C. H. (1960), Circadian rhythms and circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, n. 25: 159-182.
115. Polacow VO, Lancha AHJ. Dietas hiperglicídicas: efeito da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídeos, adiposidade corporal e sua associação com a atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51(3):389-400.
116. Prins J.B: Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16(4):639-651.
117. Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S. M., Patel, H. R., Berg, A. H. and Pajvani, U. B., Scherer P. E. and Ahima R.S. (2004): *Nat. Med.* 10, 524-529.
118. Qin, L.Q; Li, J; Wang, Y; Wang, J; Xu, J.Y. & Kaneko, T. (2003). The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sci*, 73, 2467-75.
119. Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 219–240, 2007.
120. Reaven, G. M. Banting lecture. The role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595–1607, 1988.
121. Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63, 647-76.
122. Richter, H. G., Torres-Farfan, C., Rojas-Garcia, P.P., Campino, C., Torrealba, F., Seron-Ferre, M., 2004. The circadian timing system: Making sense of day/night gene expression. *Biological Research* 37, 11-28.
123. Romero CEM, Zanesco A.O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev. Nutr.*, Fev 2006, vol.19, no.1, p.85-91. ISSN 1415-5273.
124. Rothenbacher D, Brenner H, März W, Koenig W. Adiponectin, risk of coronary disease and correlations with cardiovascular risk markers. *European Heart Journal* 2005; 26:1640-6.

125. Ruger, M., Scheer, F., 2009. Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 10, 245-260.
126. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci* 2001;24:91–8.
127. Sánchez J, Oliver P, Pico C, Palou A. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. *Pflügers Arch* 448: 500–506, 2004.
128. SBC-Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.84 suppl.1 São Paulo Apr. 2005.
129. SBH-Sociedade Brasileira de Hipertensão. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Hipertensão*, 2004; 7(4).
130. Scheer FA, Van Doornen LJ, Buijs RM. Light and diurnal cycle affect human heart rate: possible role for the circadian pacemaker. *J Biol Rhythms*. 1999; 14(3):202-12.
131. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4453–4458.
132. Schutz Y. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. *Physiol Behav*. 2004 Dec 30;83(4):557-64. Review.
133. Selye, H. *Stress Without Distress*. New York: New York American Library. 1974.
134. Smolensky, M.H., Peppas, N.A., 2007a. Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 828-851.
135. Starzec JJ, Berger DF, Mason EB, et al: The effects of differential psychological stress and infantile handling on plasma triglyceride and aortic cholesterol levels in rats. *Psychosom Med* 6:509-518, 1981.
136. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2522–5.
137. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Benbrahim-Tallaa L, Cogliano V. Carcinogenicity of shiftwork, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol* 8: 1065–1066, 2007.
138. Stunkard, A.J. & Alisson, K.C. (2003). Two forms of disordered eating in obesity: binge eating and night eating. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 1-12.
139. Tannenbaum, B.M., Brindley, D.N., Tannenbaum, G.S., Dallman, M.F., McArthur, M.D., Meaney, M.J., 1997. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am. J. Physiol.* 273, E1168–E1177.
140. Tempel, D. L.; Leibowitz, S.F; 1994. Adrenal-steroid receptors-interactions with brain neuropeptide system in relation to nutrient intake and metabolism. *Journal of Neuroendocrinology* 6, 479-501.
141. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772–83.

142. Tsai AC, Sandretto A, Chung YC. Dieting is more effective in reducing weight but exercise is more effective in reducing fat during the early phase of a weight-reducing program in healthy humans. *J Nutr Biochem* 2003; 14:541-9.
143. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002; 53(4):865-71.
144. Tulipano, G., Vergoni, A. V., Soldi, D., Muller, E. E. and Cocchi, D. (2004):/. *Endocrinol.*, 183, 289-298.
145. Van Cauter, Eve. Refetoff, Samuel M.D. Evidence for Two Subtypes of Cushing's Disease Based on the Analysis of Episodic Cortisol Secretion. *N Engl J Med* 1985; 312:1343-1349 May 23, 1985.
146. van Cauter, Eve. Diurnal and Ultradian Rhythms in Human Endocrine Function: A Minireview. Vol. 34, No. 2, 1990, *Horm Res* 1990;34:45-53 (DOI: 10.1159/000181794).
147. Verhagen L.A.W; Pevet, P; Saboureau, M; Sicard, B; Nesme, B; Claustrat, B; Buijs, R.M; Kalsbeek, A; 2004. Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murine rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Research* 995, 197–204.
148. von Zerssen, D; Doerr, P; Emrich, H.M; Lund,R; Pirke, K.M; 1987. Diurnal-variation of mood and the cortisol rhythm in depression and normal states of mind. *European Archives of Psychiatry and clinical Neuroscience* 237, 36-45.
149. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216: 3–13, 2008.
150. Weiberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, et al. Repetead ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology*, 2009; 150(2):749-61.
151. Wilkinson KM. Increasing obesity in children and adolescents: an alarming epidemic. *JAAPA*. (2008). Dec;21(12):31-6, 38. Review.
152. Wollnik F. Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Lab Anim* 23: 107-125, 1989.
153. Yamasaki F, Schwartz JE, Gerber LM, Warren K & Pickering TG (1998). Impact of shift work and race/ethnicity on the diurnal rhythm of blood pressure and catecholamines. *Hypertension*32, 417–423.
154. Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A. High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int*2006;23:905–914.
149. Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, et al. Food selection changes under stress. *Physiol Behav* 2006.
155. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12:295–300.

156. Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(5):361-74.

ARTIGO CIENTÍFICO

**EFFECT OF OBESITY AND CHRONIC STRESS ON THE TEMPORAL PATTERN
OF ADIPOGENIC MARKERS**

Periódico: Chronobiology International

Status: a ser submetido

EFFECT OF OBESITY AND CHRONIC STRESS ON THE TEMPORAL PATTERN OF ADIPOGENIC MARKERS

Carla de Oliveira^{1,3,4}, Vanessa Leal Scarabelot^{2,3,4}, Andressa de Souza^{1,3,4,5}, Cleverson Moraes de Oliveira^{1,3,4}, Liciane Fernandes Medeiros^{2,3,4}, Isabel Cristina de Macedo^{2,3,4}, Paulo Ricardo Marques Filho^{3,4}, Stefania Giotti Cioato^{3,4}, Wolnei Caumo¹, Iraci L S. Torres^{1,2,3,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050–170, Porto Alegre, Brazil.

⁴Unidade de Experimentação Animal, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

⁵Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências Básicas da Saúde, Centro Universitário Univates, 95900-000, Lajeado, Brazil.

Conflict of Interest: There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

Running Head: Chronic stress and obesity altered circadian rhythms

ABSTRACT

Disorganization in the circadian system can lead to metabolic dysfunction in response to environmental alterations. Obesity and metabolic syndrome associated with chronic stressors triggers physiological and neuroendocrine changes with modifications of energy balance and adiposity. For the present study, we assess the effects of the association animal models of obesity and chronic stress on the temporal pattern of serum levels of adipogenic markers (adiponectin, leptin, triglycerides, total cholesterol) and of corticosterone (to control of chronic stress model) of rats. Additionally, we evaluated the weekly weight, the delta weight, the Lee index, and the weight fractions of adipose tissue (mesenteric, MAT; subcutaneous, SAT and pericardial, PAT) to control of hypercaloric diet induced-obesity model efficacy. Male Wistar rats analyzed at three time points: ZT0, ZT12 and ZT18 were divided into the following 4 groups: standard chow (C), hypercaloric diet (HD), stress plus standard chow (S), and stress plus hypercaloric diet (SHD). The animals of stress groups were subjected to chronic stress for 1 h per day, 5 days per week, during 80-days. Our results show that chronic exposure to hypercaloric diet is an effective model to induce obesity and metabolic syndrome in rats, increasing the weight delta, Lee index, weight fractions of adipose tissue, triglycerides and leptin levels. Additionally, it was confirmed the presence of a temporal pattern in the release of triglycerides, corticosterone, leptin and adiponectin in naïve animals. The chronic stress reduced weight delta, the mesenteric adipose tissue weight and levels of triglycerides, total cholesterol and leptin. There was interaction between chronic stress and obesity in the total cholesterol, and there was interaction between time points and obesity in adiponectin and corticosterone levels, also there was interaction between time points and chronic stress in leptin levels. In conclusion, both parameters were able of desynchronize the rhythms of leptin and triglycerides on temporal pattern. Thus, the impact of desynchronization of an organism with environmental factors contributes to the development of metabolic diseases such as obesity and metabolic syndrome.

Keywords: Circadian rhythms, obesity, metabolic syndrome, hypercaloric diet and chronic stress.

Introduction

Chronic diseases such as obesity and metabolic syndrome, present pathogenesis related to genetic factors and environmental, including dietary habits and stressful situations (Bartolomucci et al., 2009). Worldwide changes in diet composition together with a more sedentary way of life may contribute to the incidence and severity of these diseases (Synder et al., 2004; Afman & Müller, 2006). The consumption of hypercaloric diet often has been appointed as responsible for the increase in adiposity (Jequier, 2002). While the causes of obesity are complex, the increasing availability of highly palatable foods rich in fat has played a key role (Stein et al., 2004). Feeding behaviors that trigger obesity include frequent consumption of fast food meals; intake of snacking (Piernas & Popkin, 2010); and sweetened beverages (Flood et al., 2006); and consumption of high-calorie foods, such as high-fat, low fiber foods (Ledikwe et al., 2005). This disease is characterized by excessive buildup of adipose tissue and has been linked with the development of cardiovascular and metabolic diseases, such as impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, type II diabetes mellitus, dyslipidemia, and hypertension (Eikelis et al., 2003).

Beyond the wide variety of comfort foods that are available to people, there is also a high level of perceived stress in modern society (Dallman et al., 2003). The increasing stress of daily life can cause physiological and neuroendocrine changes (Björntorp, 2001; Ostrander et al., 2006), which are associated with an increased food intake and adipogenesis (Roberge et al., 2007). The stress response is related with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HHA) activation with consequence release of hormones such as corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and glucocorticoids (GCS) (Buckingham, 2006; Graeff, 2007). The axis HHA is a key hormonal system that has a well-characterized temporal pattern. Therefore, a dysfunction of HHA axis (Putignano et al., 2001; Gluck et al., 2004) and disruption circadian rhythms (Froy, 2007) are implicated in the pathogenesis of eating disorders such as obesity (Froy, 2007) and metabolic syndrome (Buijss & Kreier, 2006; Staels, 2006) that can lead to abdominal obesity associated with a higher waist-to-hip-ratio and body mass index (BMI) (Epel et al., 2000; Smith et al., 2005).

Chronic metabolic dysfunction is linked to circadian and metabolic consequences including modifications of energy balance (Loos & Bouchard, 2003), elevated body mass index (Parkes, 2002), altered plasma lipid metabolism and adiposity (Karlsson et al., 2003) and increased risk for cardiovascular disease (Ramsey et al., 2007). Lifestyle changes such as

an excessive caloric intake are known to contribute on growth obesity and metabolic syndrome, not only in industrialized nations but also in developing countries (Simmons et al., 2010; Klein et al., 2007).

Additionally, stress is also among the main exogenous regulators of circadian rhythms (Albers, 2001; Hauffa, 2001). Under the influence of stress, this pattern is altered and homeostasis of stress related neuroendocrine function is disrupted, with adverse impact on health (Albers, 2001; Hauffa, 2001). Alterations in circulating lipids and glucocorticoids (GCs) are also involved in the physiological processes of adipose tissue, including adipogenesis and lipid metabolism (Mattsson & Olsson, 2007). Likewise, the chronic activation of the stress axis may be linked to the risk of metabolic disorders and altered energy homeostasis (Björntorp, 2001).

In recent years white adipose tissue has been recognized as playing a fundamental role in many pathological states including diabetes, obesity and metabolic syndrome. It is an endocrine organ, producing adipokines such as adiponectin and leptin. These hormones play an important role in regulating energy homeostasis, with adiponectin controlling fat metabolism and insulin sensitivity; and leptin suppressing food intake and stimulating energy expenditure (Wang et al., 2008). However, previous studies have demonstrated that diet and feeding time have an impact on secretion rhythms (Le Minh et al., 2001; Leal & Moreira, 1997). An interesting question is that diet composition (Kohsaka et al., 2007) and timing of feeds have also been shown to modulate the circadian clock (Stokkan et al., 2001; Mendoza, 2007). Furthermore, there is a significant correlation between the circadian clock, development of obesity and circulating lipid parameters (Holmes et al., 2009). Similarly, oscillations in glucocorticoid secretion have been observed (Kohsaka et al., 2007; Ishida et al., 2005). Interestingly, in obese humans, disruption of the 24-hour profiles of leptin and adiponectin was observed compared to healthy lean subjects (Mingrone et al., 2005; Yildiz et al., 2004). Thus, adipokines, glucocorticoids and lipid profile are expressed in a circadian manner in humans (Loboda et al., 2009) and rats (Kohsaka et al., 2007). Therefore, it is tempting to speculate that the regulation of oscillation adipokines, glucocorticoids and lipids may be important in metabolic homeostasis.

Considering the strong interactions of diet exposure and stress, and which the most physiological activities, such as feeding and energy expenditure are regulated in a circadian manner, the present study was designed to assess the effects of the association animal models of obesity and chronic stress on the temporal pattern of serum levels of adipogenic markers (adiponectin, leptin, triglycerides, cholesterol) and of corticosterone (to control of chronic

stress model) of rats. Additionally, we evaluated the weekly weight, the delta weight, the Lee index, and the weight of specific adipose tissue fractions (mesenteric, MAT; subcutaneous, SAT and pericardial, PAT) to control of hypercaloric diet induced-obesity model efficacy.

2. Materials and methods

2.1 Animals

A total of 98 naive adult male Wistar rats (60 days-old; weighing 200–250 g) were used. Rats were randomized by weight and housed in groups of four in home cages made of Polypropylene material (49 cm x 34cm x 16cm) with the floor covered with sawdust. The animals were maintained under a standard light-dark 12:12 cycle (lights-on at 07:00 h, *Zeitgeber* time (ZT0), and lights-off at 19:00 h, (ZT12), in a controlled environment (22±2°C), with water and chow available *ad libitum* (cafeteria diet and/or standard chow). The *Zeitgeber* time was used as a reference to detect the rhythmicity of the variables under study. All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA protocol No.100383) and were compliant with Brazilian guidelines involving the use of animals in research (Law No. 11, 794). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the Journal for Laboratory Animal Research (Portaluppi et al., 2008). Animal handling and all experiments were performed in accordance with international guidelines for animal welfare and measures were taken to minimize animal pain and discomfort. The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2 Experimental Design

The rats were habituated to the maintenance room for 1 week before the experiment commenced. The animals were divided into the following 4 groups: standard chow (C), hypercaloric diet (HD), stress plus standard chow (S), and stress plus hypercaloric diet (SHD), according to chronic stress exposure and the type of diet used (cafeteria diet and/or standard chow). The animals were weighed weekly, and the food intake was registered daily (data not shown). After 80-days treatments, the rats were submitted to 12h fasting and 24h after last session of stress the animals were killed by decapitation at three 3 time points: ZT0 (7am), ZT12 (7pm) and ZT18 (1am).

2.3 Stress procedure

The animals were subjected to chronic restraint stress model (Ely et al., 1997), it was performed using a plastic tube (25 cm x 7cm) fixed with adhesive tape on the outside, adjusted to avoid discomfort, but limiting the movements of the animal, with the front of the tube remained open to allow breathing. The animals were exposed daily to 1h of stress by the morning (between 9am to 12pm), 5 days a week for twelve weeks (Ely et al., 1997) (no stress on weekends). After the stress procedure, the animals were returned to the home cages. Control animals were kept in their home cages throughout the period of treatment. The apparatus was ventilated to avoid physical compression, hyperthermia and sweating.

2.4 Experimental diets

The standard rat chow Nuvilab CR-1 (NUVITAL ®, Curitiba, PR, Brazil) provides energy content a total of 2.93 kcal/g (information provided by the manufacturer), and is composed of 55% carbohydrates, 22% protein, 4.5% lipids, and other constituents (fiber and vitamins). The cafeteria diet (palatable high calorie diet) consists of about 60% carbohydrates, 20% lipids, 15% protein and 5% other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives, minerals etc.) reaching a total of 4.186 Kcal/g and 0.42 kcal/mL (calculated based on information provided by the manufacturer on the package label). Cafeteria diet was chosen because it mimics modern patterns of human food consumption and has been used successfully in experimental studies to induce obesity in lean animals (Estadella & Oyama et al. 2004; Kumar et al., 2011). This diet was adapted from a diet known as the cafeteria diet or Western diet, previously described by Estadella et al. (2004). Foods included in the cafeteria were crackers, sausages, snacks foods, wafers, condensed milk and soda. As well as the standard chow, the experimental diet was replaced daily with fresh food. The exposed animals to hypercaloric diet also had access to standard food and water.

2.5 Parameters used to control of hypercaloric diet induced-obesity model efficacy

The rats were weighed weekly, and the weight delta was established as the difference between final and basal weights. At the end of the experiment, the naso-anal length (cm) of the animals was measured to determine the Lee index. This index, which was adapted from Moura and Cols, corresponds to the ratio between the cube root of the body weight (g) and the naso-anal length (cm) of the animals multiplied by 10 (de Moura et al., 2009). The specific adipose tissues (mesenteric, subcutaneous and pericardial) were dissected manually and were

weighed using a semi-analytical balance. The data were expressed as grams of tissue per 100g of body weight (weight tissue/body weight x 100).

2.6 Blood sampling and tissue collection

The animals were killed by decapitation, and the blood and tissue samples were collected 24 h after the last session of chronic restraint stress and after a 12-h fast. The specific adipose tissues (mesenteric, subcutaneous and pericardial) were immediately removed and weighed. Trunk blood was drawn, and blood samples were centrifuged in plastic tubes, for 5 min at 5000 x g at room temperature. This method was used to favor the collection of large volumes of blood serum for analysis. Likewise, this model permits the determination of biochemical effects, including hormonal effects. Serum was obtained and frozen at -20°C until assays were performed.

2.7 Biochemical and hormonal assays

Commercial ELISA kits were used to quantify serum adiponectin levels (EZRADP-62K Rat Adiponectin ELISA KIT, Millipore, St. Charles, MO). The serum leptin levels were measured using (EZRL-83K Rat Leptin ELISA KIT, Millipore, St. Charles, MO). All data were expressed as ng/mL. Corticosterone serum level was measured using a commercially available ELISA kit (IBL-America #IB79112), and the data are expressed as pg/mL. The concentration of Total Cholesterol (TC) and triglycerides (TG) was measured spectrophotometrically using a commercial kit (Labtest), and the data are expressed as mg/dL. These commercial kits were used as described by the manufacturer's protocols.

2.8 Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M). To verify the existence of temporal pattern of release of hormones and lipids it was realized comparison between time points (ZTs) of control group by one-way ANOVA followed Student-Newman-Keuls (SNK). The basal weight of the animals was compared between the groups using one-way ANOVA/SNK and the weekly weight was evaluated using two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni. The other data and interactions were evaluated by two-way ANOVA using obesity and chronic stress as independent factors and time points (ZTs) as co-variable followed by Bonferroni correction for multiple comparisons when necessary, and the interactions evaluated were chronic stress x obesity, time points x chronic stress, time points x obesity, and time points x obesity x stress). The differences between

groups were considered significant at $P < 0.05$. SPSS 19.0 for Windows was used for Statistical analysis.

3. Results

3.1 Weekly weight (Fig. 1, Panel A)

There were no significant differences for basal weight between groups (one-way ANOVA, $P > 0.05$, $F_{(3,96)} = 0.70$, data not shown). The results of two-way ANOVA for repeated measures confirmed an effect of time ($F_{(11,86)} = 94.54$, $P < 0.05$), stress ($F_{(1,96)} = 9.31$, $P < 0.05$) and hypercaloric diet ($F_{(1,96)} = 9.53$, $P < 0.05$) (Fig 1, Panel A). Additionally, there was an interaction between time and chronic stress ($F_{(11,86)} = 2.25$, $P < 0.05$) and between time and hypercaloric diet ($F_{(11,86)} = 3.59$, $P < 0.05$). On the other hand, there were no interactions between chronic stress x hypercaloric diet ($F_{(1,96)} = 0.03$, $P > 0.05$), and between time x chronic stress x hypercaloric diet ($F_{(11,86)} = 1.22$, $P > 0.05$).

3.2 Weight delta (Fig 1, Panel B) and Lee index (Fig 1, Panel C)

For the weight delta the two-way ANOVA showed an effect of chronic stress and hypercaloric diet ($F_{(1,96)} = 7.10$ and $F_{(1,96)} = 12.20$ $P < 0.05$, respectively) (Fig 1, Panel B.). These results demonstrated that chronic stress reduced the body weight delta, whereas the hypercaloric diet increased this parameter. The Lee index was altered by hypercaloric diet ($F_{(1,95)} = 9.82$, $P < 0.05$), but no effect of chronic stress ($F_{(1,95)} = 0.57$, $P > 0.05$) in the Lee index (Fig 1, Panel C), and no interaction was observed between these independent factors ($F_{(1,95)} = 2.00$, $P > 0.05$), two-way ANOVA.

----- Insert Fig.1 -----

3.3 The adipose tissues (mesenteric, subcutaneous and pericardial) relative weights (Table 1)

Two-way ANOVA showed that there was a significant effect of chronic stress ($F_{(1,95)} = 10.84$, $P < 0.05$) and hypercaloric diet ($F_{(1,95)} = 28.83$, $P < 0.05$) in the MAT relative weights, but no interaction between these independent factors ($F_{(1,95)} = 0.003$, $P > 0.05$). In SAT relative weights, there was effect of hypercaloric diet ($F_{(1,95)} = 5.21$, $P < 0.05$), but no effect of stress ($F_{(1,95)} = 3.41$, $P > 0.05$), and there was no interaction between these independent factors ($F_{(1,95)} = 0.64$, $P > 0.05$). In the PAT relative weights there was effect of hypercaloric diet ($F_{(1,94)} = 7.53$, $P < 0.05$), but no effect of chronic stress ($F_{(1,94)} = 0.21$, $P > 0.05$). Also, there was no observed an interaction between these independents factors ($F_{(1,94)} = 1.10$, $P > 0.05$).

----- Insert Table.1-----

3.4 Biochemical and hormonal assays (Figure 2)

Hormonal and biochemical markers were evaluated in rat blood serum 24h after the last session of chronic stress of the animals that were killed by decapitation at three time points (ZT0, ZT12 and ZT18).

3.4.1. Total cholesterol levels:

Two-way ANOVA showed that the total cholesterol levels was reduced by chronic stress ($F_{(1,57)}=21.21$, $P>0.05$) and there was interaction between chronic stress x obesity ($F_{(1,57)}=63.44$, $P<0.05$) (Fig.2, panel A). There was not effect of obesity ($F_{(1,57)}=0.01$, $P>0.05$), neither between time points x chronic stress ($F_{(2,57)}= 8.14$, $P>0.05$), time points x obesity ($F_{(2,57)}=16.68$, $P>0.05$), and time points x stress x obesity ($F_{(2,57)}=0.049$, $P>0.05$). Although two-way ANOVA not showed effect of time points, the Bonferroni post hoc test demonstrated an increase of cholesterol levels on ZT0 ($F_{(2,57)}=3.65$, $P<0.05$).

3.4.2 Triglycerides levels:

Considering only control group it is possible perceive there are a temporal pattern on releasing of triglycerides levels (one-way ANOVA/SNK, $F_{(2,60)}=6.01$, $P<0.05$; Fig.2, panel B). In relation to the triglycerides levels, the two-way ANOVA not showed difference between the groups, however the Bonferroni post-hoc test demonstrated that obesity increased significantly the serum triglycerides levels ($F_{(1,51)}=13.87$, $P<0.05$), also post hoc test showed that stress reduced levels of triglycerides ($F_{(1,51)}=11.84$, $P<0.05$) and time points showed an increase the serum triglycerides levels in ZT0 ($F_{(2,51)}=11.68$, $P<0.05$) (Fig.2, panel B). No interaction was observed between chronic stress x obesity ($F_{(1,51)}=10.26$, $P>0.05$), time points x stress ($F_{(2,51)}=1.57$, $P>0.05$), time points x obesity ($F_{(2,51)}=0.47$, $P>0.05$), neither between time points x stress x obesity ($F_{(2,51)}=1.80$, $P>0.05$).

-----Figure 3-----

3.4.3. Corticosterone levels:

When evaluated just control group it was possible to observe the pattern temporal on the corticosterone levels ($F_{(2,26)}=9.82$, $P<0.05$), one-way ANOVA/SNK (Fig.2, panel C).

The results of two-way ANOVA in serum corticosterone levels were altered by chronic stress ($F_{(1,78)}=45.17$, $P<0.05$) and it was observed interaction between time points x obesity ($F_{(2,78)}=28.37$, $P<0.05$) (Fig.2, panel C). On the other hand, there was not effect of obesity on corticosterone levels ($F_{(1,78)}=1.06$, $P>0.05$) and it was no interaction between time points x chronic stress ($F_{(2,78)}=0.44$, $P>0.05$), or time points x chronic stress x obesity ($F_{(2,78)}=0.17$, $P>0.05$), neither between chronic stress x obesity ($F_{(1,78)}=3.37$, $P>0.05$).

3.4.4. Adiponectin levels:

Analyzing only control group it is possible observe there is a temporal pattern on releasing of adiponectin ($F_{(2,12)}=5.94$, $P<0.05$, one-way ANOVA/SNK, Fig.2, panel D).

The two-way ANOVA analysis showed the that the adiponectin levels were modified by temporal variation ($F_{(2,53)}=31.14$, $P<0.05$), increasing levels of adiponectin in ZT0. Also there was an interaction time points x obesity ($F_{(2,53)}=21.13$, $P<0.05$) (Fig.2, panel D). Otherwise, the chronic stress, and obesity did not have effect on adiponectin levels ($F_{(1,53)}=7.24$, $F_{(1,53)}=0.63$, respectively, $P>0.05$ for both), and also, there was no interaction between these independent factors ($F_{(1,53)}=0.41$, $P>0.05$). Furthermore, there was no interaction between time points x stress ($F_{(2,53)}=12.89$, $P>0.05$), and between time points x obesity x stress ($F_{(2,53)}=0.008$, $P>0.05$).

3.4.5. Leptin levels:

Evaluating the temporal pattern of leptin releasing in control group in the different time points we found that there was a rhythm of releasing of this hormone ($F_{(2,12)}=11.13$, $P<0.05$, one-way ANOVA/SNK, Fig.2, panel E).

The two-way ANOVA showed that the leptin levels was altered by obesity ($F_{(1,54)}=20.74$, $P<0.05$) (Fig.2, panel E), but not by chronic stress ($F_{(1,54)}=3.56$, $P>0.05$) and there was interaction time points x stress ($F_{(2,54)}=19.41$, $P<0.05$), but no interaction between time points x obesity ($F_{(2,54)}=8.72$, $P>0.05$) or time points x obesity x chronic stress ($F_{(2,54)}=0.19$, $P>0.05$). Although the two-way ANOVA not showed effect of chronic stress, the Bonferroni post-hoc test demonstrated significant effect of chronic stress in leptin levels ($F_{(1,54)}=13.45$, $P<0.05$).

4. Discussion

Confirming the efficacy of obesity model we demonstrated an increased in the weight delta, Lee index, the serum triglycerides levels, mesenteric, subcutaneous, and pericardial adipose tissue weight (MAT, SAT, PAT) in the rats exposure to hypercaloric diet compared to rats exposure to standard chow. These results associated the increased leptin serum levels demonstrate the establishment of the metabolic syndrome in these animals (Alberti et al., 2005; Lorenzo et al., 2007).

Inversely, the exposure to the chronic restraint stress reduced the weight delta, the mesenteric adipose tissue weight (MAT) and levels of total cholesterol, and triglycerides agreeing with other studies (Macedo et al., 2012; Miklos & Kovacs, 2012). It has shown that chronic stress models reduce food intake, body weight gain, and adiposity (Solomon et al., 2011, Macedo et al. 2012). Unlike, other studies reporting that social stress (Kuo et al., 2007), physical and psychological stress can cause behavioral and biological alterations in both animal and human (Bhat et al., 2007; Gleib et al., 2007), triggering metabolic changes and obesity (Smith et al., 2005).

Thus, we demonstrated in this study that the cafeteria diet consumed during 80 days developed obesity in rats, with increase in body weight and adipose tissue weight. Furthermore, animals that were exposed to the hypercaloric diet and chronic stress showed lower weights regarding to animals that received only the hypercaloric diet. According to Macedo et al. (2012) we can also suggest that the effect of the cafeteria diet on the establishment of obesity was higher than the weight loss imposed by stress (Macedo et al., 2012). The increase of body mass index (BMI- Lee Index) is considered a predisposing factor for metabolic syndrome and propensity to obesity (Baron et al., 2011; Garaulet et al., 2011).

In addition, this study showed that adiponectin levels presented a temporal pattern (a peak in ZT0); showing that the concentration of adiponectin in plasma reaches its peak early in the light/inactive period and the nadir in the dark/active period, and also, there is an interaction between time points and obesity. Likewise, the exposure to hypercaloric diet can influence the responses of the circadian clock and therefore, circadian oscillations of adiponectin become disrupted (Froy, 2007). So, the obesity can alters the adiponectin level probably in the early morning when the animal is in the fed state. Previous studies showed that plasma adiponectin concentrations in non-obese subjects show a 24-h rhythmic cycle, which is absent in the obese subjects (Calvani et al., 2004; Yildiz et al., 2004). It is noteworthy that intra-abdominal adiposity is related with higher expression of adipokines associated with many diseases such metabolic syndrome; obesity, diabetes with the

development of cardiovascular diseases (Bradley et al., 2008). In this context, the growth of abdominal fat can be seen as a symptom of unbalance in metabolism (Kreier et al., 2002).

Furthermore, it has been argued that abdominal fat accumulation is related to chronodisruption (Garaulet et al., 2010). The same manner, circadian disruption either within or among individual tissues may lead to organ dysfunction. Studies suggest that peripheral clock alteration is involved in body weight gain as well as abnormalities in glucose homeostasis and blood pressure regulation, so contributing to the development of the metabolic syndrome. These alterations may be initiated by disruptions in circadian behaviors and/or environmental factors such as hypercaloric diet and stressful factors (Yamazaki et al., 2000).

Corroborating our important findings in relation to fatty tissues we showed that the obesity induced to high leptin levels that is secreted and expressed by adipose tissue in proportion to body fat amount and relays fat storage information to the brain (Dardeno et al., 2010). It has been described that circulating leptin levels are increased after exposure to hypercaloric diet (Zhang & Scarpace, 2006, Macedo et al., 2012). In addition, there is an interaction between time points and chronic stress. Many of the actions of leptin are due to its actions in the hypothalamus (Schwartz et al., 2000). The binding of leptin to its hypothalamic receptors alters several messengers that regulate energy expenditure, food intake, and the activity of the sympathetic nervous system (Rahmouni et al., 2001). Leptin receptors are expressed in many areas of the brain, and one location key to the regulation of food intake is in the arcuate nucleus on neuropeptide Y (NPY) and proopiomelanocortin (POMC) neurons (Ur et al., 2002). Recent evidence suggests that NPY receptors are strongly expressed in human adipocytes, participating in leptin regulating pathways (Nogueiras et al., 2012; Miklos & Kovacs, 2012) and inhibiting lipolysis (Kos et al., 2009). The leptin hormone is involved in the regulation of metabolism and energy homeostasis (Wauters et al., 2001). It is overexpressed in obese subjects, and its plasma levels are related with appetite and energy metabolism (Knudson et al., 2008). Under these conditions, leptin secretion induced by consumption of cafeteria diet, that is rich in calories, is an inappropriate feedback signal that not only down regulates leptin transport across the blood brain barrier but also adversely impacts hypothalamic leptin synthesis (Farooqi et al., 1999). Moreover, obesity has been frequently associated with hyperleptinemia (Ashwin & Dilipbhai, 2007; Dong & Rend, 2007, Macedo et al., 2012), suggesting a leptin-resistant state, and it will be a determining factor in leptin resistance and, as a result, lipotoxicity (Ashwin & Dilipbhai, 2007; Dong & Rend, 2007). However episodes frequent of exposure to stress can cause impact on metabolic,

endocrine and physiological functions (Ostrander et al., 2006; Koolhaas et al., 2011); also temporal patterns alterations induced by environmental factors such as stress may provide insight into the onset and progression of metabolic disorders and circadian disruption. We can suggest that the loss of rhythmicity hormonal, and subsequently, disruption of circadian coordination observed may be manifested by hormone imbalance (Davis & Mirick, 2006). Likewise, circadian variability of circulating leptin levels has been well established (Garaulet et al., 2006). Studies have been demonstrated that numerous metabolic functions occur at specific times of the day (Froy, 2007; Okamura, 2007). The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus controls physiological and behavioral circadian rhythms and coordinates peripheral clocks through hormonal and neural signals (Okamura, 2007). For this reason, the stress exposure can be one of the strongest environmental factor influencing peripheral circadian clocks. Interestingly, studies have shown that exposure to chronic stress causes a decrease in circulating leptin levels (Chuang et al., 2010b; Solomon et al., 2011) corroborating our results. Chuang et al. revealed that chronic stress stimulates the activity of the sympathetic nervous system and thus causes, via β_3 -adrenergic receptor, lipolysis leading to the reduction in fat stores and leptin secretion. This decrease in leptin levels was suggested as an adaptive response to the stress exposure becoming a protection against the detrimental behavioral effects caused by chronic stress (Chuang et al., 2010b).

Considering temporal pattern and serum lipids we observed that plasma triglycerides levels showed circadian oscillations. It is well established that there is significant correlation between the development of obesity and circulating lipid parameters. Our results demonstrated circadian fluctuations and increased of triglycerides levels in the hypercaloric diet induced obesity group, suggesting that hypercaloric diet exposure results in dyssynchronization of the temporal pattern of triglycerides. These increased of triglycerides levels may be related with deregulates energy balance, and it may act to promote overeating, leading to an increase in body weight resulting in metabolic disturbances, which can trigger obesity (Gaysinskaya et al., 2007). Elevated triglycerides levels can have impact on brain mechanisms that control feeding and may contribute to fat-induced hyperphagia (Banks et al., 2004). In addition, levels of triglycerides are positively related to future risk for cardiovascular disease (Onat et al., 2006). Considerable clinical studies demonstrated that in children and adolescents, high triglycerides levels as well as large waist circumference are predictors of the metabolic syndrome (Esmailzadeh et al., 2006; Alavian et al., 2008).

We also observed that the chronic stress decreases triglycerides levels. It has been proposed that stress leads to a lipid dysregulation, altering lipid metabolism (Chuang et al.,

2010). Chronic stressors can cause dysregulation of multiple interrelated physiological systems. Characterized by elevated or reduced of operating levels of biological parameters, this dysregulation may reflect in the functioning of the sympathetic nervous system (SNS), hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and metabolic processes (McEwen, 2002). Our study corroborates another study that showed that restraint stress decreases levels of triglycerides associated to increase lipoprotein lipase activity (Ricart-Jané et al., 2005). The cholesterol levels showed a significant effect of stress demonstrating a decrease in plasma levels. Also, we observed an interaction between chronic stress and obesity. In humans, stress has been related to increased levels of plasma cholesterol (Rosmond et al., 1998). However, in animals, this response is variable, and the main effects are found in chronic stress, with reduction (Hershock & Vogel, 1989) or increased (Berger et al., 1996) or without significant changes (Harada et al., 2003), and the results of our 12-week restraint stress protocol confirms the association between stress and cholesterol. Thus, according to Chuang et al. chronic stress can lead to dysregulation of physiological systems reflecting the HPA axis activity and metabolic processes (Chuang et al., 2010; McEwen, 2002).

In our study, the corticosterone levels were increased by exposure to chronic stress confirming that exposure to chronic stress activate HPA axis stimulating the production of corticosterone (Martenson et al., 2009). In previous studies have been demonstrated that serum corticosterone levels in rats subjected to chronic stress do not show a significant increase in comparison to control animals; however, this increase is perceived when rats are exposed to acute stress (Park et al., 2012; Torres et al., 2001a). Thereby, we can suggest that this increased levels of corticosterone observed in our results, could be due to the 12 h fasting period of animals before the death, since this situation could be considered as an additional stressor resulting in higher corticosterone levels in comparison with the responses during a chronic situation. In addition, repeated exposures to stress with moderate intensity produce attenuated responsiveness of HPA axis, causing a habituation to the stressor. However, the exposure to new stressor could increase the corticosterone levels, originating adaptive mechanisms (Weiberg *et al.*, 2009).

Regarding circadian rhythmicity of corticosterone levels, our results showed elevated hormone levels in ZT12. The same way, it is well determined that nocturnal animals achieve its zenith before the onset of the activity period. In rodents, increased levels of corticosterone at the end of the period of inactivity serve to prepare the animal for a period of activity in which the mobilization of energetic sources and stimulating feeding behavior are needed (Verhagen et al., 2004). Thus, glucocorticoids mediate the stress response, and their circadian

variations are very important to allow rapid adaptation of the organism to environmental changes in order to keep homeostasis (Mohawk et al., 2007).

In addition, as discussed above, disorganization in the circadian system can lead to metabolic dysfunction in response to genetic, environmental, and behavioral perturbations. Studies indicate that interruption or desynchronization of the circadian system may contribute to manifestations of metabolic syndrome and complications occurring in obesity such as dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus, hypertension, endothelial dysfunction and cardiovascular disease (Barnes et al., 2007; Garaulet et al., 2010). Likewise, circadian rhythms of adipose tissue also are changed in different circumstances associated with obesity and metabolic syndrome. In summary, taking into consideration that alteration in circadian patterns of metabolism have been associated with several diseases in humans and which these circadian disturbances precede and/or follow the onset of obesity and metabolic syndrome (Turek et al., 2005), we can infer that altered feeding patterns together with stressful situations may potentially induce both central and peripheral changes in circadian rhythms. Most importantly, we demonstrated that obesity and chronic stress could influence the body's homeostasis over time. Additionally, circadian variations triggered a hormonal imbalance; so these derangements are in turn associated in clinical impairments and in metabolic processes and physiology.

Consequently, it is extremely important to investigate the physiological function of the temporal fluctuations in hormone secretion, showing that chronobiological studies can contribute to different areas of knowledge in the understanding of pathologies such as obesity and metabolic syndrome.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (Dra. I.L.S. Torres, Dr. W. Caumo, V.L. Scarabelot; S. G. Cioato); the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES (C. de Oliveira; A. de Souza; C.M. de Oliveira, and L.F. Medeiros); the Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 100383).

References

1. Afman L, Müller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc.* 2006;106(4):569-76.
2. Alavian, S.M., Motlagh, M.E., Ardalán, G., Motaghian, M., Davarpanah, A.H., Kelishadi, R., 2008. Hypertriglyceridemic waist phenotype and associated lifestyle factors in a national population of youths: CASPIAN Study. *J. Trop. Pediatr.* 54,169–177.
3. Albers N 2001 Overview of pulse actions in the human. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S39-42.
4. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059–1062.
5. Ashwin PJ, Dilipbhai PJ. Leptin and the cardiovascular system: a review. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007;2(2):100–9.
6. Banks, W.A., Coon, A.B., Robinson, S.M., Moinuddin, A., Shultz, J.M., Nakaoke, R., Morley, J.E., 2004. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53, 1253–1260.
7. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:3016-34.
8. Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC (2011) Role of Sleep Timing in Caloric Intake and BMI. *Obesity* 19: 1374–1381.
9. Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, et al. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS ONE* 2009; 4:e4331.
10. Berg AL, Nilsson-Ehle P. ACTH lowers serum lipids in steroid-treated hyperlipemic patients with kidney disease. *Kidney International*50: 538-542, 1996.
11. Bhat, M.S., Rao, G., Murthy, K.D., Bhat, P.G., 2007. Housing in pyramidal counteracts neuroendocrine and oxidative stress caused by chronic restraint in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 4, 35–42.
12. Bjorntorp P (2001) Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* 2: 73–86.
13. Bradley RL, Jeon JY, Liu FF, Maratos-Flier E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E586–94.

14. Buckingham, J.C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, 147, S258-S268.
15. Buijs RM, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol* 2006; 18:715–716.
16. Calvani M, Scarfone A, Granato L, Mora EV, Nanni G, Castagneto M, Greco AV, Manco M, Mingrone G 2004. Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 53:939–947.
17. Chuang JC, Cui H, Mason BL, Mahgoub M, Bookout AL, Yu HG, Perello M, Elmquist JK, Repa JJ, Zigman JM. Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. *Journal of Lipid Research*, Volume 51, 2010.
18. Chuang, J.C, Krishnan, V., Yu, H.G., Mason, B., Cui, H., Wilkinson, M.B Zigman, J.M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., Lutter, M., 2010b. A beta3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. *Biol. Psychiatry* 67, 1075—1085.18.
19. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11696–701.
20. Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, et al. (2010) Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol* 31:377–393.
21. Davis S., Mirick D.K., Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle, *Cancer Causes Contr.* 17 (2006) 539–545.
22. de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA, Stevanato E, de Mello MA. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr* 2009;101:1178–84.
23. Dong F, Ren J. Fitness or fatness—the debate continues for the role of leptin in obesity associated heart dysfunction. *Curr Diabetes Rev* 2007;3(3):159–64.
24. Eikelis, N., Schlaich, M., Aggarwal, A., Kaye, D., & Elser, M. (2003). Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension*, 41, 1072-1079.
25. Ely, D. R., V. Dapper, et al. (1997). "Effect of restraint stress on feeding behavior of rats." *Physiol Behav* 61(3): 395-398.
26. Epel ES, McEwen B, Seeman T, Matthews K, Castellazzo G, et al. (2000) Stress and body shape: stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. *Psychosom Med* 62: 623–32.

27. Esmailzadeh, A., Mirmiran, P., Azizi, F., 2006. Clustering of metabolic abnormalities in adolescents with the hypertriglyceridemic waist phenotype. *Am. J. Clin. Nutr.* 83,36–46 quiz 183-184.
28. Estadella, D., L. M. Oyama, et al. (2004). "Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats." *Nutrition* 20(2): 218-224.
29. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999;341:879–84.
30. Flood JE, Roe LS, Rolls BJ. The effect of increased beverage portion size on energy intake at a meal. *J Am Dent Assoc* 2006; 106:1984–90, discussion 90-1.
31. Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 61–71.
32. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in over-weight/obese humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 899-905.
33. Garaulet M, Gómez-Abellán P, Madrid JA. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. *Clin Lipidology* 2010; 5 (2):181-188.
34. Garaulet M, Ortega FB, Ruiz JR, Rey-Lopez JP, Beghin L, et al. (2011) Short sleep duration is associated with increased obesity markers in European adolescents: effect of physical activity and dietary habits. The HELENA study. *Int J Obes.*
35. Gaysinskaya, V.A., Karatayev, O., Chang, G.Q., Leibowitz, S.F., 2007. Increased caloric intake after a high-fat preload: relation to circulating triglycerides and orexigenic peptides. *Physiol. Behav.* 91, 142–153.
36. Gleib, D.A., Goldman, N., Chuang, Y., Weinstein, W., 2007. Do chronic stressors lead to physiological dysregulation? Testing the theory of allostatic load. *Psychosomatic Medicine* 69, 769–776.
37. Gluck, M.E., Geliebter, A., Lorence, M., 2004. Cortisol stress response is positively correlated with central obesity in obese women with binge eating disorder (BED) before and after cognitive-behavioral treatment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032, 202–207.
38. Graeff, F.G. (2007). Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Rev Bras Psiquiatr*, 29, S3-S6.
39. Harada K, Shen WJ, Potel S, Natsu V, Wang J, Osuga J, et al. Resistance to high-fat-diet induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003; 285: E1182-E1195.

40. Hauffa BP. (2001). Clinical implications of pulsatile hormone signals. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S1-8.
41. Hershock, D., Vogel, W.H., 1989. The effects of immobilization stress on serum triglycerides, nonesterified fatty acids, and total cholesterol in male rats after dietary modifications. *Life Sci.*, 45(2):157-165.
42. Holmes E, Davies I, Lowe G, Ranganath LR (2009) Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Ann Clin Biochem* 46:514–516.
43. Ishida A, et al. (2005) Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2:297–307.49.
44. Jequier E (2002) Pathways to obesity. *Int J Obes* 26, S12 – S17.
45. Karlsson BH, Knutsson AK, Lindahl BO, Alfredsson LS. Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study. *Int Arch Occup Environ Health*, 2003; 76:424–430.
46. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, Kahn R. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2007; 30:1647–1652.
47. Kohsaka A, et al. (2007) High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6:414–421.
48. Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E., 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291—1301.
49. Kos K, Baker AR, Jernas M, Harte AL, Clapham JC, O'Hare JP, et al. DPP-IV inhibition enhances the antilipolytic action of NPY in human adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2009;11:285–92.
50. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van EdenCG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM, 2002. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat: functional implications. *J Clin Invest* 110:1243–1250.
51. Kumar S, Alagawadi KR, Rao MR. Effect of *Argyreia speciosa* root extract on cafeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J Pharmacol* 2011; 43:163–7.

52. Knudson JD, Payne GA, Borbouse L, Tune JD (2008) Leptin and mechanisms of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 10:434–439.
53. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, et al. Neuropeptide Y act directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 2007;13:803–11.
54. Leal AM, Moreira AC (1997) Food and the circadian activity of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis. *Braz J Med Biol Res* 30:1391–1405.
55. Ledikwe JH, Blanck HM, Khan LK, Serdula MK, Seymour JD, Tohill BC, et al. Dietary energy density determined by eight calculation methods in a nationally representative United States population. *J Nutr* 2005; 135:273–8.
56. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U (2001) Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 20:7128–7136.
57. Loos, R.J. and Bouchard, C. (2003): *J. Intern. Med.*, 254, 401-425.
58. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:8–13.
59. Loboda A, Kraft WK, Fine B, Joseph J, Nebozhyn M, Zhang C, He Y, Yang X, Wright C, Morris M, Chalikonda I, Ferguson M, Emilsson V, Leonardson A, Lamb J, Dai H, Schadt E, Greenberg HE, Lum PY. Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease. *BMC Med Genomics*. 2009;2:7.
60. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres ILS. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*, 2012; 38:189-196.
61. Martenson, M.E., Cetas, J.S., Heinricher, M.M., 2009. A possible neural basis for stress-induced hyperalgesia. *Pain* 142, 236–244.
62. Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipos tissue metabolism. *Curr Med Chem* 14: 2918–2924, 2007.
63. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 2002;23:921–39.
64. Mendoza J (2007) Circadian clocks: Setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19:127–137.

65. Mingrone G, Manco M, Granato L, Calvani M, Scarfone A, Mora EV, Greco AV, Vidal H, Castagneto M, Ferrannini E. Leptin pulsatility in formerly obese women. *FASEB J.* 2005;19:1380–1382.
66. Miklos IH, Kovacs KJ. Reorganization of synaptic inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus during chronic psychogenic stress in rats. *Biol Psychiatry* 2012;71:301–8.
67. Mohawk, J.A; Pargament, J.M; Lee, T.M; 2007. Circadian dependence of corticosterone release to light exposure in the rat. *Physiology & Behavior* 92, 800-806.
68. Nogueiras R, Williams LM, Dieguez C. Ghrelin: new molecular pathways modulating appetite and adiposity. *Obes Facts* 2010;3:285–92.
69. Onat, A., Sari, I., Yazici, M., Can, G., Hergenc, G., Avci, G.S., 2006. Plasma triglycerides, an independent predictor of cardiovascular disease in men: a prospective study based on a population with prevalent metabolic syndrome. *Int. J. Cardiol.* 108, 89–95.
70. Okamura H. Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007;72:551–556.
71. Ostrander, M.M., Ulrich-Lai, Y.M., Choi, D.C., Richtand, N.M., & Hermann, J.P. (2006). Hypoactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, 147, 2008-2017.
72. Parkes KR. Shift work and age as interactive predictors of body mass index among offshore workers. *Scand J Work Environ Health*, 2002; 28:64–71.
73. Park, J.H., Lee, C.H., Yan, B.C., Ahn, J.H., Lee, Y.J., Park, C.W., Cho, J.H., Choi, S.Y., Lee, Y.L., Won, M.H., Lee, H.Y., 2012. Changes in ribosomal protein S3 immunoreactivity and its protein levels in the Gerbil hippocampus following subacute and chronic restraint stress. *Neurochem. Res.* 37, 1428–1435.
74. Piernas C, Popkin BM. Snacking increased among U.S. adults between 1977 and 2006. *J Nutr* 2010; 140:325–32.
75. Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky MH. Ethical and methodological Standards for Laboratory and Medical Biological Rhythm Research. *Chronobiol. Int.* 2008; 25: 999-1016.
76. Putignano, P., Dubini, A., Toja, P., Invitti, C., Bonfanti, S., Redaelli, G., Zappulli, D., Cavagnini, F., 2001. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 165–171.
77. Rahmouni K and Haynes WG. Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *Bioessays* 23: 1095–1099, 2001.

78. Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 219–240, 2007.
79. Ricart-Jané, D., Cejudo-Martin, P., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, M.D., Llobera, M., 2005. Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *Journal of Applied Physiology* 99,1343–1351.
80. Roberge, C., Carpentier, A.C., Langlois, M.F., Baillargeon, J.P., Ardilouze, J.L., Matheux, P., & Gallo-Payet, N. (2007). Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E1465-E1478.
81. Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P. Stress-related cortisol secretion in men: relationship with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83: 1853-9.
82. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, et al: Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671.
83. Staels B. When the Clock stops ticking, metabolic syndrome explodes. *Nat Med* 2006; 12:54–55.
84. Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C: the human obesity gene map: The 2003 update. *Obes Res* 12: 369–439, 2004.
85. Solomon, M.B., Jankord, R., Flak, J.N., Herman, J.P., 2011. Chronic stress, energy balance and adiposity in female rats. *Physiol. Behav.* 102, 84—90.
86. Simmons RK, Alberti KG, Gale EA. et al., “The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO expert consultation,”*Diabetologia*, vol. 53, no. 4, pp. 600–605, 2010.
87. Smith AW, Baum A, Wing RR (2005) Stress and weight gain in parents of cancer patients. *Int J Obes* 29: 244–50.
88. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490–493.
89. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2522–5.
90. Torres, I.L.S., Vasconcellos, A.P., Silveira, S.N., Dalmaz, C., 2001a. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 241–244.
91. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon EL, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in Clock mutant mice. *Science* 2005;308:1043–1045.

92. Ur E, Wilkinson DA, Morash BA, Wilkinson M: Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 264–272.
93. Verhagen L.A.W; Pevet, P; Saboureau, M; Sicard, B; Nesme, B; Claustrat, B; Buijs, R.M; Kalsbeek, A; 2004. Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Research* 995, 197–204.
94. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216: 3–13, 2008.
95. Wauters M, Considine RV & Van Gaal LF 2000 Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European Journal of Endocrinology* 143:293–311.
96. Weiberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, et al. Repetead ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology*, 2009; 150(2):749-61.
97. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000;288:682–685.
98. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10434 –10439.
99. Zhang, Y., Scarpance, P.J., 2006. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol. Behav.* 88, 249—256.

LEGENDS

Figure 1. Evaluation of weight parameters to control of obesity

Data are expressed as the mean \pm SEM, n =24-26 animals/group. C: control group; S: stress group; HD: hypercaloric diet group; SHD: hypercaloric diet + restraint stress group;

Panel A: Weekly weight.

Significant effect of time, stress and hypercaloric diet (two-way ANOVA for repeated measures, $P < 0.05$).

There was interaction time x stress and time x hypercaloric diet (two-way ANOVA for repeated measures, $P < 0.05$).

Panel B: Delta weight.

Significant effect of chronic stress (two-way ANOVA, $P < 0.05$).

*Significant effect of hypercaloric diet (two-way ANOVA, $P < 0.05$).

Panel C: Lee index.

*Significant effect of hypercaloric diet (two-way ANOVA, $P < 0.05$).

Figure 2. Biochemical and hormonal assays

Data are expressed as the mean \pm SEM, n =24-26 animals/group. C: control group; S: stress group; HD: hypercaloric diet group; SHD: hypercaloric diet + restraint stress group;

Panel A: Cholesterol levels in blood serum. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=15-19 animals/group. (*) Significant effect of chronic stress (two-way ANOVA, $P < 0.05$). There was interaction chronic stress x obesity (two-way ANOVA, $P < 0.05$). # Effect of the time points (Bonferroni test, $P < 0.05$).

Panel B: Triglycerides levels in blood serum. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=15-19 animals/group. (#) Significant difference to ZT18 (one-way ANOVA/SNK, $P < 0.05$). Effect of the (§) obesity, (*) chronic stress and (Δ) time points (Bonferroni test, $P < 0.05$).

Panel C: Temporal pattern of corticosterone in blood serum. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=15-19 animals/group. (#) Significant difference to ZT0 and ZT18 (one-way

ANOVA/SNK, $P < 0.05$). (*) Significant effect of chronic stress (two-way ANOVA, $P < 0.05$). There was interaction time points x obesity (two-way ANOVA, $P < 0.05$).

Panel D: Temporal pattern of adiponectin in blood serum. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=15-19 animals/group. (#) Significant difference to ZT12 and ZT18 (one-way ANOVA/SNK, $P < 0.05$). (*) Significant difference to ZT12 and ZT18 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P < 0.05$). There was interaction time points x obesity (two-way ANOVA, $p < 0.05$).

Panel E: Temporal pattern of leptin in blood serum. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=15-19 animals/group. (#) Significant difference to ZT12 and ZT18 (one-way ANOVA/SNK, $P < 0.05$). (*) Significant effect of obesity (two-way ANOVA, $P < 0.05$). There was interaction between time points x chronic stress (two-way ANOVA, $P < 0.05$). § Effect of chronic stress (Bonferroni test, $P < 0.05$).

Table 1. Relative weight of mesenteric adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, and pericardial adipose tissue.

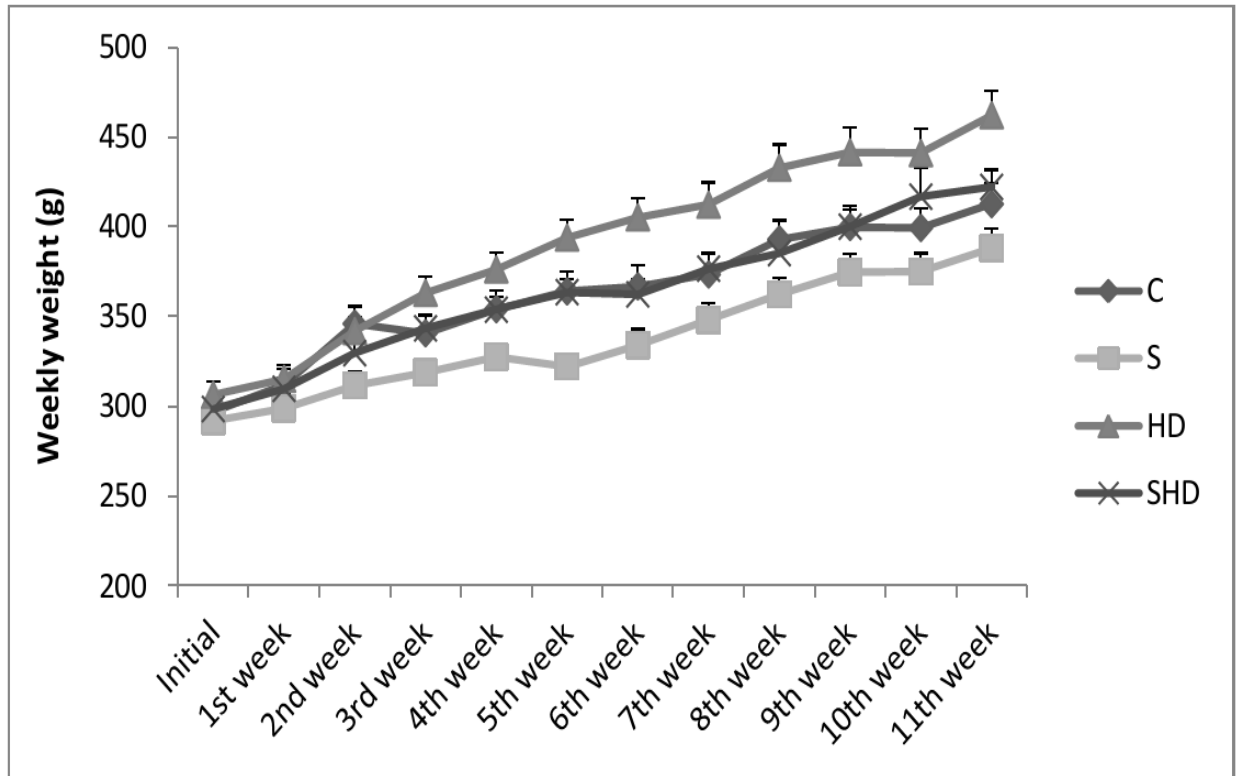
Data are expressed as the mean \pm SEM and grams of tissue/100 g total weight. C: control group (receiving standard chow alone); S: control + restraint stress; HD: hypercaloric diet; SHD: hypercaloric diet + restraint stress;

*Effect of chronic stress (two-way ANOVA, $P < 0.05$, n = 15-19).

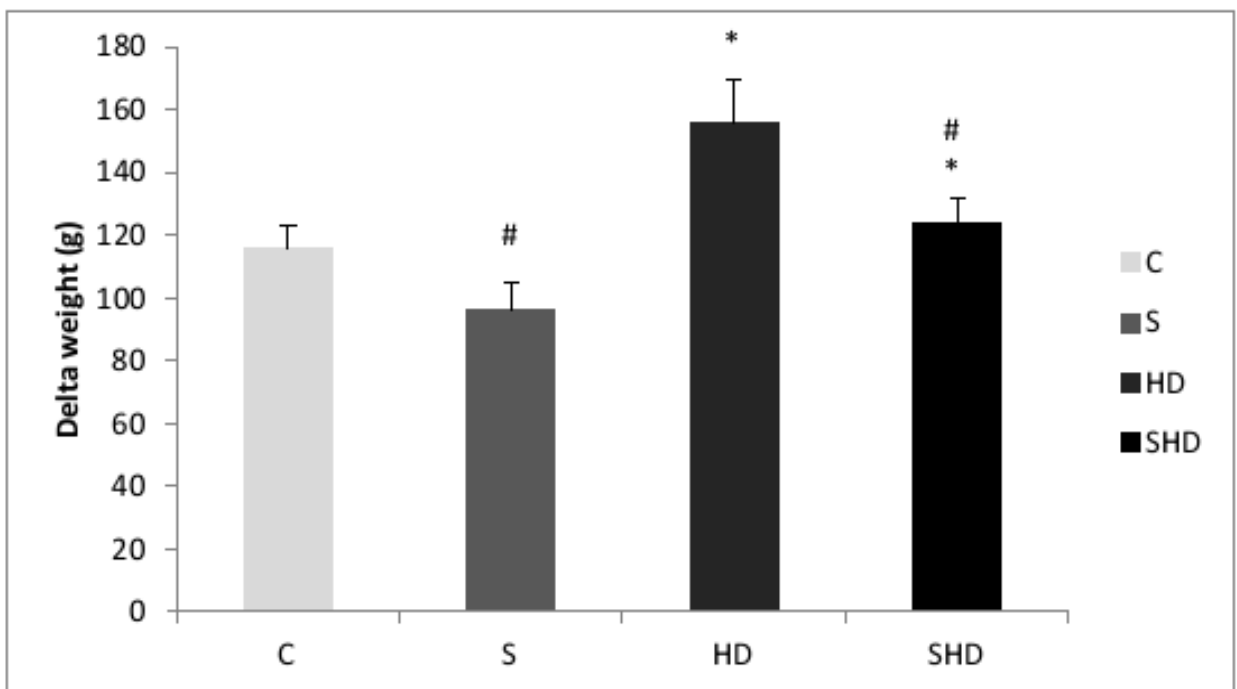
#Effect of hypercaloric diet (two-way ANOVA, $P < 0.05$, n = 15-19).

FIGURE 1

PANEL A



PANEL B



PANEL C

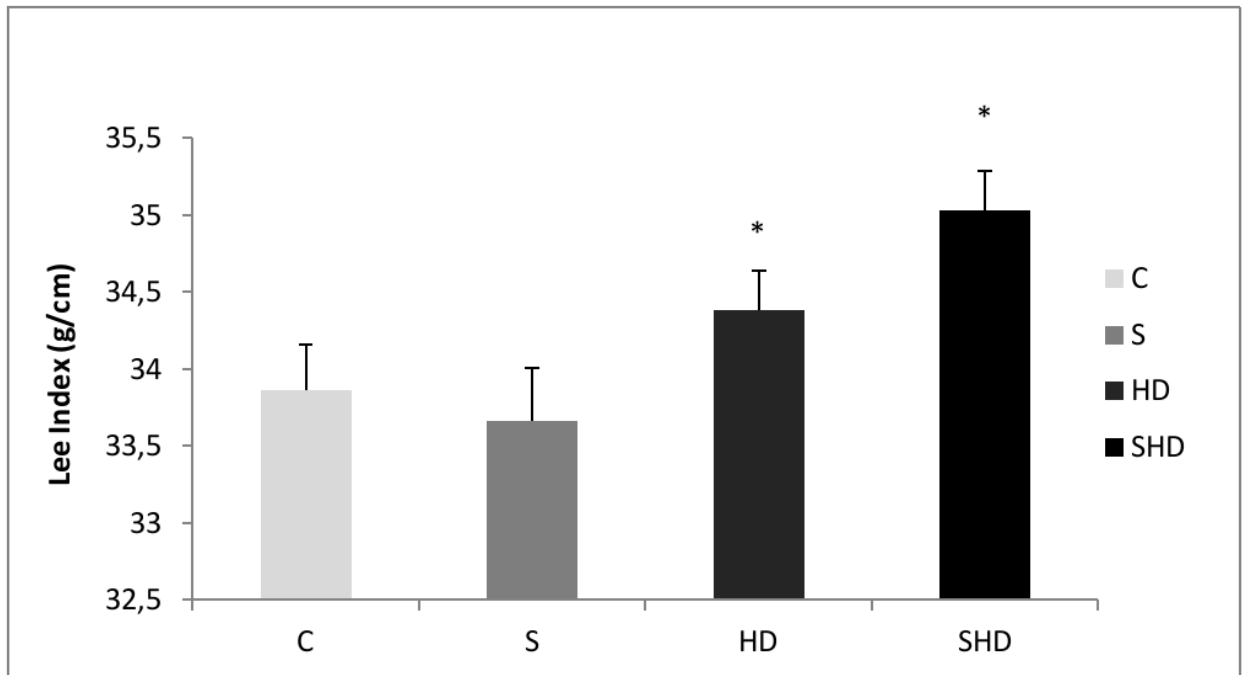
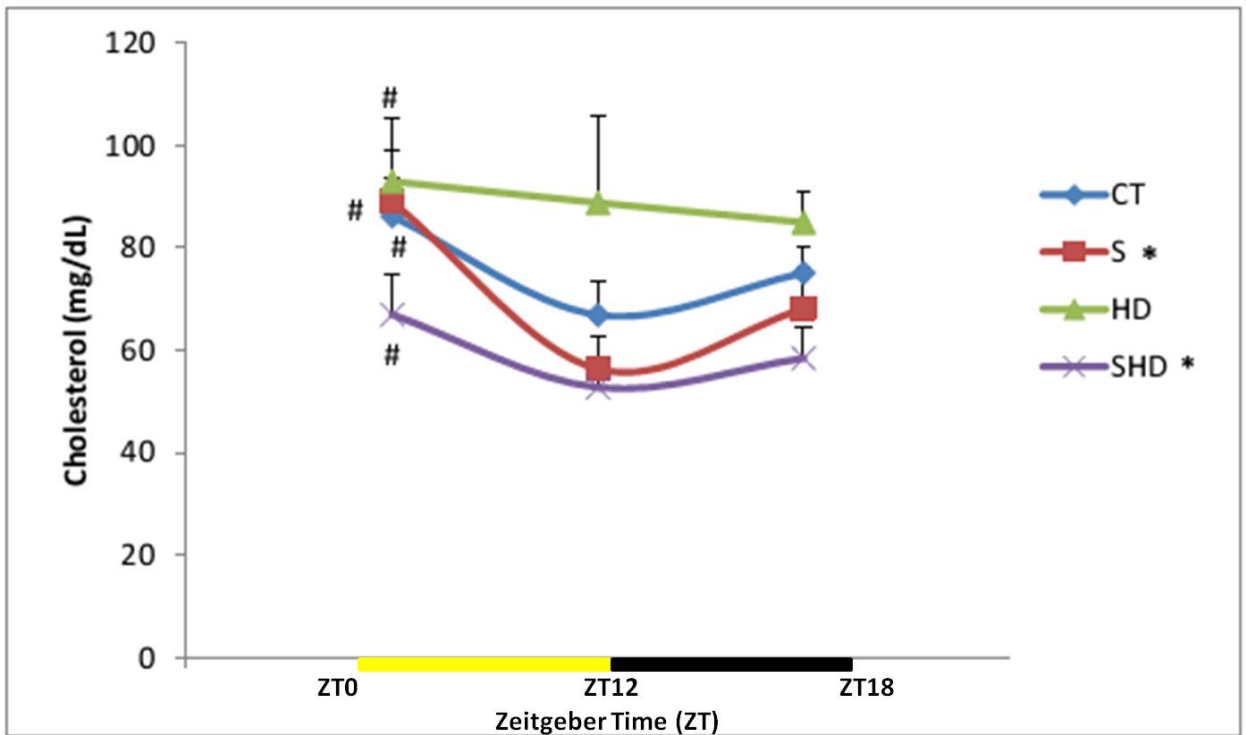
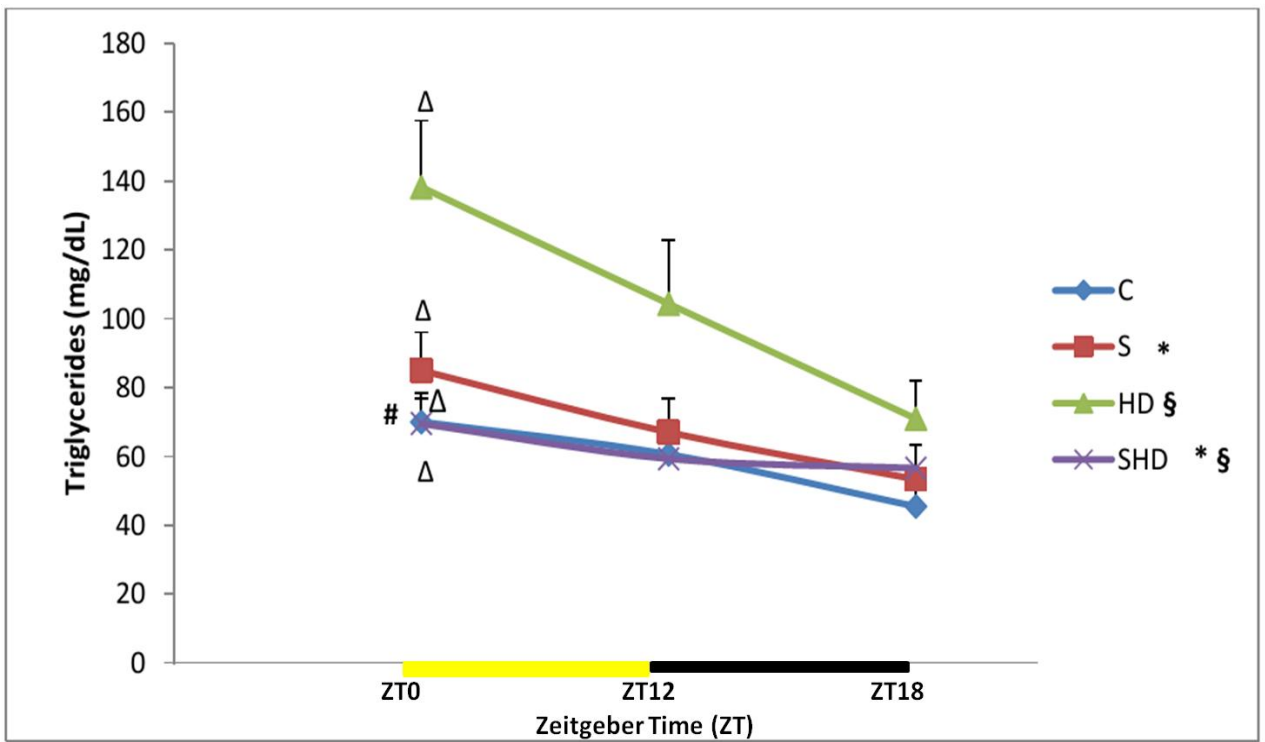


FIGURE 2

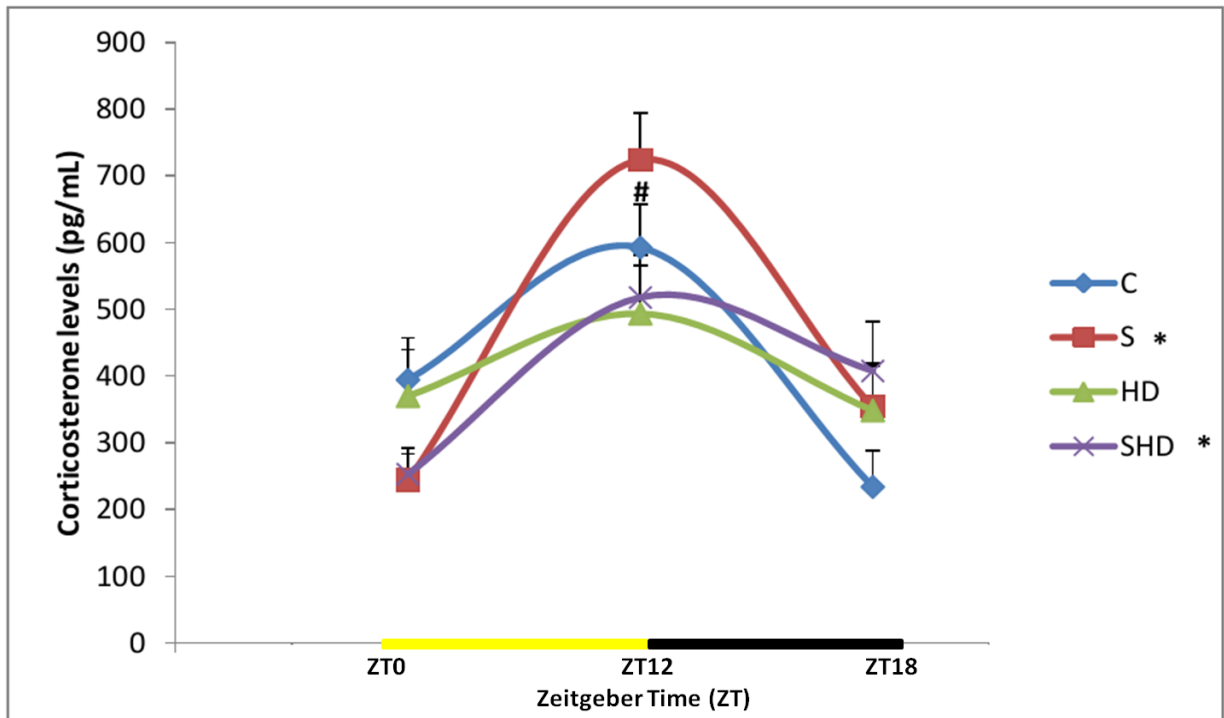
PANEL A



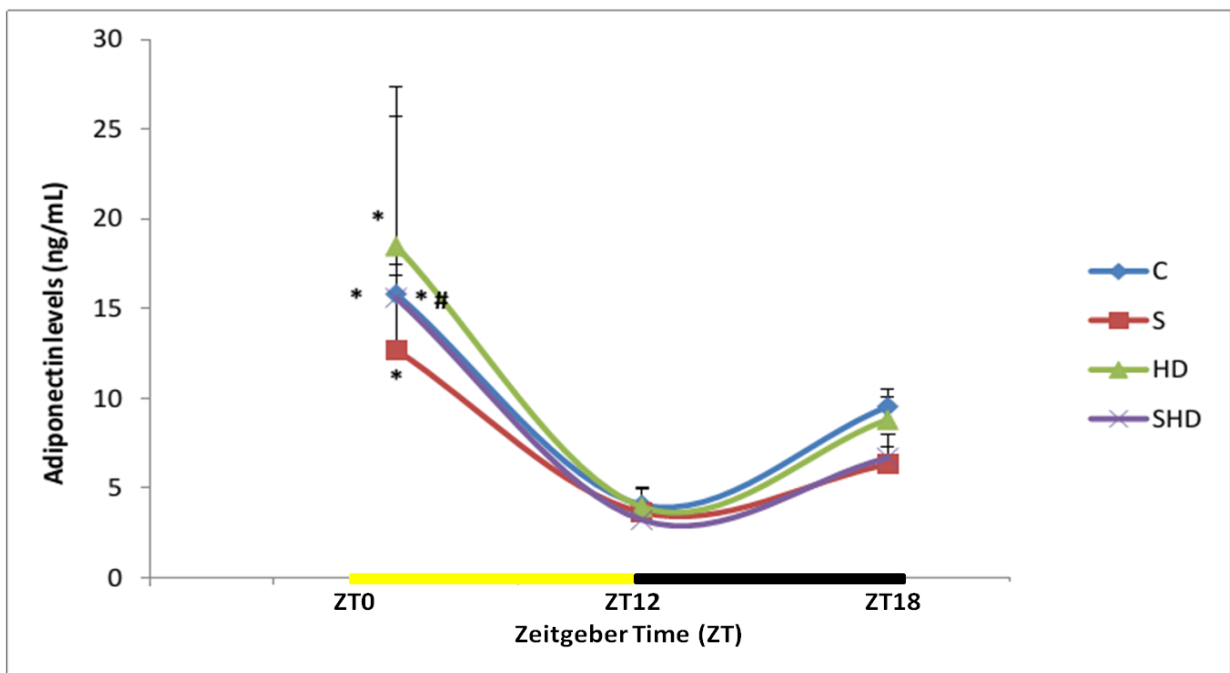
PANEL B



PANEL C



PANEL D



PANEL E

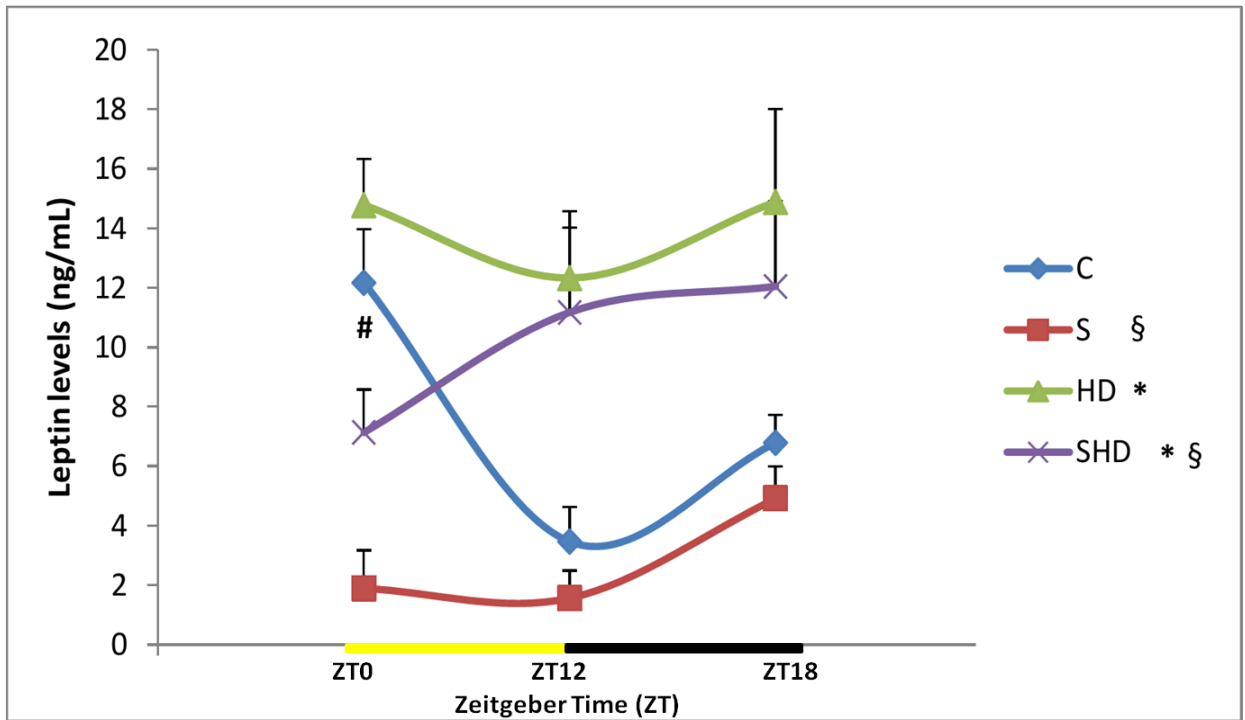


TABLE 1

	C	S	HD	SHD
Mesenteric adipose	0.01±0.0007	0.008±0.0006*	0.01±0.001 [#]	0.01±0.0009* [#]
Subcutaneous adipose	0.01±0.0008	0.008±0.0007	0.02±0.0009 [#]	0.01±0.0007 [#]
Pericardial adipose	0.001±0.00007	0.0009±0.00007	0.001±0.00008 [#]	0.001±0.00008 [#]

*Effect of chronic stress (two-way ANOVA, P < 0.05, n = 15-19).

[#]Effect of hypercaloric diet (two-way ANOVA, P < 0.05, n = 15-19).

VI. CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que uma desorganização no sistema circadiano em resposta a perturbações ambientais pode levar a disfunções metabólicas. O consumo de dietas hipercalóricas associado a situações estressantes impostas pela sociedade moderna pode contribuir para o desenvolvimento de doenças como obesidade e síndrome metabólica. As intensas modificações no estilo de vida e nos hábitos nutricionais resultam em um número crescente de indivíduos com sobrepeso ou obesidade. Da mesma forma, obesidade pode causar alterações nos ritmos circadianos, assim, uma dessincronização rítmica pode induzir obesidade e outras doenças metabólicas como dislipidemia, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares.

De acordo com os nossos resultados, podemos inferir que alterações nos padrões alimentares associada a situações estressantes podem induzir mudanças no ritmo circadiano tanto a nível central quanto periférico. Portanto, uma perfeita sincronização entre o relógio central e periférico e um correto funcionamento do tecido adiposo é essencial na regulação do apetite, adiposidade, balanço energético e peso corporal. Interessantemente, nós demonstramos que a dieta hipercalórica e o estresse crônico podem influenciar na homeostase corporal ao longo do tempo. Além disto, as variações circadianas observadas podem induzir a desequilíbrios metabólicos, estes desarranjos são, por sua vez, associados em prejuízos a saúde do indivíduo.

Portanto, esses conhecimentos básicos podem colaborar no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de desordens metabólicas. Logo, é importante ressaltar que estudos cronobiológicos são de extrema importância, podendo contribuir em diferentes áreas do conhecimento, permitindo uma maior compreensão de patologias como obesidade e síndrome metabólica.

VII. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Para melhor entendimento dos mecanismos propostos no aumento da obesidade e síndrome metabólica em relação a exposição crônica ao estresse e a dieta de cafeteria, torna-se necessário a realização da dosagem de outros marcadores como o PPAR γ (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) que controla a lipogênese pela regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e o seu envolvimento na adipogênese. Também realizar a dosagem do marcador NPY, que atua na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos. Dosagem de catecolaminas, por atuarem em receptores β -adrenérgicos e levarem a diminuição dos níveis de leptina. Além disso, fazer análise morfológica microscópica das regiões mesentérica, subcutânea e pericárdica do tecido adiposo para avaliar o risco apresentado por estes diferentes locais de adipogênese.

VIII. DIVULGAÇÕES

DIVULGAÇÕES

2012:

1 Oliveira, C.; Oliveira, C.M.; Souza, A.; Macedo, I.C.; Scarabelot, V.L.; Medeiros, L.F.; Souza, A.C.; Silva, F.R.; Marques, P.; Custodio De Souza, I.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. **Effect of obesity plus chronic stress on 24-hour pattern of circulating adiponectin and leptin in rats.** Apresentado sob a forma de **Comunicação Oral**. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, SP. Anais da Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2012.

2 Oliveira, C.; Oliveira, C.M.; Souza, A.; Macedo, I.C.; Scarabelot, V.L.; Medeiros, L.F.; Souza, A.C.; Silva, F.R.; Marques, P.; Custodio De Souza, I.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. **Effect of obesity plus chronic stress on 24-hour pattern of circulating adiponectin and leptin in rats.** Apresentado sob a forma de **Painel**. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, SP. Anais da Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2012.

3 Oliveira, C.M.; **Oliveira,C.;** Scarabelot, V.L.; Souza, A.; Macedo, I.C.; Medeiros, L.F.; Silva, F.R.; Marques, P.; Souza, I.C.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. **Avaliação do Padrão Temporal do Perfil Lipogênico e Glicemia em Ratos: Efeito da Obesidade Associada a Estresse Crônico.** Apresentado sob a forma de **painel**. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, SP.

Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2012.

4 Scarabelot, V.L.; **Oliveira, C.**; Oliveira, C.M.; Souza, A.; Medeiros, L.F.; Adachi, L.N.S.; Souza, A.C.; Cioato, S.G.; Marques, F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. **Chronic Stress and/or hypercaloric diet: effects on 24-hour temporal pattern of leptin levels.** Apresentado sob a forma de **pôster**. In: 32ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre. Anais da 32ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. HCPA, 2012. v. 32. p. 164-164.

5 Oliveira, C.M.; **Oliveira, C.**; Scarabelot, V.L.; Souza, A.; Adachi, L.N.S.; Medeiros, L.F.; Macedo, I.C.; Marques, P.; Silva, F.R.; Souza, I.C.C.; Caumo, W.; Weidlich, L.; Torres, I.L.S. **Avaliação do Padrão Temporal do Perfil Lipídico e da Glicemia de Ratos: Efeito da Obesidade Associada a Estresse Crônico.** Apresentado sob a forma de **pôster**. In: 32ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre. Anais da 32ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. HCPA, 2012. v. 32. p. 75-76.

6 Diefenthaler, F.; **Oliveira, C.**; Oliveira, C.M.; Medeiros, L.F.; Souza, A.C.; Scarabelot, V.L.; Adachi, L.N.S.; Weidlich, L.; Caumo, W.; Torres, I.L.S.; Souza, A. Ritmo Circadiano de Adiponectina e Leptina em Modelo de Obesidade Associada com Estresse Crônico. Apresentado sob a forma de Comunicação Oral. In: XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Anais do XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre : UFRGS, 2012. v. XXIV.

7 Oliveira, C.; Oliveira, C.M.; Souza, A.; Macedo, I.C.; Scarabelot, V.L.; Medeiros, L.F.; Souza, A.C.; Silva, F.R.; Marques, P.; Custodio De Souza, I.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S.

Consequences of obesity plus chronic stress on 24-hour pattern of circulating adiponectin and leptin in rats. Apresentado sob a forma de **pôster**. In: Evento de Extensão Fisiologia e o Estilo de Vida da UFRGS, 2012, Porto Alegre.

IX. ANEXOS

A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 100383 Versão do Projeto: 13/12/2010


Pesquisadores:

WOLNEI CAUMO
LICIANE FERNANDES MEDEIROS
ISABEL CRISTINA DE MACEDO
CARLA DE OLIVEIRA
CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA
IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE SOUZA
IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Título: AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL DE MARCADORES ADIPOGÊNICOS E DO
EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA ASSOCIADA A ESTRESSE CRÔNICO

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente a CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 23 de dezembro de 2010.


Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

B) ARTIGO DE REVISÃO

Submetido à Revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.

Dear Iraci Torres:

Thank you for submitting the manuscript: "ABEM-2617 - Síndrome metabólica e estresse crônico como desreguladores de ritmos circadianos de marcadores adipogênicos: uma revisão" to Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. You may track editorial process progress online by logging into the Journal's website: <http://www.abem-sbem.org.br> or by clicking below:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/abem/author/submission/110110>

Username: iraci

Please do not hesitate to contact me if you have any questions. Thank you for considering this Journal as a venue for your work.

Sincerely,

ABE&M - editores

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Editorial Staff ABE&M

abem-editorial@endocrino.org.br

www.abem-sbem.org.br

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

www.abem-sbem.org.br

Síndrome metabólica e estresse crônico como desreguladores de ritmos circadianos de marcadores adipogênicos: uma revisão

Metabolic syndrome and chronic stress like disrupter of adipogenic markers circadian rhythms: a review

Carla de Oliveira¹, Vanessa Leal Scarabelot², Stefania Giotti Cioato¹, *Iraci Lucena da Silva Torres^{1,2,3}

1 Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS

2 Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - UFRGS

3 Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS

* Autor Correspondente:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

Título abreviado: Dieta, estresse e ritmos circadianos.

RESUMO

Alterações de ritmos circadianos são relacionadas ao desenvolvimento de transtornos metabólicos como obesidade e síndrome metabólica. Além disto, a disponibilidade e o consumo de alimentos altamente palatáveis ricos em gordura e a exposição a situações estressantes podem contribuir na incidência e na severidade destas doenças crônicas, provocando modificações no balanço energético, alterações no metabolismo de lipídeos e adipogênese. Nesta revisão, abordaremos os aspectos cronobiológicos que podem ser influenciados pela exposição a estresse crônico e a obesidade, além dos mecanismos que contribuem para o crescimento de doenças metabólicas.

ABSTRACT

Alterations in circadian rhythms are involved in the development of metabolic disorders, such as obesity and metabolic syndrome. Moreover, the availability and consumption of highly palatable foods high in fat and exposure to stressful situations may contribute to the incidence and severity of these chronic diseases, causing changes in energy balance, alterations in lipid metabolism and adipogenesis. In this review we will discuss the chronobiological aspects that can influence the response to chronic stress and obesity, and the mechanisms that contribute to the growth of metabolic diseases.

INTRODUÇÃO

Ritmos biológicos apresentam frequências que podem variar de milissegundos até anos, sendo geneticamente determinados, evolutivamente conservados e endogenamente gerados para a manutenção de um meio interno equilibrado (Cardoso, 2009). Oscilações periódicas que variam de 20 a 28 horas são chamadas de ritmos circadianos. Estas oscilações recebem informações do ambiente externo, sobretudo do ciclo claro-escuro, e do ambiente interno associado com as reações fisiológicas que ocorrem no organismo (Hanifin & Brainard, 2007). A influência das oscilações periódicas em processos biológicos tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência, uma vez que os fenômenos periódicos circundam toda a nossa existência (Ichikawa, 2001).

A alimentação, o metabolismo de lipídios e de glicose, a temperatura corporal e as taxas metabólicas estão sujeitos à regulação circadiana a qual visa sincronizar a energia disponível e o gasto necessário para mudanças no meio externo de acordo com a fase claro-escuro. Adicionalmente, muitos hormônios envolvidos no metabolismo, como adiponectina, leptina, cortisol (em humanos), corticosterona (em ratos) e melatonina exibem oscilação circadiana, sugerindo um papel importante para os ritmos circadianos no controle de várias funções no organismo, incluindo adipogênese, metabolismo energético e regulação imune (Froy, 2007). Além disso, especificidades geográficas da luminosidade podem ser relevantes no processo de adaptação, fortalecendo ou enfraquecendo o impacto de componentes da rede circadiana que podem influenciar as diferentes respostas orgânicas, incluindo a resposta ao estresse (Moser et al., 2006).

A resposta ao estresse está relacionada com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), no entanto, disfunções neste eixo e perturbações do ritmo circadiano estão envolvidas na patogênese de transtornos alimentares como obesidade (Froy, 2007) e síndrome metabólica (SM) (Buijjs e Kreier, 2006). O aumento do estresse no cotidiano pode resultar em alterações fisiológicas e neuroendócrinas (Ostrander et al., 2006), que aumentam a ingestão de alimentos calóricos e conseqüentemente o aumento da adipogênese. Doenças como SM envolvem presença de obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão entre outras alterações. Obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo e está associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, como a tolerância à glicose, hiperinsulinemia, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensão (Roberge et al., 2007). Embora as causas da obesidade sejam complexas, a crescente

disponibilidade de alimentos altamente palatáveis, caloricamente densos e ricos em gordura, em conjunto com estilo de vida sedentário, exercem um papel determinante para crescente prevalência da SM e suas complicações. Em síntese, o sistema circadiano está fortemente ligado a processos que controlam o metabolismo, e o rompimento no relógio circadiano ou desajustes no metabolismo predis põem a distúrbios metabólicos como a obesidade e a SM.

Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de estudos que possibilitem uma melhor compreensão do funcionamento e da dinâmica dos ritmos biológicos na regulação de atividades fisiológicas, como a alimentação e o gasto energético, bem como o efeito da exposição a estresse crônico e da dieta nos padrões temporais. Estes estudos proporcionam substrato para novas e importantes aplicações clínicas na área da cronobiologia, tanto no desenvolvimento quanto na utilização de fármacos para o tratamento de doenças metabólicas.

METODOLOGIA

Estratégias para localizar e selecionar informações

Nesta revisão apresentam-se os principais aspectos da síndrome metabólica, estresse crônico, ritmo circadiano e a relação com marcadores adipogênicos. A estratégia de busca envolveu as bases de dados citadas abaixo e os artigos publicados entre 1990 e 2012, além disso, livros-texto e monografias foram utilizados para esclarecer questões relevantes ao assunto.

Nos sites PubMed, LILACS, SciELO e Banco de Teses da CAPES foram realizadas buscas utilizando os termos: *metabolic syndrome*, *chronic stress*, *circadian rhythm*, *adiponectin*, *leptin*, *corticosterone* e *lipid profile*. Em relação ao termo *metabolic syndrome*, foram encontrados 26.014 artigos no PubMed e 885 artigos no LILACS, já no SciELO foram encontrados 668 artigos. Utilizando-se o termo: *chronic stress* foram encontrados 4.115 artigos no PubMed, 52 artigos no LILACS e 50 no SciELO. Com o descritor *circadian rhythms* a busca no PubMed encontrou 8.146 artigos, 45 no LILACS e 57 no SciELO. Com o descritor: *adiponectin* o site PubMed identificou 10.220 artigos, no LILACS 95, e no SciELO 87 artigos. Para *Leptin*, foram encontrados 22.433 no PubMed, 314 no LILACS e 224 no SciELO. Em relação à *Corticosterone*, 27.239 artigos foram encontrados no PubMed, 90 no LILACS e 49 no SciELO. Por último, a busca simples de *Lipid Profile* revelou 159 artigos no PubMed, 70 no LILACS e 37 no SciELO.

REVISÃO DE LITERATURA

Cronobiologia

Cronobiologia é uma área do conhecimento que estuda as características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização (Halberg, 1969). Todos os seres vivos estão expostos a variações cíclicas que ocorrem no meio ambiente, como a alternância dia-noite, as variações de temperatura e as estações do ano. Para a sua adaptação, alguns mecanismos desenvolvidos ao longo da sua evolução permitem antecipar e ajustar os seus processos fisiológicos às alterações rítmicas e cíclicas, preparando adequadamente esses ritmos biológicos (Martínez-Carpio, 2004). Tais ritmos biológicos são mencionados como circadianos (do Latim “circa diem”, que significa “cerca de um dia”). Todavia, nos organismos também estão presentes ritmos com períodos inferiores a 20 horas, conhecidos como ritmos ultradianos e ritmos cujo período é superior a 28 horas e são denominados ritmos infradianos.

Para que haja uma ritmicidade circadiana é necessário que uma estrutura proceda como um marcapasso capaz de gerar oscilações de aproximadamente 24 horas e também relógios periféricos atuando e desempenhando papéis importantes. No hipotálamo, dois pequenos aglomerados de neurônios constituem os marcapassos geradores da ritmicidade circadiana em mamíferos, representados pelos relógios biológicos circadianos que são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Markus *et al.*, 2003) (Figura 2).

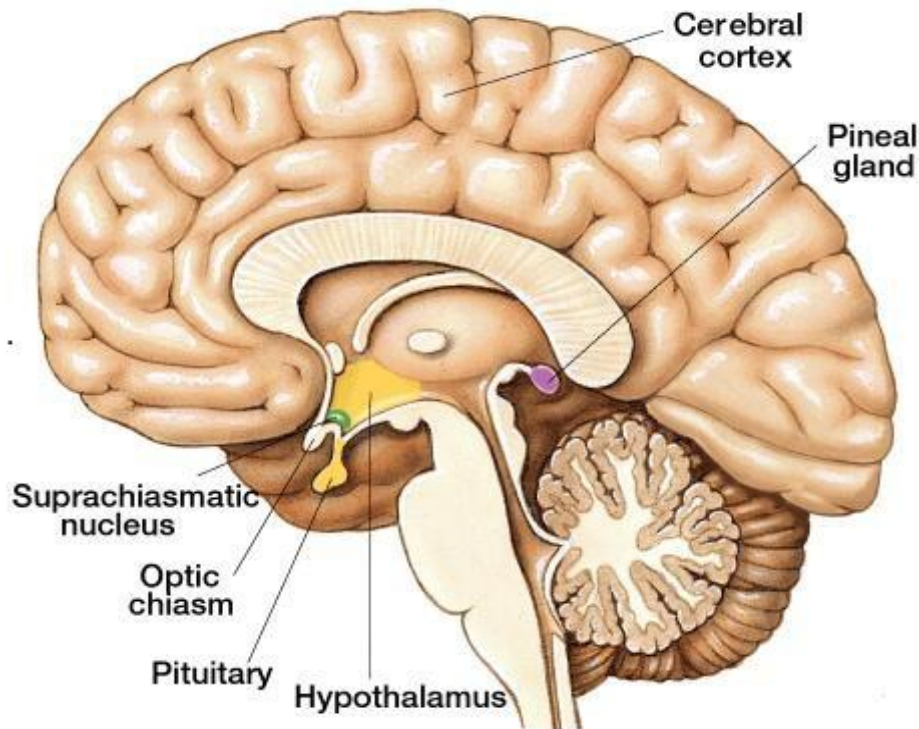


Figura 1. Posicionamento dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) no sistema nervoso humano e conexões entre a retina e a glândula pineal. Fonte: <http://healthysleep.med.harvard.edu/image/200>.

O NSQ recebe informação fóptica diretamente através do trato retino-hipotalâmico, sincronizando-o para as 24 horas; este, por sua vez, coordena a ação dos osciladores presentes em outras áreas cerebrais e nos órgãos periféricos, como fígado, rim, pulmão, coração, entre outros, denominados como osciladores periféricos. Estes osciladores sincronizados regulam os ritmos locais na fisiologia constituindo-se como entidades multi-oscilatórias. As respostas a estas oscilações ocorrem por vias eferentes neurais e humorais (Richter *et al.*, 2004). A eferência neural para os órgãos periféricos abrange o sistema nervoso autonômico, principalmente via sistema nervoso simpático, por meio da conexão dos NSQ à coluna intermediolateral da medula. A melatonina é responsável pela eferência humoral. A pineal é parte integrante do sistema de temporização endógeno, constituindo o principal meio de comunicação entre o meio externo (ciclo claro-escuro) e os sistemas internos (nervoso central e endócrino). A síntese e secreção da melatonina ocorrem durante o período noturno, sendo suprimida pela luz (Bartness *et al.*, 2001).

O ajuste entre o relógio biológico e o meio ambiente é realizado via neural (Markus *et al.*, 2003), ocorrendo diariamente e é fundamental para sincronizar o sistema circadiano ao período de aproximadamente 24 horas. Os eventos externos que são capazes de promover o

ajustamento das variáveis circadianas foram designados por Aschoff como *zeitgeber* (palavra alemã que significa “doador do tempo”). Um potente “Zeitgeber” ou ZT é a alternância claro-escuro. Outros zeitgebers compreendem temperatura, interação social e comportamento alimentar (Moser *et al.*, 2006). Os ritmos de 24 horas da fisiologia e do comportamento são influenciados por vários fatores ambientais como horários de alimentação, fatores genéticos e interações sociais, como as condições de luz. Nos seres vivos, há necessidade de sensores que percebam a variação temporal (Ohdo, 2007).

Assim, o sistema de temporização dos vertebrados abrange três elementos fundamentais como componentes capazes de perceber pistas/dicas ambientais (aferências), uma estrutura marcapasso de ritmos (relógio biológico, o NSQ) e vias de comunicação neural e hormonal (eferências) das informações para órgãos periféricos e tecidos (Boden e Kennaway, 2006) (Figura 3).

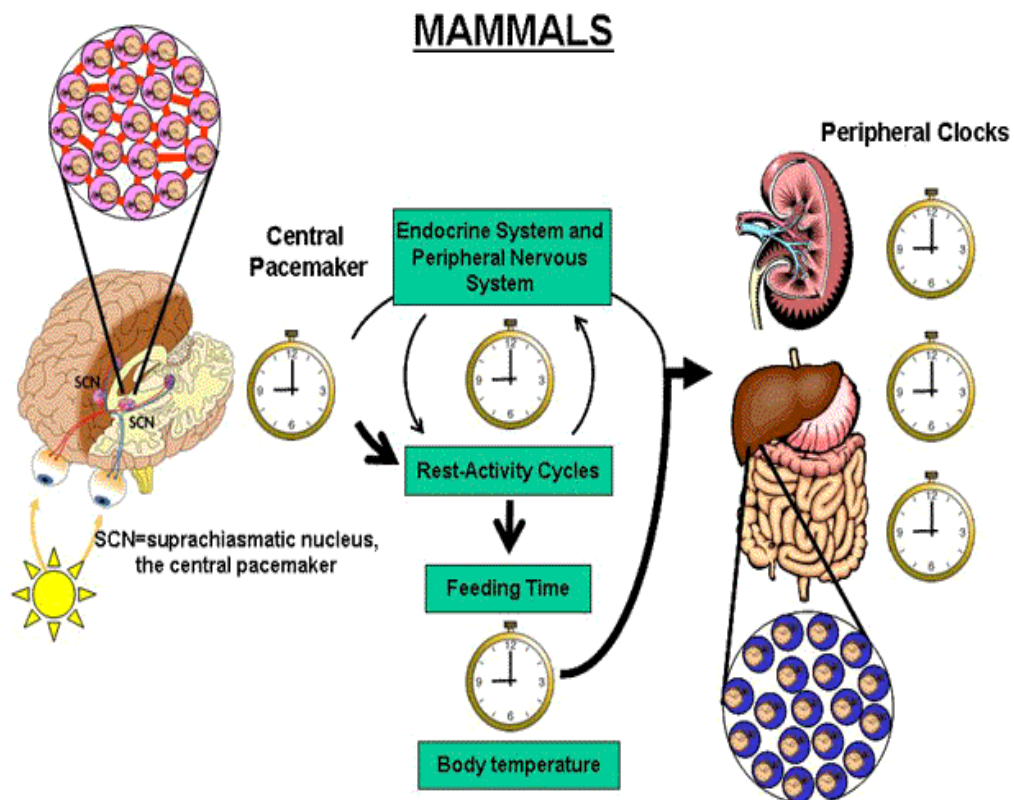


Figura 2: Principais mecanismos envolvidos no sistema de temporização circadiana em mamíferos (Ishida *et al.*, 2005). O ciclo atividade/repouso, tempo de alimentação e o ritmo da temperatura corporal, são influenciados diretamente pelos núcleos supraquiasmáticos.

Tem sido sugerido que a função do sistema rítmico circadiano é proporcionar uma organização temporal de processos fisiológicos e comportamentais de modo que gere uma

efetiva adaptação do organismo às variações ambientais. Por exemplo, o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HHA) que é ativado para preparar o organismo antes do amanhecer para o despertar (Hastings *et al.*, 2003).

A produção e liberação dos hormônios são distribuídas em um ciclo de 24h, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida ou exposição a determinados fatores, como a luz durante a noite, atividades físicas ou alimentos em diferentes horários, causando transtornos no ritmo circadiano. Trabalhadores noturnos, por exemplo, estão expostos a ciclos claro/escuros não habituais, resultando em transtornos circadianos no ciclo atividade/repouso, no comportamento alimentar e no ritmo social. Estes transtornos circadianos prejudicam o desempenho do indivíduo e podem levar a alterações em diversos sistemas, incluindo o metabolismo de lipídeos e de carboidratos e a secreção de glicocorticóides (Haus e Smolensky, 2006).

A exposição noturna à luz é um fator dessincronizador do sistema circadiano. Existem algumas situações em que ocorre a dessincronização da ritmicidade alimentar, tendo em vista que a quantidade, a qualidade e o horário das refeições parecem ser motivados por reflexos condicionados (Bernardi *et al.*, 2009). Assim, ritmos circadianos e diurnos afetam a ingestão alimentar. Alteração nos níveis de adipocinas é considerada um importante mecanismo capaz de alterar o padrão de ingestão alimentar e levar a desajustes nutricionais. A ritmicidade e o sincronismo na secreção destas adipocinas são importantes para o padrão diário das refeições (Crispim *et al.*, 2007). A instabilidade na ritmicidade circadiana, com repetida dessincronização/ressincronização, pode enfraquecer os mecanismos homeostáticos. Um exemplo deste fenômeno é a exposição a situações de estresse, cada vez mais comum na organização da sociedade atual. Desta forma, o ritmo circadiano tem se mostrado importante na prática dos cuidados relacionados ao processo de saúde e doença.

Estresse Crônico

Em 1936, Hans Selye definiu o estresse como uma resposta estereotipada, não específica, do corpo a mudanças no ambiente externo ou interno. As respostas aos eventos estressantes foram chamadas de síndrome de adaptação geral (Selye, 1974), compreendendo uma grande variedade de alterações fisiológicas, comportamentais, emocionais e cognitivas. Além disso, para promover o enfrentamento e reduzir o impacto do estressor, estas respostas são geralmente organizadas e bem reguladas (Goshen *et al.*, 2003). Portanto, a ativação de

sistemas envolvidos com estresse leva a mudanças comportamentais e periféricas que buscam manter a homeostase, aumentando a chance de sobrevivência.

Os eixos HHA e simpático-adrenal (SA) são ativados mediante uma ampla variedade de estressores. Um regulador da resposta ao estresse é o eixo HHA, o estresse provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) que libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH induz a secreção de glicocorticóides (GCs), cortisol para humanos e corticosterona para ratos, pelo córtex da adrenal (Einarsson *et al.*, 2008). Os GCs inibem a liberação e a síntese de ACTH por atuarem no hipocampo, hipotálamo e hipófise, exercendo retroalimentação negativa sobre a liberação de ACTH (Nestler *et al.*, 2002) (Figura 4). O eixo HHA é responsável pela resposta à exposição ao estresse crônico, desencadeando alterações na reatividade neuroendócrina aos estressores subsequentes (Ostrander *et al.*, 2006).

Cortisol (humanos) ou corticosterona (roedores) é um hormônio GCs produzido pelo córtex da glândula adrenal que apresenta um forte ritmo circadiano (Mohawk *et al.*, 2007). O relógio biológico central (NSQ) é um dos responsáveis por originar esta ritmicidade circadiana, pois por meio de uma via multisináptica envolvendo os núcleos supraquiasmáticos e as glândulas adrenais as secreções provenientes do eixo HHA exibem um padrão circadiano. Em humanos, a secreção noturna de ACTH e de cortisol se faz de modo pulsátil, alcançando seu nível mais baixo na primeira metade da noite e aumentando rapidamente ao aproximar-se o horário do despertar (entre 6h e 10h da manhã), quando sua secreção é máxima. Em roedores, que são animais noturnos, a secreção de corticosterona ocorre no turno inverso, com picos plasmáticos no início da noite (Perreau-Lenz *et al.*, 2003).

O eixo HHA e o sistema circadiano interagem em vários níveis com seus hormônios, seguindo um padrão circadiano de liberação, sendo a magnitude da resposta ao estresse dependente da hora do dia (Verhagen *et al.*, 2004). Do mesmo modo, os GCs atuam na manutenção do arrastamento circadiano nos tecidos periféricos, além de uma variedade de funções, incluindo a regulação do metabolismo de glicose, de gordura e de proteína, de ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, bem como efeitos no humor e em funções cognitivas. Os GCs têm intensa influência sobre o comportamento alimentar (la Fleur *et al.*, 2004). Adicionalmente, dieta e período da alimentação têm um impacto no ritmo de sua secreção, assim, desajustes na sinalização de GCs têm sido implicados na patogênese de doenças, tais como diabetes e SM (Masuzaki *et al.*, 2001).

Os níveis máximos e mínimos de cortisol podem ser utilizados para monitorar alterações no sistema temporizador circadiano e conseqüentemente, variações circadianas de

GCs, como o cortisol e a corticosterona, são importantes para permitir uma rápida adaptação do organismo às mudanças ambientais a fim de conservar a homeostase, tornando-se ferramentas importantes para estudos clínicos, pois permitem o monitoramento da organização rítmica circadiana dos organismos (Mohawk *et al.*, 2007). Exposições sucessivas ao estresse com intensidade moderada produzem atenuada responsividade do HHA gerando uma habituação para o estressor, no entanto em presença de um novo estressor sua resposta pode estar aumentada, originando uma sensibilização, sendo ambos considerados mecanismos adaptativos (Weiberg *et al.*, 2009). Estresse agudo, em geral, não traz consequências adversas, sendo um processo adaptativo benéfico em certos casos. No entanto, quando repetido ou prolongado, o estresse adquire caráter crônico, podendo ser extremamente prejudicial estar envolvido na gênese, de muitas manifestações clínicas, como sintomas de ansiedade, alterações na memória e aprendizado, bem como respostas emocionais alteradas (Perreault-Lenz *et al.*, 2003). A ativação crônica do eixo HHA tem sido associada a distúrbios metabólicos e alterações na homeostase energética. O estresse também está entre os mais importantes reguladores exógenos dos ritmos circadianos. O eixo HHA é um sistema hormonal chave que está bem caracterizado no padrão circadiano sob a influência do estresse, este padrão é alterado e a homeostase relacionada à função neuroendócrina é interrompida, com um impacto negativo na saúde (Albers, 2001; Hauffa, 2001).

Estudos prévios suportam uma ligação entre o estresse e o aumento do consumo de alimentos palatáveis. O aumento do estresse na vida diária tem sido associado com uma maior motivação por tais alimentos (Zellner *et al.*, 2006, Epel *et al.*, 2001). Há relatos de pessoas em situações de estresse que alteraram sua seleção de alimentos, ingerindo mais chocolate, doces, bolos e salgadinhos (alimentos conhecidos por “comfort foods”) (Zellner *et al.*, 2006). Estudos sugerem também que o estresse crônico está associado ao consumo de uma dieta rica em gordura (Dallman *et al.*, 2005). Adicionalmente, com o aumento da prevalência da obesidade, recentes estudos têm demonstrado uma correlação entre o estresse e síndrome metabólica (Mikurube *et al.*, 2005) e sabendo-se que o estresse tem efeitos profundos sobre o apetite, tanto em ratos quanto em humanos, perturbações na regulação do eixo HHA têm sido implicadas também em alterações metabólicas (Ramsey *et al.*, 2007). Além disso, concentrações elevadas de glicocorticóides podem promover a liberação de CRH no núcleo central da amígdala, que é reduzido pelo consumo de alimentos palatáveis, constituindo desta maneira um ciclo de feedback negativo pelo qual o estresse leva à seleção e ingestão de alimentos palatáveis ricos em energia que, por sua vez, reduz o estresse (Dallman *et al.*, 2005).

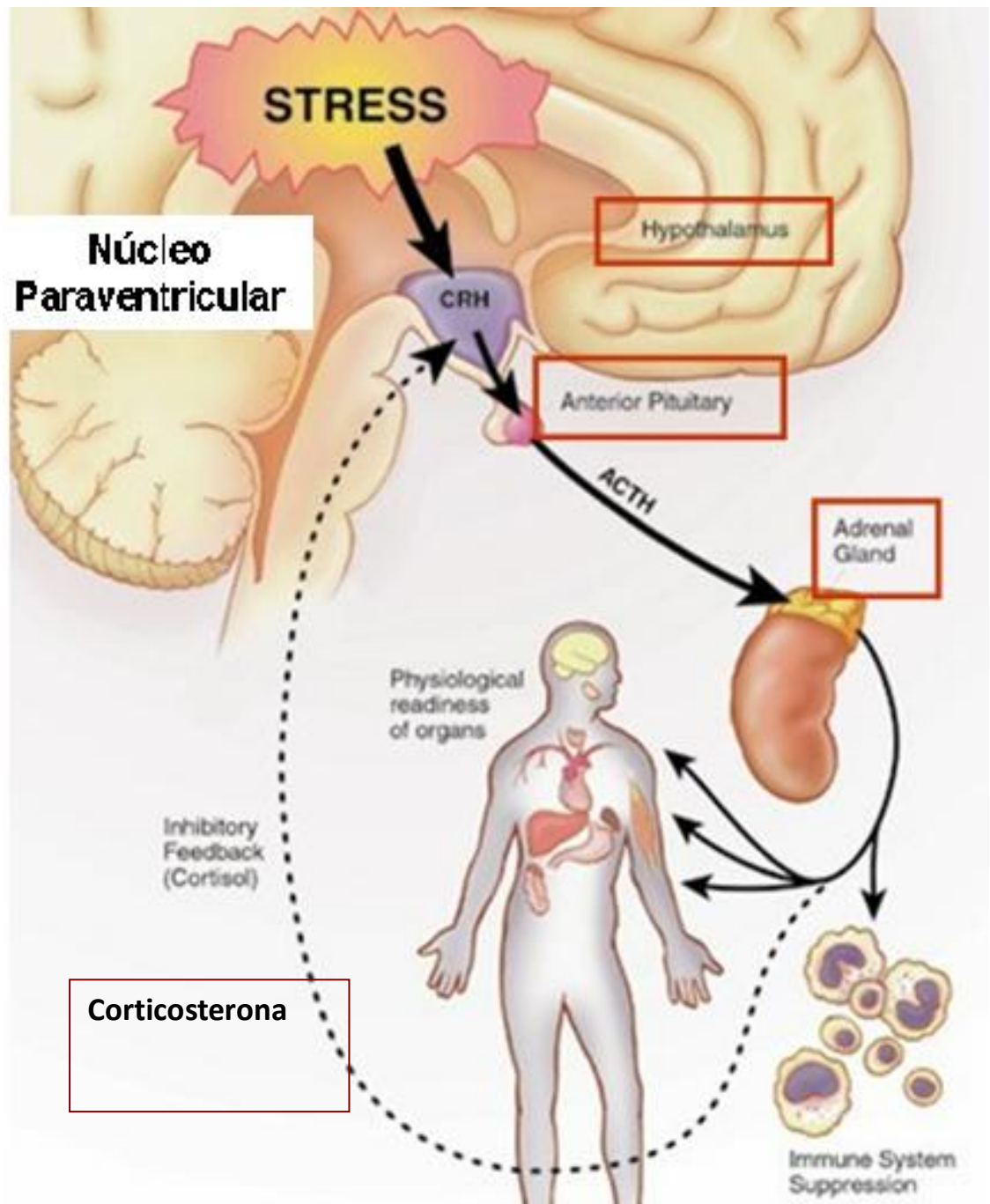


Figura 3: Representação esquemática da ativação de eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) pelo estresse. PVN= núcleo paraventricular hipotalâmico (Adaptado de: www.uff.br/fisiovet/Conteúdos/hipotálamo.htm).

Obesidade e Síndrome Metabólica

Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica. Entre os fatores ambientais, inclui-se a dieta, a qual pode contribuir na incidência e na gravidade dessas doenças crônicas (Afman e Müller, 2006). O excesso de ingestão alimentar e a inatividade física tornaram-se a base da crescente epidemia mundial de obesidade e síndrome metabólica, não só nas nações industrializadas, mas também nos países em desenvolvimento. A obesidade e a alimentação rica em gordura também afetam o sistema circadiano em ratos, e dietas hipercalóricas têm sido utilizadas com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade e síndrome metabólica (Estadella *et al.*, 2004). Além disso, há um acúmulo de gordura visceral que provoca uma série de alterações metabólicas, como a produção de adipocinas (adiponectina, leptina, etc). As adipocinas desempenham um papel importante na homeostase energética, sensibilidade à insulina, resposta imunológica e doenças vasculares (Fantuzzi, 2005).

A incidência de síndrome metabólica (SM) representa um espectro de desordens que têm aumentado de forma crescente em todo o mundo industrializado. A SM envolve a presença de alterações metabólicas, incluindo obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão. Esta síndrome tornou-se um desafio na saúde pública em todo mundo; uma estimativa de 25% a 40% de indivíduos entre 25 e 64 anos de idade tem síndrome metabólica (San Antonio Heart Study) (Alberti *et al.*, 2005; Zimmet *et al.*, 2005). SM é também definida pela presença de componentes como elevados níveis circulantes de triglicérides, redução dos níveis de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL), pressão arterial elevada, comprometimento na glicemia de jejum, elevada circulação de marcadores inflamatórios e/ou trombóticos ou redução dos níveis de moléculas anti-inflamatórias, tais como adiponectina que são marcadores de SM (Alberti *et al.*, 2005; Zimmet *et al.*, 2005).

O diagnóstico de SM é estabelecido pela presença de três dentre quaisquer dos cinco componentes entre os descritos pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III* (NCEP, 2001), segundo recomendação da I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica [I-DBSM, 2005; SBC, 2005, (Quadro 1)]. A *Internacional Diabetes Federation* desenvolveu novos critérios para o diagnóstico da SM (IDF, 2005), considerando a obesidade abdominal associada a dois ou mais componentes da SM (SBC, 2005) (vide Quadro 1).

Quadro 1 - Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III

Componentes	Níveis
Obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicérides	≥ 150 mg/dL
HDL Colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL

A presença de *Diabetes mellitus* não exclui o diagnóstico de SM

Fonte: SBC-Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2005.

Evidências sugerem que alterações no sistema circadiano e no sono podem participar na patogênese da doença. Estudos clínicos epidemiológicos sustentam a hipótese de que uma das principais alterações no mundo industrializado que contribui para patogênese da SM envolve a introdução de luz artificial no trabalho noturno. O trabalho noturno é uma condição clínica comum indicativa de interações entre ritmos circadianos e metabolismo em seres humanos, sendo que vários estudos indicam que a maioria dos trabalhadores do turno da noite relata dificuldades em tolerar essa condição. Recentemente, em um estudo no qual os participantes foram submetidos a um desalinhamento circadiano (simulação do trabalho noturno), os pesquisadores observaram uma redução nos níveis plasmáticos de leptina, resistência à insulina, ritmo de cortisol invertido e aumento da pressão arterial (Scheer *et al.*, 2009). Assim, a relação entre a interrupção circadiana e patologias metabólicas parece ser bidirecional em humanos, sugerindo que a perturbação circadiana pode levar a um ciclo vicioso e contribuir para o aumento e progressão da doença metabólica.

Marcadores Adipogênicos

Estudos mostram que rupturas nos padrões de sono, muitas vezes ligadas ao estilo de vida, estão associadas com aumento da gordura corporal e alterações no metabolismo. Trabalho noturno, por exemplo, é caracterizado por mudanças nos ritmos biológicos. Trabalhadores noturnos aumentam o risco de hipertensão (Kitamura *et al.*, 2002), além disso, desencadeiam outros efeitos metabólicos como, obesidade abdominal, dislipidemia (diminuição do HDL colesterol e aumento dos triglicérides) e alterações na tolerância à glicose (Di Lorenzo *et al.*, 2003), todos sugestivos de que o trabalho noturno pode contribuir para o desenvolvimento da SM. Similarmente, está bem estabelecido que haja uma

significante relação entre o desenvolvimento da obesidade e parâmetros circulantes de lipídios. Estudos em ratos com peso normal sugerem o envolvimento de lipídios circulantes, particularmente triglicerídeos (TG), que são marcadamente elevados pela utilização de uma dieta hipercalórica comparado com dieta padrão e estimulam peptídeos hipotalâmicos conhecidos por aumentar a alimentação (Chang *et al.*, 2007; Gaysinkaya *et al.*, 2007). Outras evidências sugerem que níveis elevados de triglicerídeos podem ter impacto sobre mecanismos cerebrais que controlam a alimentação e podem desta forma, contribuir com o desenvolvimento de hiperfagia, promovendo superalimentação e levando ao aumento do peso corporal, desenvolvendo alterações metabólicas que podem desencadear obesidade e síndrome metabólica (Chang *et al.*, 2007; Gaysinkaya *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o tecido adiposo branco tem sido reconhecido por desempenhar um papel central em vários estados patológicos, incluindo síndrome metabólica e obesidade. Além das suas funções primárias como um reservatório para o excesso de energia, o tecido adiposo também serve como um órgão endócrino, produzindo adipocinas, regulando importantes processos biológicos como metabolismo energético e respostas imune/inflamatórias (Wang *et al.*, 2008). Este tecido é submetido à atuação de outros hormônios que promovem efeitos diversos, não só sobre o seu metabolismo, mas também na função endócrina e na regulação da adipogênese. A produção e liberação destes hormônios são distribuídas em um ciclo de 24 horas, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida ou exposição a determinados fatores, como a luz durante a noite, atividades físicas ou alimentos em diferentes horários.

A adiponectina é a mais abundante proteína secretada pelo tecido adiposo (Ahima, 2006), é de produção específica pelos adipócitos, com função antiaterogênica e reguladora da homeostase dos lipídeos e da glicose. Adiponectina também potencializa a ação da insulina no fígado e reduz a produção de glicose hepática, além de induzir a oxidação de gorduras diminuindo os triacilgliceróis em nível hepático e muscular (Havel, 2004). Os níveis de adiponectina são inversamente relacionados com a massa de gordura, diminuindo à medida que o tecido adiposo aumenta. Tem sido demonstrado que essa proteína encontra-se reduzida no soro de indivíduos e roedores obesos ou resistentes à insulina. A queda da adiponectina plasmática (hipoadiponectinemia) é causada por interações de fatores genéticos e ambientais (Ohashi *et al.*, 2004). Em indivíduos que apresentam baixos níveis circulantes de adiponectina foram observadas várias disfunções associadas como diabetes, aterosclerose, hipertensão, dislipidemias, sugerindo a existência de associação entre hipoadiponectinemia e

estabelecimento de SM. Do mesmo modo, recentes estudos mostram uma relação entre administração da adiponectina e redução do peso corporal (Qi *et al.*, 2004).

Há muitas evidências ligando regimes alimentares e componentes alimentares com alterações no sistema circadiano (Froy, 2007). Dietas hipercalóricas podem influenciar nas respostas do relógio biológico e as oscilações circadianas da adiponectina, que está envolvida no metabolismo, tornam-se interrompidas no desenvolvimento da obesidade e SM (Froy, 2007). Além da sua função como sensibilizadora da insulina, a adiponectina está implicada na patogênese da maioria das principais patologias relacionadas à obesidade, incluindo hipertensão, aterosclerose, esteatose hepática, falência cardíaca, inflamação das vias aéreas e câncer de mama. Os níveis de adiponectina são controlados por vários mecanismos, como a secreção de adiponectina pelos adipócitos e a regulação por outras adipocinas inflamatórias (Zhu *et al.*, 2008).

A leptina é outro hormônio produzido pelo tecido adiposo, tanto em roedores quanto em humanos (Eguchi *et al.*, 2008), atuando como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e o SNC, agindo fundamentalmente no hipotálamo. Promove a redução na ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, regulando a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (Romero *et al.*, 2006). Além disso, inibe expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e *Agouti related peptide* (AgRP), envolvidos nos mecanismos de aumento da ingestão alimentar e de ação redutora no gasto energético. Recentemente foi relatado que a inibição da expressão do receptor de leptina em adipócitos poderia produzir muitos dos sintomas que acompanham a deficiência total de leptina (Huan *et al.*, 2003).

O papel da leptina na regulação do peso corporal é evidenciado em modelos animais com deficiência de leptina, observando-se que a falta de leptina provoca obesidade, tanto em humanos como em roedores (Ioffe e Moon, 1998). Na maioria dos casos de obesidade, a leptina é secretada na proporção da massa de gordura, tal que os níveis circulantes de leptina correlacionam-se com a adiposidade corporal. Por conseguinte, sujeitos obesos têm elevados níveis de leptina associados com redução na sensibilidade deste hormônio (Maffei *et al.*, 1995). Estudos sugerem que alterações na ação da leptina na região hipotalâmica poderiam estar relacionadas com a suscetibilidade no desenvolvimento da obesidade (Levin *et al.*, 2004; Tulipano *et al.*, 2004).

A liberação de leptina é controlada por diversas substâncias, como insulina, GCs e citocinas pró-inflamatórias. Assim, um aumento nos níveis desta adipocina reduz a ingestão alimentar, enquanto níveis mais baixos induzem à alimentação (Stunkard *et al.*, 2003). Os níveis de concentração da leptina encontram-se aumentados durante a noite em indivíduos

com hábitos diurnos e peso saudável, além disso, dietas hipercalóricas provocam um aumento das concentrações séricas de leptina e do peso corporal (20%) quando comparada com a dieta padrão, como ilustrado em roedores (Moraes *et al.*, 2003, Macedo *et al.*, 2012), sugerindo que a leptina está envolvida no controle de feedback de ingestão de gordura.

Estudos em ratos mostraram que a leptina apresenta oscilações circadianas em concentrações plasmáticas, com picos plasmáticos tardios que ocorrem no período escuro (período ativo) e o seu nadir (menor nível, no fim do período de luz). Uma vez que o período escuro representa também o período alimentar ativo em roedores, os resultados sugerem que o ritmo circadiano expresso na leptina pode ser um comportamento antecipatório, com níveis mais baixos do hormônio no início do período alimentar para facilitar a alimentação máxima durante este período e os níveis aumentando gradualmente até a concentração máxima no final do período de alimentação para facilitar a supressão da ingestão de alimentos durante o período inativo (Sánchez *et al.*, 2004).

Por fim, o estudo destas relações entre obesidade e SM, exposição a estresse crônico e ritmos biológicos podem colaborar no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de transtornos metabólicos. Logo, é importante ressaltar que a cronobiologia tem colaborado para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na manifestação dos ritmos biológicos e suas interações com os ritmos ambientais, nas respostas fisiológicas e comportamentais. Por conseguinte, estudos cronobiológicos podem contribuir com diferentes áreas do conhecimento na compreensão de patologias e terapêuticas.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelas seguintes agências de fomento Brasileiras: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Dra. I.L.S. Torres, V.L. Scarabelot) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (C. de Oliveira) e o Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

Declaração: os autores declaram não haver conflito de interesse científico na realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Afman L, Müller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc.* 2006;106(4):569-76.
2. Ahima RS. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(Suppl 1):9S–15S.
3. Albers N 2001 Overview of pulse actions in the human. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S39-42.
4. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059 –1062.
5. Bartness, T. J., Somg, C. K., Demas, G. E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms* 16, 196-204.
6. Bernardi, F., Harb, A.B.C., Levandovski, R.M. & Hidalgo, M.P. (2009). Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. *Ver. Psiquiatr. Rio Gd. Sul* 31, 170-176.
7. Boden, M.J., Kennaway, D.J., 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132, 379-392.
8. Buijs RM, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol* 2006; 18:715–716.
9. Cardoso FRG, Cruz FAO, Silva D, Cortez CM. A simple model for circadian timing by mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2009. 42: 122-127.
10. Chang, G.Q., Karatayev, O., Ahsan, R., Gaysinskaya, V., Marwil, Z., Leibowitz, S.F., 2007. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E561–570.
11. Crispim, C.A., Zalcman, I; Dattilo, M., Padilha, H.G., Tufik, S. & Mello, M.T. (2007). [Relation between sleep and obesity: a literature review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 51, 1041-9.
12. Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: selfmedication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 2005;19(4):275–80.
13. Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C, L'Abbate N, Basso A, Pannacciulli N, Cignarelli M, Giorgino R & Soleo L (2003). Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 1353–1358.

14. Eguchi R, Cheik NC, Oyama L M, Nascimento CMO, Mello MT, Tufik S, Dâmaso A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Rev Bras Med Esporte*, Jun 2008, vol.14, no.3, p.182-187. ISSN 1517-8692.
15. Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N, Madej a. Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet Scand*; 50:48, 2008.
16. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26(1):37–49.
17. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2):218-24.
18. Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(5):911-919.
19. Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 61- 71.
20. Gaysinskaya, V.A., Karatayev, O., Chang, G.Q., Leibowitz, S.F., 2007. Increased caloric intake after a high-fat preload: relation to circulating triglycerides and orexigenic peptides. *Physiol. Behav.* 91, 142–153.
21. Goshen I, Yirmiya R, Iverfeldt K, Weidenfeld J (2003). The role of endogenous interleukin-1 in stress-induced adrenal activation and adrenalectomy-induced adrenocorticotrophic hormone hypersecretion. *Endocrinology* 144:4453–4458.
22. Halberg, F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol*, 31, 675-725.
23. Hanifin JP, Brainard GC. Photoreception for circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral regulation. *J Physiol Anthropol* 2007; 26: 87-94.
24. 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* 4, 649-661 (August 2003).
25. Hauffa BP 2001 Clinical implications of pulsatile hormone signals. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl A:S1-8.
26. Haus, E., Smolensky, M., 2006. Biological clocks and shift work: Circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes & Control* 17, 489-500.
27. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S143-51.

28. Huan, J.-N., J. Li, Y. Han, K. Chen, N. Wu, and A. Z. Zhao. 2003. Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 278:45638–45650.
29. Ichikawa T. Mutual coupling among insect neurosecretory cells with an ultradian firing rhythm. *Neurosci Lett* 2001; 299: 73-76.
30. I-DBSM, I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005.
31. IDF Internacional Diabetes Federation: The consensus world-wide definition of the metabólica syndrome. April 14, 2005.
32. Ioffe, E., Moon, B., Connolly, E. and Friedman, J. M. (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 11852- 11857.
33. Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2:297-307.
34. Kitamura T, Onishi K, Dohi K, Okinaka T, Ito M, Isaka N & Nakano T (2002). Circadian rhythm of blood pressure is transformed from a dipper to a non-dipper pattern in shift workers with hypertension. *J Hum Hypertens* 16, 193–197.
35. la Fleur, S.E., Akana, S.F., Manalo, S., Dallman, M.F., 2004. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology* 145, 2174–2185.
36. Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A. and Banks, W. A. (2004): *Aro. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 143-150.
37. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres ILS. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*, 2012; 38:189-196.
38. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1.
39. Markus, Regina Pekelmann, Barbosa, Eduardo José Mortani, Ferreira, Zulma Silva. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein* 2003. 1:143 – 148.155–1161.
40. Martínez-Carpio PA, Corominas A. Introducción general a la cronobiología clínica y a la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. *MedClin (Barc)* 2004; 123 (6): 230-5.
41. Masuzaki H, et al. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166–2170.

42. Mikurube, H. et al. 2005. Association of change in the type of job with prevalence of components of the metabolic syndrome: special reference to job stress.
43. Mohawk, J.A; Pargament, J.M; Lee, T.M; 2007. Circadian dependence of corticosterone release to light exposure in the rat. *Physiology & Behavior* 92, 800-806.
44. Moraes, R. C., A. Blondet, K. Birkenkamp-Demtroeder, J. Tirard, T. F. Orntoft, A. Gertler, P. Durand, D. Naville & M. Begeot: Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcriptionpolymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 2003, 144, 4773–4782.
45. Moser M, Penter R, Fruehwirth M, Kenner T. Why life oscillates--biological rhythms and health. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2006; 1:424-428.
46. NCEP, National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III -ATPIII, 2001.
47. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002 Mar 28;34(1):13-25. Review.
48. Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(7):1195-200.
49. Ohdo, S. (2007). Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 3-14.
50. Ostrander M.M, Ulrich-Lai Y.M, Choi D.C, Richtand N.M, Hermann J.P. Hypoatividade of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from cronic variable stress. *Endocrinology*, 2006 April; 147(4): 2008-2017.
51. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2003; 17(2):221-8.
52. Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S. M., Patel, H. R., Berg, A. H. and Pajvani, U. B., Scherer P. E. and Ahima R.S. (2004): *Nat. Med.* 10, 524-529.
53. Richter, H. G., Torres-Farfan, C., Rojas-Garcia, P.P., Campino, C., Torrealba, F., Seron-Ferre, M., 2004. The circadian timing system: Making sense of day/night gene expression. *Biological Research* 37, 11-28.
54. Roberge, C., Carpentier, A.C., Langlois, M.F., Baillargeon, J.P., Ardilouze, J.L., Matheux, P., & Gallo-Payet, N. (2007). Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E1465-E1478.

55. Romero CEM, Zanesco A.O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. Rev. Nutr., Fev 2006, vol.19, no.1, p.85-91. ISSN 1415-5273.
56. Sánchez J, Oliver P, Pico C, Palou A. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. Pflügers Arch 448: 500–506, 2004.
57. SBC-Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Arq. Bras. Cardiol. vol.84 suppl.1 São Paulo Apr. 2005.
58. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(11):4453–4458.
59. Selye, H. Stress Without Distress. New York: New York American Library. 1974.
60. Stunkard, A.J. & Alisson, K.C. (2003). Two forms of disordered eating in obesity: binge eating and night eating. Int J Obes Relat Metab Disord, 27, 1-12.
61. Tulipano, G., Vergoni, A. V., Soldi, D., Muller, E. E. and Cocchi, D. (2004):./ Endocrinol., 183, 289-298.
62. Verhagen L.A.W; Pevet, P; Saboureau, M; Sicard, B; Nesme, B; Claustrat, B; Buijs, R.M; Kalsbeek, A; 2004. Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. Brain Research 995, 197–204.
63. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. J Cell Physiol 216: 3–13, 2008.
64. Weiberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, et al. Repetead ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. Endocrinology, 2009; 150(2):749-61.
65. Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, et al. Food selection changes under stress. Physiol Behav 2006.
66. Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. Clin Sci (Lond). 2008;114(5):361-74.
67. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. J Atheroscler Thromb. 2005;12:295–300.

C) CO-AUTORIAS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS

- 1.** I.C. Macedo, L.F. Medeiros, **C. Oliveira**, C.M. Oliveira, J.R. Rozisky, V.L. Scarabelot, A. Souza, F.R. Silva, V.S. Santos, S.G. Cioato, W. Caumo, I.L.S. Torres. Cafeteria diet- induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides** 38 (2012) 189-196.

- 2.** Macedo, I.C.; Oliveira, C.M.; **Oliveira, C.**; Laste, G.; Rozisky, J.R.; Medeiros, L.F.; Scarabelot, V.L.; Nonose, Y.; Santos, S.; Battastini, A.M.O.; Ribeiro, M.F.M.; Torres, I.L.S. Obesity And Chronic Stress Induced Alteration In Hydrolysis Of Nucleotides In Blood Serum Of Rats: Possible Cardiovascular Risk Biomarker? Em fase final de preparação.

- 3.** Macedo, I.C.; Rozisky, J.R.; **Oliveira, C.**; Oliveira, C.M.; Laste, G.; Medeiros, L.F.; Souza, A.; Scarabelot, V.L.; Cioato, S.G.; Santos, S.; Marques, P.; Torres, I.L.S. Chronic Stress Associated With High Caloric Diet On Levels Of BDNF In Hippocampus, Hypothalamus And Olfactory Bulb Of Rats. Em preparação.

- 4.** A. Souza, B.C. Detanico, L.F. Medeiros, V.L. Scarabelot, **C. Oliveira**, S.G. Cioato, W. Caumo, I.L.S. Torres. Temporal Patterns Of Behavioral Response And Hormones Levels Are Disrupted By Restraint Stress In Rats. A ser submetido.

- 5.** L.N.S. Adachi, L.F. Medeiros, J.R. Rozisky, **C. Oliveira**, V.L. Scarabelot, A.C. Souza, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverses chronic stress effect in spinal cord BDNF levels of rats. **Brain Stimulation**. A ser submetido.

6. C.M. Oliveira, **C. Oliveira**, I.C. Macedo, P. Marques, F.R. Silva, I.C.C. Souza, W. Caumo, I.L.S. Torres. Obesity Model Reverted Stress Induced Hiperalgesia and Induced Anxiety-Like Behavior. A ser submetido.

7. C.M. Oliveira, **C. Oliveira**, A. Souza, L.F. Medeiros, I.C. Macedo, P. Marques, W. Caumo, I.L.S. Torres. Evaluation of Temporal Patterns of Obesity and Chronic Stress Serum Markers in rats. A ser submetido.