

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

RICARDO MAIA DANTAS

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA MODULAÇÃO DO CONTROLE
ALIMENTAR HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO EM RATOS *WISTAR* INDUZIDOS
À OBESIDADE POR DIETA**

Porto Alegre

2023

RICARDO MAIA DANTAS

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA MODULAÇÃO DO CONTROLE
ALIMENTAR HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO EM RATOS *WISTAR* INDUZIDOS
À OBESIDADE POR DIETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Rachel Krolow S.S. Bast

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Dantas, Ricardo Maia
Efeito do jejum intermitente na modulação do
controle alimentar homeostático e hedônico em ratos
wistar induzidos à obesidade por dieta / Ricardo Maia
Dantas. -- 2023.
78 f.
Orientadora: Rachel Krolow S.S Bast.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Comportamento alimentar. 2. Obesidade. 3. Jejum
intermitente. 4. Dieta hiperlipídica . 5. Alimentação
com restrição de tempo. I. Bast, Rachel Krolow S.S,
orient. II. Título.

“Aqueles que se apaixonam apenas pela prática, sem se importar com a exatidão ou a ciência, são como o piloto que embarca sem um leme ou uma bussola, e nunca sabe onde irá chegar”.

DA VINCI, Leonardo.

AGRADECIMENTOS

Eu abandei a religião há muito. Lembro que durante a minha adolescência, período mais crítico da minha vida, ainda recorria a “igreja” para pedir amparo ao Deus que residia naquele lugar. Hoje, com minha maturidade e conhecimento percebi que não preciso ir a lugar nenhum para se conectar com Deus. Ele está em todos os lugares.

Eu sou cristão, creio em um Deus que sempre me ajudou e continua me ajudando, no meu subconsciente, a seguir firme mesmo quando eu achava que não daria mais para continuar. Se a denominação da fé é dita como aquilo que se crê sem ver. Então, tenho certeza da minha fé por ti, Senhor. E sempre serei grato a Ti por nunca ter “soltado” a minha nos piores momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, que são agricultores, e criaram 10 filhos apenas com seu trabalho árduo da agricultura. Armazenei uma frase dita por ambos que trago até hoje comigo como incentivo para continuar: “A única herança que podemos deixar para você é seus estudos. Então estude, meu filho”. São pessoas humildes de grande coração que ensinaram a todos os seus filhos a serem humildes e a batalhar na vida por algo melhor. Vocês são o meu maior amor na terra. Aos meus irmãos, temos uma conexão em cadeia (kkkk não é para tanto, são 10 filhos), que sempre apoia um ao outro quando mais precisamos. Estou seguindo firme por vocês.

Agradeço ao meu companheiro Leonardo, que é a pessoa que mais acredita em mim nessa vida. Eu não teria nem feito as seleções das pós-graduações se ele não estivesse o tempo todo me dizendo que sou capaz de fazer qualquer coisa. Te amo muito, e obrigado por sempre me fazer acreditar que sou capaz.

Não posso deixar de agradecer ao meu grupo de estudos, minha segunda casa, que é o laboratório 25 (PROCAL). Eu sou tão honrado e feliz por fazer parte desse grupo que encho meus olhos de lágrimas todas as vezes quando vou falar dele para qualquer pessoa. Agradeço aos meus colegas e amigas, Aline e Carol, por sempre terem me ajudado incansavelmente na minha pesquisa e por toda parceria de cinema e RU que temos (kkk). Agradeço aos nossos IC's por sempre terem me ajudado durante a minha pesquisa, em especial a Giovana, que é minha amiga parceira (kkk). E meu agradecimento em especial para a Ariadni (Ari), ela foi a primeira a me receber de braços abertos no laboratório, e que me ensinou do início ao fim praticamente tudo que executei na minha pesquisa. Meu muito obrigado, amiga. Sou muito grato a você e sempre estarei à disposição para retribuir tudo em dobro.

E por fim, meu maior agradecimento é para minha professora orientadora Rachel. Ela é como uma mãe para todos os seus alunos, sem distinção, e que sempre estar disposta a nos ajudar a qualquer momento e em qualquer situação. Sem você não teria sido possível terminar esse trabalho. Te agradeço infinitamente por nunca ter me abandonado, e por sempre me ensinar com a maior paciência do mundo. Esses seus reflexos de bondade e de ensinamentos será refletidos por todos nós, nos momentos em que estivermos com os nossos alunos. Meu muito obrigado e eterna gratidão, prof. Você é minha inspiração profissional e como pessoa.

PARTE I

RESUMO

O comportamento alimentar pode ser regulado por duas vias clássicas: a homeostática e a hedônica, e estas vias podem ser moduladas por diferentes estratégias nutricionais. O consumo de uma dieta crônica com alto teor de gordura pode perturbar o controle do apetite por interromper o padrão das ritmicidades comportamentais da ingestão alimentar podendo ocasionar uma desordem no sistema metabólico e no desenvolvimento da obesidade. Já a alimentação com restrição de tempo (ART) reorganiza os ritmos circadianos da alimentação melhorando os efeitos deletérios provocados pelo consumo crônico de uma dieta rica em gordura. Sendo assim, a hipótese da ART como uma intervenção dietética na prevenção ou tratamento da obesidade parece ser uma opção atraente para ser estudada. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da ART sobre o comportamento alimentar e marcadores bioquímicos envolvidos com o controle do apetite homeostático e hedônico em ratos obesos induzido por uma dieta. Para atingir esse objetivo, ratos *Wistar* machos foram inicialmente randomizados em dois grupos: (1) controle dieta padrão (CTRL-DP) e (2) obesidade induzida por dieta (DIO), por 6 semanas. Posteriormente, os animais foram subdivididos em 4 grupos experimentais e submetidos ou não ao protocolo ART: (1) controle dieta padrão (CTRL-DP); (2) obesidade induzida por dieta (DIO); (3) controle dieta padrão submetidos à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART) e (4) obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART) por 4 semanas. Os grupos submetidos à ART tiveram acesso de 12h de alimentação durante a fase ativa e 12h de jejum durante a fase inativa dos animais. Os testes comportamentais foram realizados logo após o protocolo da ART. Os resultados demonstraram que o protocolo ART foi capaz de reduzir a circunferência abdominal, circunferência torácica, os níveis plasmáticos de colesterol e de leptina nos animais. Além disso, o protocolo de ART reduziu o peso corporal ao longo do tempo e apresentou uma tendência em reduzir os níveis plasmáticos de leptina nos animais que consumiram dieta rica em gordura. Interessante também, foi verificar que os animais do grupo DIO associado ao protocolo de alimentação por restrição de tempo mostraram redução nos níveis da IL-6 no hipotálamo. No entanto, o protocolo ART também aumentou os níveis plasmáticos de glicose e aumentou os níveis hipotalâmicos de IL-1 β e TNF- α . Com relação ao comportamento alimentar de sequência à saciedade, foi observado que a dieta rica em gordura e ART não interromperam a sequência comportamental de saciedade, apenas anteciparam ou retardaram o disparado da saciedade, e provocaram mudanças no tempo gasto nas atividades de descanso e, principalmente, de alimentação. Já na busca pelo alimento doce o grupo DIO reduziu o tempo para iniciar a comer e o consumo do alimento. Quando verificado a preferência alimentar foi visto que o grupo DIO obteve preferência pela dieta hiperlipídica enquanto os grupos CTRL-DP e CTRL-DP + ART preferiram a dieta hiperglicídica. Na avaliação de marcadores envolvidos com a sinalização dopaminérgica o grupo DIO diminuiu o imunocontéudo da enzima tirosina hidroxilase e do imunocontéudo do receptor do tipo D2 de dopamina, no entanto o grupo DIO na presença do protocolo de ART aumentou o imunocontéudo de D2 sem chegar nos níveis do grupo controle. Baseado nesses achados, foi possível concluir que os resultados foram consistentes com a hipótese de que a ART com disponibilidade de alimentos durante o período mais ativo/vigília dos animais foi capaz de reverter, em parte, os efeitos deletérios provocado pelo consumo crônico de uma dieta rica em gordura, sendo uma estratégia nutricional eficiente no tratamento e prevenção da obesidade.

Palavras-chaves: Comportamento alimentar; Obesidade; Jejum intermitente; Dieta hiperlipídica; Alimentação de tempo restrito.

ABSTRACT

Eating behavior can be regulated by two classic pathways: homeostatic and hedonic, and these pathways can be modulated by different nutritional strategies. Consuming a chronic high-fat diet can disrupt appetite control by interrupting the pattern of behavioral rhythms of food intake, which can lead to a disorder in the metabolic system and the development of obesity. Time-restricted feeding (TRF) reorganizes circadian eating rhythms, improving the harmful effects caused by chronic consumption of a high-fat diet. Therefore, the hypothesis of TRF as a dietary intervention in the prevention or the treatment of obesity seems to be an attractive option to be studied. The objective of this work was to investigate the influence of TRF on eating behavior and biochemical markers involved in the control of homeostatic and hedonic appetite in diet-induced obese rats. To achieve this objective, male Wistar rats were initially randomized into two groups: (1) standard diet control (CTRL-PD); (2) diet-induced obesity (DIO), simultaneously for 6 weeks. Subsequently, the animals were subdivided into 4 experimental groups and submitted or not to the ART protocol: (1) standard diet control (CTRL-PD); (2) diet-induced obesity (DIO); (3) standard diet control subjected to time-restricted feeding (CTRL-PD + TRF) and (4) diet-induced obesity subjected to time-restricted feeding (DIO + TRF) for 4 weeks. The groups undergoing TRF had access to 12 hours of food during the active phase and 12 hours of fasting during the animals' inactive phase. Behavioral tests were performed immediately after the TRF protocol. The results demonstrated that the TRF protocol was able to reduce abdominal circumference, chest circumference, plasma cholesterol and leptin levels in animals. Furthermore, the TRF protocol reduced body weight over time and showed a tendency to reduce plasma leptin levels in animals that consumed a high-fat diet. It was also interesting to note that the animals in the DIO group associated with the time-restricted feeding protocol showed a reduction in interleukin-6 (IL-6) levels in the hypothalamus. However, the TRF protocol also increased plasma glucose levels and increased hypothalamic IL-1b and TNF-alpha levels. Regarding eating behavior in the satiety sequence, it was observed that the high-fat diet and the TRF did not interrupt the satiety behavioral sequence, they only anticipated or delayed the onset of satiety, and caused changes in the time spent on rest activities and, mainly, feed. In the search for sweet food, the DIO group reduced the time to start eating and the consumption of the food. When food preference was verified, it was seen that the DIO group preferred the high-fat diet while the CTRL-PD and CTRL-PD + TRF groups preferred the high-fat diet. In the evaluation of markers involved with dopaminergic signaling, the DIO group decreased the immunocontent of the tyrosine hydroxylase enzyme and the immunocontent of the dopamine D2 receptor, however the DIO group in the presence of the TRF protocol increased the immunocontent of D2 without reaching the levels of the control group. Based on these findings, it was possible to conclude that the results were consistent with the hypothesis that the TRF protocol with food availability during the animals' most active/wake period was able to reverse, in part, the deleterious effects caused by chronic consumption of a high-fat diet, being an efficient nutritional strategy in the treatment and prevention of obesity.

Keywords: Eating behavior; Obesity; Intermittent fasting; High-fat diet; Time-restricted feeding.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

AgRP – Peptídeo ligado a Proteína Agouti

AMP – Adenosina Monofosfato

ATV – Área Tegmentar Ventral

ART – Alimentação com Restrição de Tempo

Beta-OHB – β -Hidroxibutirato

CPF – Córtex Pré-Frontal

CREB – Elemento Responsivo ao AMP

CT – Circunferência Torácica

CTRL-DP – Grupo Controle Dieta Padrão

DA – Dopamina

DARPP-32 – Fosfoproteína Neuronal ajustada por Dopamina

DIO – do inglês, *Diet-induced obesity*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPN – Dia Pós-natal

D1 – Receptor de Dopamina tipo 1

D2 – Receptor de Dopamina tipo 2

D3 – Receptor de Dopamina tipo 3

D4 – Receptor de Dopamina tipo 4

D5 – Receptor de Dopamina tipo 5

GLP-1 – Peptídeo 1-semelhante ao Glucagon

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

IA – Índice de Adiposidade

IL-6 – Interleucina 6

IL-1 β – Interleucina 1 β

IMM – Índice de Massa Muscular

JI – Jejum Intermitente

OMS – Organização Mundial da Saúde

POMC – Pró-ópio Melanocortina

RC – Restrição Calórica

VIGITEL – Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBESIDADE E SUAS COMPLICAÇÕES	12
1.2 NEUROBIOLOGIA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR	14
1.3 INTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR SOBRE OS PARÂMETROS HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO	14
1.4 A INFLUÊNCIA DO JEJUM INTERMITENTE SOBRE O CONTROLE HEDÔNICO E HOMEOSTÁTICO	17
1.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	19
1.6 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA: EFEITOS SOBRE CONTROLE ALIMENTAR	21
1.7 JUSTIFICATIVA	24
2. OBJETIVO GERAL	22
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	27
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	27
3.2 ANIMAIS	27
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	27
3.4 PROTOCOLO E COMPOSIÇÃO DA DIETA RICA EM GORDURA	30
3.5 PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO	30
3.6 MENSURAÇÃO DAS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS E DA COMPOSIÇÃO CORPORAL	31
3.6.1 Aferição do peso corporal e dos marcadores murinométricos dos animais	31
3.6.2 Determinação dos índices de adiposidade e massa muscular	31
3.7 MENSURAÇÃO DA GLICEMIA EM JEJUM	32
3.8 TAREFAS COMPORTAMENTAIS	32
3.8.1 Campo aberto	32
3.8.2 Sequência de saciedade comportamental	32
3.8.3 Consumo de alimento doce no corredor alimentar	33
3.8.4 Preferência alimentar	34
3.9 EUTANASIA DOS ANIMAIS	34
3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	35

3.10.1	Preparo das amostras	35
3.10.2	Marcadores inflamatórios	35
3.10.3	Determinação proteica	36
3.10.4	Parâmetros plasmáticos	36
3.10.5	Avaliação do imunoconteúdo de proteínas por Western Blotting	36
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.	RESULTADOS	47
4.1	A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO ALTERA O CONSUMO ALIMENTAR E O PESO CORPORAL DOS ANIMAIS INDUZIDOS À OBESIDADE POR UMA DIETA	37
4.2	AS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS AUMENTARAM AO LONGO DO TEMPO COM O CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM GORDURA	38
4.3	A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICA A SEQUÊNCIA DE SACIEDADE DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM DIETA RICA EM GORDURA	40
4.4	A DIETA RICA EM GORDURA E O PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICAM A BUSCA PELO ALIMENTO DOCE	43
4.5	DIETA RICA EM GORDURA INDUZ A PREFERÊNCIA PARA CONSUMIR ALIMENTOS GORDUROSOS ENQUANTO A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO AUMENTA A PREFERÊNCIA PELO CONSUMO DE ALIMENTOS RICOS EM AÇÚCAR	45
4.6	O CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM GORDURA SUBMETIDO OU NÃO AO PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICAM PARÂMETROS METABÓLICOS	46
4.7	A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO AUMENTA OS NÍVEIS DE CITOCINAS NO HIPOTÁLAMO	47
4.8	MARCADORES ENVOLVIDOS COM O CONTROLE DO APETITE SÃO ALTERADOS PELA DIETA RICA EM GORDURA E PELA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO	48
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÃO	63
7.	PERSPECTIVAS	64
	REFERENCIAS	56
	ANEXO	77
	Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRGS)	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SUAS COMPLICAÇÕES

A obesidade é uma doença metabólica crônica que abrange diferentes tipos de pessoas, gênero, idade e classes sociais, podendo desenvolver morbidades e reduzir a longevidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018) a obesidade é definida como um acúmulo excessivo ou anormal de gordura que apresenta riscos à saúde, e Hariri e Thibault (2010); Krishnan e Cooper, (2013) e Di Meo et al. (2017), que a causa principal está no desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e gastas.

Dados da OMS (2018) mostram que desde 1975 a obesidade quase triplicou no mundo todo, sendo que em 2016 mais de 1.900 milhões da população adulta (39% dos homens e 40% das mulheres), com 18 anos ou mais encontravam-se com sobrepeso e em meio a esse número mais de 650 milhões estavam obesos (sendo 11% homens e 15% mulheres). A estimativa aponta que em 2025, cerca de 2,3 bilhões estarão com excesso de peso, sendo que mais de 700 milhões com obesidade. Segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), no Brasil, a prevalência da obesidade, em ambos os sexos, aumentou de 15% para 18%, de 2010 a 2014, sendo que mais de 50% da população brasileira encontra-se com excesso de peso (ABESO, 2017).

Em consequência da obesidade, o aumento da gordura visceral e o estímulo crônico do sistema imunitário pode levar a doenças associadas à síndrome metabólica (comorbidade associada ao estilo de vida que desenvolve riscos a outras doenças) (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; DROR et al., 2017; YAMASHITA et al., 2018), como dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 e resistência à insulina (FARIAS et al., 2013; WEDELL-NEERGAARD et al., 2018).

A dieta rica em gordura é um dos fatores principais que contribuem para o crescimento epidêmico da obesidade (PEREIRA-LANCHA et al., 2010). Os estudos de Soi et al. (2011) e Hariri e Thibault (2010), mostraram que a dieta hiperlipídica é eficaz na indução da obesidade, tanto em humanos quanto em modelos animais. Em pesquisas experimentais foi demonstrado que o consumo de uma dieta hiperlipídica no período de 8 semanas produz um crescimento relevante de adiposidade em locais distintos do corpo, o que permite analisar mecanismos associados à síndrome metabólica e doenças cardiovasculares durante a evolução da obesidade (BUETTNER et al., 2007; FURNES et al., 2009; HARIRI e THIBAUT, 2010; GAMEZ-MENDEZ et al., 2015; PINHO et al., 2017). Todavia, Heydemann (2016) destaca

que, mesmo que a maioria dos estudos experimentais analisados induza à obesidade, é importante observar o tempo de duração da dieta, bem como a genética do animal, idade e a composição dos ácidos graxos.

A indução à obesidade pode ocorrer por diferentes tipos de dietas. Estudos experimentais mostraram que a dieta rica em gordura aumentou os níveis de leptina, mas induziu resistência aos efeitos da leptina, atenuou a saciedade e favoreceu a hiperfagia, em decorrência ao ganho de peso (SURWIT et al., 1995; AINSLIE et al., 2000).

Estudos que relacionam a obesidade a padrões de alimentos alterados e não a superalimentação, demonstraram que os ratos que receberam uma dieta hiperlipídica apresentaram maior peso corporal e índice de adiposidade, aumento na quantidade das calorias ingeridas, entre as refeições e redução no número de refeições ao dia (FURNES et al., 2009). Isto é, os animais expostos a um modelo de dieta hiperlipídica se alimentam menos vezes ao dia, mas consomem maiores quantidades de calorias.

O circuito de recompensa é alterado em decorrência da obesidade. Os indivíduos com IMC obeso comparados com normal apresentam ativação maior do circuito recompensa (ROTHEMUND et al. 2007). Estudos apresentam a relação entre o aumento da sensibilidade à recompensa e o ganho de peso em humanos, mostrando que suscetibilidade à recompensa é um fator que favorece a obesidade (DAVIS, 2004). Sugere-se que os níveis reduzidos do receptor de dopamina do tipo D2 nas extensões do mesolímbico de obesos seria capaz de induzir estes indivíduos a abuso de drogas (ou comida) de forma a compensar o estímulo reduzido do sistema de recompensa (VOLKOW et al., 1999). O sistema de recompensa a comidas em obesos é menos reativo no estriado dorsal pelo fato dos receptores D2 possuírem uma densidade reduzida nesse circuito e por terem a sinalização comprometida pela via dopaminérgica, o que favorece aos indivíduos a hiperfagia de maneira a compensar a deficiência da recompensa (STICE et al., 2008). A responsividade estriatal é regulada pelos receptores D2 em relação ao consumo de alimentos palatáveis e a sua sinalização reduzida pode favorecer o ganho de peso (KENNY, 2011).

Um estudo conduzido com ratos mostrou a propensão a obesidade após receberem uma dieta hiperlipídica por 3 semanas demonstrando um sistema dopaminérgico accumbal menos sensível a respostas fisiológicas específicas referente à ingestão de gorduras, assim como elevados níveis de triglicerídeos circulantes, que agem sobre a atividade do sistema dopaminérgico (RADA et al., 2010). Este resultado demonstra que a progressão da obesidade está associada com alterações da sinalização dopaminérgica mesoestriatal, especificamente nos receptores D2 do estriado, e o estímulo ineficiente dos receptores D2 colabora para a

premência do déficit da recompensa decorrente ao desenvolvimento da obesidade em ratos (KENNY, 2011).

1.2 NEUROBIOLOGIA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O comportamento alimentar é controlado por uma série de fatores com interações em três níveis principais: (1) fatores comportamentais e psicológicos (desejos e sensações hedônicas, compreensão de fome); (2) fatores metabólicos e periféricos; (3) interação entre neurotransmissores e sinalização metabólicas que acontecem no sistema nervoso central (PERES, 2021). O apetite corresponde aos fatores e processos que ocorrem nestes três níveis (BLUNDELL et al., 2001). Consequentemente, o despertar do apetite e do comportamento alimentar determina a regulação dos processos em três controles: a) fatores neurais que estão relacionados aos atos do comportamento alimentar e observações psicológicas; b) cada ato deste comportamento estimula uma ação no sistema fisiológico periférico e; c) sendo assim, esta ação é representada por atividade cerebral neuroquímica, formando o ato seguinte do comportamento alimentar (HARROLD et al., 2012).

O comportamento alimentar é regulado, essencialmente, por dois tipos de mecanismos: hedônico e homeostático (HARROLD et al., 2012). A regulação hedônica, ou o controle baseado na recompensa, pode se aplicar à via homeostática no decorrer de períodos de vasta demanda energética por relacionar o desejo de ingerir alimentos altamente palatáveis excedentes em gorduras e/ou açúcares (HARROLD et al., 2012). O controle homeostático é moderado pela necessidade do organismo em conservar os estoques de energia, sendo regulado sinais hormonais relacionados com a saciedade, fome e graus de adiposidade. Neste sistema, há a presença de hormônios periféricos como, grelina, leptina e insulina com sinalização via circuitos cerebrais hipotalâmicos, inibindo ou estimulando a fome, com a intenção de preservar o balanço energético (LUTTER e NESTLER, 2009).

1.3 INTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR SOBRE OS PARÂMETROS HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO

O hipotálamo é o núcleo do controle homeostático do apetite, agindo de forma a regular a produção de energia transportada por hormônios e nutrientes para a periferia por meio de duas vias: hormonal e neural (SASAKI et al., 2016). As interações metabólicas dos

hormônios anorexígenos insulina e leptina, e do hormônio orexígeno grelina podem influenciar na atividade variada de funções cerebrais.

A grelina e a leptina são hormônios que atuam de forma antagônica na via regulatória do apetite. A leptina é um hormônio produzido e liberado, majoritariamente, pelo tecido adiposo branco, atuando como um mensageiro de sinalização à saciedade no hipotálamo, reduzindo o consumo alimentar. No núcleo arqueado do hipotálamo, a produção dos hormônios orexígenos neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo ligado à proteína Agouti (AgRP), responsáveis pelo estímulo do consumo alimentar, têm suas atividades inibidas pela ação da leptina (RIBEIRO e SANTOS, 2013).

Em ocasião de jejum, os níveis de leptina diminuem e o hipotálamo desencadeia o aumento do apetite com a finalidade de promover o controle homeostático (ROMERO e ZANESCO, 2006). A grelina, um hormônio produzido no estômago, apresenta função orexígena, estimulando a ingestão alimentar, maximizando adipogênese, reduzindo a saciedade e impulsionando balanço energético positivo (RIBEIRO e SANTOS, 2013).

O desejo por comidas saborosas ou palatáveis é o que caracteriza o controle hedônico no consumo de alimentos, que é mediado pela recompensa (SOLFRIZZI et al., 2006). Sendo assim, o indivíduo é atraído pelo prazer e recompensa sensorial que este tipo de alimento proporciona em detrimento da sua necessidade biológica (HARROLD et al., 2012). As regiões cerebrais que são ativadas por alimentos com tais características são o Núcleo Accumbens (NAc), Área Tegmentar Ventral (ATV), Hipotálamo Lateral, Amígdala e Córtex Pré-Frontal (CPF).

Berridge (2009) afirmou que a Dopamina (DA), os canabinóides e os opioides podem participar do controle hedônico do comportamento alimentar, bem como outros sistemas neurotransmissores. Para Berridge et al. (2016) e Walker et al. (2017), o sistema de neurotransmissão dopaminérgico, por sua vez, atua nos comportamentos emocionais e de recompensa, nas funções motoras e na secreção hormonal. Sua atuação no organismo é crucial para o desenvolvimento do cérebro na idade adolescente e, também, pode favorecer as susceptibilidades a enfermidades. Para que haja uma combinação adequada entre as interações complexas das vias neurais, os eixos endócrinos e os estímulos ambientais, segundo Walker et al. (2017), é necessário um desenvolvimento adequado do sistema dopaminérgico, para que, durante a fase adulta, o indivíduo possa desfrutar de um sistema de recompensa funcional, já que os adolescentes tendem a ser mais sensíveis à recompensa.

A sinalização de DA abrange três vias relevantes: mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal. A via mesolímbica, remete projeções da ATV do mesencéfalo para o NAc no

estriado ventral e assimila métodos de recompensa e motivação; e a via dopaminérgica mesocortical relaciona ATV ao CPF, ajustando o estresse e respostas cognitivas, por fim, a via dopaminérgica nigroestriatal, se inicia no interior negro do mesencéfalo e se delinea para o caudado putamen no estriado dorsal, agindo na regulação dos mecanismos motores e comportamentos direcionado a objetivos (MAJCHER-MASLANKA et al., 2017; PERES, 2021).

O sistema mesocorticolímbico, de maneira integrada, é de suma importância no reparo e atribuição de princípio na recompensa e/ou na repulsa a estímulos motivacionais que controlam a transmissão dependente de DA e, também, modifica sua força sináptica (COCCURELLO, 2019). O complexo mesocorticolímbico, denominado de circuito de recompensa, envolve os sistemas mesocortical, com direção da ATV associado ao CPF, assim como, o sistema límbico, direcionado do ATV ao NAc. Estas regulações de recompensas alimentar dos sistemas centrais, recebem uma maior quantidade de interações de neurônios dopaminérgicos (BERRIDGE et al., 2016).

Os resultados da DA são entrepostos pela interação de cinco receptores distintos, comumente mencionados como dois tipos D₁ (D₁ e D₅) e D₂ (D₂, D₃ e D₄). O receptor da classe D₁ é encarregado por estimular a adenilato ciclase, otimizando a concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico e dessa forma estimula vários fenômenos, integrando a ativação da proteína cinase A, responsável por fosforilar, entre outros substratos, a fosfoproteína neuronal ajustada por dopamina (DARPP-32). Desse modo, a inibição da fosfatase, desencadeia a fosforilação da proteína que conecta o elemento responsivo ao AMP cíclico (CREB) no DNA. Enquanto os receptores da classe D₂, estando ativos, atenuam a concentração de AMP cíclico e assim inibem a proteína cinase A e, conseqüentemente, ativam as fosfatases, evitando a fosforilação da CREB. Desse modo, a dependência da classe do receptor no qual a DA se conecta, contém um efeito de sinalização diferenciado. Além do mais, os receptores da classe D₁ demonstram uma afinidade reduzida à DA, enquanto os receptores da classe D₂ apresentam maior compatibilidade a DA (BAIKA, 2013; VOLKOW et al., 2017). Sendo assim, a ingestão de alimentos palatáveis pode estimular uma maior liberação de DA temporariamente ativando os receptores da classe D₁, enquanto, a classe de receptores D₂ conseguem identificar níveis tônicos de liberação de DA, associados ao seu nível basal (BAIK, 2013). O estímulo sináptico e o nível síntese de DA no NAc é ampliado pelo aporte de substâncias à base de sacarose, relacionando o aumento da DA neste núcleo com um maior consumo de alimentos doces (COCCURELLO e MACCARRONE, 2018; SASAKI et al., 2016; SOLFRIZZI et al., 2006). Desse modo, vários autores propõem que no

NAc a finalidade dos receptores D₁ podem estar relacionadas com a resposta ativa direcionada pela recompensa, enquanto os receptores D₂ presumem ter função na verificação da recompensa (D'AQUILA, 2010; GALISTU e D'AQUILA, 2012).

Regular o sistema dopaminérgico tem se tornado uma preocupação crescente e o interesse recente por esse assunto se deve aos malefícios que a sua disfunção pode causar, como o quadro de obesidade induzido pela recompensa alimentar e de comportamentos compulsivos, ambos segundo Baik (2013), problemas de saúde pública. Para Salamone e Correa (2012), alimentos com grandes potencialidades palatáveis e drogas aditivas são considerados fatores reforçadores e compulsivos. Estes são processados e codificados durante a neurotransmissão de DA, atuando no sistema mesocorticolímbico.

1.4 A INFLUÊNCIA DO JEJUM INTERMITENTE SOBRE O CONTROLE HEDÔNICO E HOMEOSTÁTICO

O jejum intermitente (JI) é conhecido como uma estratégia dietética proeminente na prática clínica, além de contribuir para uma maior longevidade (MITCHELL et al., 2019), e prevenir o desenvolvimento de patologias relacionadas à obesidade (VAN DER MERWE et al., 2020).

A prática do JI como estratégia nutricional tem-se ganhado visibilidade populacional atualmente, todavia, a literatura já apresentava estudos em relação ao jejum desde a década de 1970, quando começaram a investigar o jejum praticado como ato religioso no Ramadã, onde os praticantes, no período de 30 dias, passam aproximadamente 12h em jejum, fazendo apenas duas refeições ao dia, sendo uma ao amanhecer e outra posteriormente ao pôr do sol (GUMAA et al., 1978; LI et al., 2017; LONGO; MATTSON, 2014; PATTERSON et al., 2015)

Nesse modelo nutricional, o indivíduo pode ser direcionado a períodos de abstinência alimentar em dias alternados ou a restrição da ingestão alimentar em período diário, sendo que os modelos de intervenção dietética do jejum apresentam diferentes tipos de protocolos a serem aplicados (WILSON et al., 2018), isto é, o jejum de dias alternados (descrito como 24h de restrição alimentar total, seguido de 24h de alimentação *ad libitum*) (LI et al., 2017), o protocolo de 5:2 (cinco dias se alimentando e dois dias de jejum total) (MURPHY; DIAS; THURET, 2014), o protocolo de tempo restrito (onde é aberto uma janela de ingestão alimentar por determinadas horas, seguido de privação alimentar nas demais horas restante do dia, e.x. 15 horas de privação alimentar e 9 horas de acesso livre à alimentação) (WANG et

al., 2018) e o protocolo de uma refeição por dia (acesso apenas a uma refeição diária durante o período de 3 horas ininterrupta) (PARK et al., 2017).

Os protocolos de jejum mais utilizados em modelos animais são os protocolos de tempo restrito e de dias alternados (MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017); o tempo em que ocorre o jejum será determinado com protocolo previamente estabelecido (CATTERSON et al., 2018; GOTTHARDT; BELLO, 2017; MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017; WILSON et al., 2018). Embora a literatura apresente diversos estudos acerca do JI, tanto em ensaios clínicos quanto em modelos animais, não há um consenso unânime sobre a recomendação do jejum a ser seguido, devido aos resultados serem muitos heterogêneos e demonstrarem discordâncias em seus estudos (CATTERSON et al., 2018).

Diferentes estudos demonstraram resultados positivos referente ao JI, tanto em voluntários como em modelo animal, como: redução do peso corporal, melhora da sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica, redução dos níveis plasmáticos de leptina, proteção contra a neurodegeneração e redução da inflamação (BRUCE-KELLER et al., 1999; ANSON et al., 2003; KIM et al., 2018; HU et al., 2019; GABEL et al., 2020).

O JI demonstrou ser uma intervenção dietética benéfica no controle e perda de peso, tanto em modelo animal quanto em humanos. Catenacci et al (2016) demonstrou em seu estudo, que o JI realizado em 8 semanas reduziu o peso corporal dos animais e não favoreceu o ganho de peso após 6 meses de intervenção. Todavia, um estudo conduzido por Munhoz et al. (2020) com ratas *Wistar* submetidas ao JI durante 12 semanas, demonstrou que apesar da redução no ganho de peso corporal, os animais apresentaram um maior índice de adiposidade.

O JI também apresentou resultados satisfatórios diante do perfil lipídico, reduzindo os níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* – LDL), e aumentando a lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein* – HDL). Além disso, também reduziu os níveis de colesterol sérico total e de triglicerídeos, tanto em animais quanto em indivíduos obesos (VARADY et al., 2015; WILSON et al., 2018).

Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado resultados divergentes ocasionados pela prática do JI. Tatulli et al (2018) mostraram que o JI não expressou efeitos neuroprotetores, pelo contrário, intensificou a morte neural em decorrência do aumento das concentrações de lipídios pró-inflamatórios em camundongos. Em outro estudo, camundongos hipercolesterolêmico submetidos ao protocolo do JI apresentaram um aumento no índice de adiposidade, nas concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-LDL, glicose e insulina (DORIGHELLO et al., 2014).

Estudos que analisaram o comportamento alimentar mostraram que a intervenção do JI não favoreceu a hiperfagia compensatória nos dias de jejum em mulheres com sobrepeso (HAVIE et al., 2013, 2011). No entanto, uma das maiores dificuldades à adesão ao JI é a intensa sensação de fome durante os períodos de jejum programados (HEILBRONN et al., 2005), entretanto, esse sentimento de fome subjetiva pode ser amenizado reduzindo o período de jejum ou fornecendo uma pequena refeição (VARADY et al., 2009).

Estudo realizado por Gotthardt et al (2016), mostraram que a intervenção dietética com JI em Camundongos machos C57/BL6 alimentados por 8 semanas como uma dieta hiperlipídica, apresentaram resultados satisfatório na redução do peso corporal, nos níveis séricos de glicose plasmática, conseqüentemente, melhorando os parâmetros de resistência à insulina e otimizou a expressão gênica relativa do NPY no núcleo arqueado. Esses achados evidenciam que o JI foi capaz de produzir alterações hipotalâmicas, recomendando que o processo contra regulatório da perda de peso a curto prazo esteja associado à estratégia do JI.

1.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O ciclo circadiano (do latim, *circam diem*, cerca de um dia) é análogo a um relógio de 24 horas, formado por um complexo de marcapasso mestre, posicionado no cérebro, que coordena secundariamente osciladores periféricos, majoritariamente presentes em todas as células do organismo, direcionados pelo ciclo claro/escuro diário (ADAMOVICH et al., 2014; LONGO; PANDA, 2016).

O relógio biológico mestre está localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo dos mamíferos (sistema nervoso central), todavia, é provável localizar oscilações de relógios similares nos tecidos periféricos, incluindo aqueles que regulam as vias metabólicas, conseqüentemente, a ingestão de alimentos fora do período regular da alimentação (isto é, se alimentar após o período de vigília, que é compreendido entre as 6 e 22 horas em seres humanos) pode gerar um desequilíbrio energético devido alguns relógios periféricos sofrerem desregulação na ritmicidade que controla a ingestão alimentar (PATTERSON; SEARS, 2017).

Os efeitos diretos ou indiretos do relógio circadiano central, produz uma ritmicidade em diferentes vias bioquímicas, tais como, vias hormonais, dopaminérgicas, sinalização entre os tecidos periféricos e centrais cujos ritmos são mais proeminentes no ciclo claro/escuro ou no ciclo jejum-alimentação (PANDA, 2016).

O ciclo jejum-alimentação, também conhecidos como *Zeitgeber* (do alemão significa, marcador de tempo ou cronômetro), atuam intervindo nos mecanismos digestivos e absorptivos e nas alterações da concentração plasmáticas de aminoácidos, carboidratos e lipídios (BERNADI et al., 2009). Como o jejum e a alimentação diferem espontaneamente entre o dia e a noite, atuam mutuamente na regulação do estado alimentado (pós-prandial), no estado de jejum (pré-prandial) e nas ritmicidades circadianas para manter os níveis fisiológicos basais do organismo (PANDA, 2016).

Os fatores ambientais de atividades e descanso dos ritmos metabólicos são produzidos pelas células endógenas reguladas pelo ciclo circadiano, isto é, a exposição ao ciclo claro-escuro, assim como por meio de modelos de jejum e alimentação, são ritmos periódicos comportamentais, relativamente simples que combinam várias funções principais de vias metabólicas, sistemas imunológico, reprodutivo, endócrino, digestivo e cardiovascular, e várias regiões do cérebro (MANOOGIAN; PANDA 2017).

A função da alimentação com restrição de tempo (ART) é regularmente utilizada para analisar a importância do acesso livre à alimentação por um determinado período diante da regulação do relógio circadiano (MANOOGIAN; PANDA, 2017). A premissa da ART é definida como uma estratégia dietética que atua como coadjuvante na prevenção e tratamento da obesidade e de doenças associadas à síndrome metabólica devido ao seu potencial de reorganizar os arrastamentos dos relógios periféricos e central (LONGO; MATTSON, 2014).

Estudos realizados em animais com o protocolo da ART por 8 horas durante à fase ativa, demonstraram resultados positivos contra doenças associadas à síndrome metabólica induzidas por dietas hiperlipídicas, prevenindo o quadro de obesidade nos animais sem alterar o consumo alimentar ou a preferência na composição das dietas durante o estado de jejum na fase inativa de luz (HATORI et al., 2012; CHAIX; ZARRINPAR, 2015).

Em um estudo de revisão apresentado por Chaix et al. (2014), conduzidos com ratos induzidos à obesidade por dieta, analisaram que os animais alimentados com dieta normal, *ad libitum*, apresentaram um consumo calórico de 80% de suas necessidades energéticas diárias durante a fase ativa/escuro, contudo, quando os animais tiveram a dieta trocada para uma rica em gordura ocorreu alterações no tempo da ingestão calórica e uma repartição do consumo alimentar de 50% na fase ativa/escuro e de 50% na fase inativa/luz.

No mesmo estudo supracitado, os animais alimentados com a dieta padrão por 8 a 12 horas na fase ativa/escuro, não reduziram o consumo calórico e nem o nível de atividade em relação ao grupo alimentado com a dieta hiperlipídica (HATORI et al., 2012; ZARRINPAR, 2014). Todavia, a intervenção com o ART preveniu os camundongos a desenvolverem

obesidade e suas complicações associadas, além do mais, restaurou a expressão do relógio circadiano de vários genes metabólicos para os níveis normais observados em camundongos alimentados com a dieta padrão (ZARRINPAR, 2014).

Os processos bioquímicos e fisiológicos associados ao jejum, independentemente do ciclo circadiano, estimula uma série de reações químicas decorrente ao período de alimentação ou de jejum que podem apresentar fatores importantes na prevenção de diversas doenças associadas à obesidade otimizando a saúde humana (LONGO; PANDA, 2016).

1.6 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA: EFEITOS SOBRE O CONTROLE ALIMENTAR

Acredita-se que a obesidade está relacionada com o processo de inflamação de baixo grau, tanto na periferia, quanto no sistema nervoso central, e as evidências indicam que o aumento da expressão de diferentes proteínas inflamatórias estão associadas ao prejuízo na sinalização hipotalâmica e de hormônios anorexígenos (OLIVEIRA et al., 2022).

A circuitaria neural que controla a ingestão alimentar e os aferentes sinais hormonais envolvidos na modulação desta complexa rede tem sido abundantemente investigado para elucidar os mecanismos relacionados à regulação da homeostase energética. O hipotálamo é apontado como o núcleo central que regula esse sistema, portanto, a interrupção da sinalização das respostas hipotalâmicas em moléculas sinalizadoras cruciais tem sido relacionada a progressão da obesidade, evidenciando assim, a relevância do controle das funções hipotalâmicas para saúde (SAINSBURY; ZHANG, 2010; THALER; SCHWARTZ, 2010).

Os neurônios orexígenos, Neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP), assim como, o neurônio anorexígeno pró-ópio melanocortina (POMC), são componentes principais que integram a rede de neurocircuitos que controlam a homeostase energética e os sinais de saciedade e fome, relacionada a sinalização periférica e central (MORRIS; RUI, 2009). A neuroinflamação, em regiões hipotalâmicas, pode desencadear o comprometimento dos mecanismos de resposta celular, e os neurônios NPY parece ser mais resistente do que os neurônios POMC (HORVATH et al., 2010).

O consumo crônico de uma dieta rica em gordura pode estimular marcadores pró-inflamatórios em peptídeos neurais relacionado ao NPY/Agouti (AgRP), excitatórios do apetite, modulando a expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) no núcleo arqueado do hipotálamo (DALVI et al., 2017). Acredita-se também que o aumento do TNF- α reduz a

ação de hormônios anorexígenos, como a leptina, e otimiza a expressão hipotalâmica de SOCS3 (ARRUDA et al., 2011). Embora os estudos demonstrem que os protocolos dietéticos de restrição calórica (RC), especialmente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade tem sido bastante explorado para clarear os efeitos deletérios da neuroinflamação relacionada à obesidade (LEE et al., 2010), um recente estudo de meta-análise analisou os níveis séricos de marcadores inflamatórios em respostas a diversos protocolos de RC ou JI, e após, incluir apenas um estudo com JI (jejum de 24h em dias alternados, consumo entre 25% ou 125% das necessidades energéticas) em indivíduos obesos, concluiu que os níveis de TNF- α não foram reduzidos (TREPANOWSKI et al., 2018). Entretanto, vale salientar que há uma escassez de estudos nesta área.

Em um estudo realizado por Spezani et al. (2020), onde analisaram os efeitos do JI de 24h em camundongos, verificaram que os animais obesos submetidos ao protocolo do JI, interessadamente, apresentaram maior expressão hipotalâmica de TNF- α quando comparado os seus homólogos. Todavia, os resultados ainda permanecem discrepante, tendo a necessidade de mais estudos com diferentes protocolos de JI para avaliar a expressão dessa citocina pró-inflamatória principalmente em regiões hipotalâmicas de animais obesos.

Outro componente essencial do sistema imune que está associado à obesidade e a inflamação de baixo-grau é a interleucina-6 (IL-6). Seus níveis aumentados na circulação sanguínea resultam numa maior produção e excreção pelo tecido adiposo (ROYTBLAT et al., 2000; STENLOF et al., 2003), mas que pode ser regulado por dietas de baixas calorias (BASTARD et al., 2000; GALLISTL et al., 2001). Essa citocina tem demonstrado ter efeitos deletérios ao organismo e provocado distúrbios inflamatórios em indivíduos com obesidade (MISHRA et al., 2019).

O hipotálamo é indicado como sendo o ponto chave para os efeitos anorexígenos e metabólicos da IL-6 (TIMPER et al., 2017). Os principais sinais da homeostase energética, como a leptina e o peptídeo 1-semelhante ao glucagon (GLP-1), precisa de uma maior integridade da IL-6 no hipotálamo para atenuar a ingestão de alimentos e manter o controle do peso corporal (LE FOLL et al., 2015; SHIRAZI et al., 2013).

Um estudo realizado por MISHRA et al. (2019) em camundongos machos e fêmeas obesos, com a finalidade de delimitar as regiões cerebrais de interesses da IL-6 com seu potencial papel na redução de peso e controle da ingestão alimentar, demonstrou, curiosamente, um forte efeito redutor na expressão do gene IL-6 nos animais alimentados com uma dieta rica em gordura apenas em um núcleo cerebral, no núcleo parabraquial (PBN). Embora a maioria dos estudos tenha demonstrado que o hipotálamo é a principal região de

substrato neural para os efeitos de redução de peso da IL-6 (BENRICK et al., 2009; LE FOLL et al., 2015; TIMPER et al., 2017), o estudo anterior demonstrou uma nova região cerebral, o PBN, que tem forte afinidade em receber sinalizações de hormônios anorexígenos para controle da homeostase energética (MISHRA et al., 2019).

O hipotálamo é uma região de vulnerabilidade a esses marcadores pró-inflamatórios e o desenvolvimento da obesidade pode ser considerado como o fator principal da desregulação dos mecanismos celulares que tangenciam a fisiopatologia da obesidade (WILLIAMS, 2012).

Neste contexto, apesar de diferentes estudos mostrarem que os protocolos do JI tem efeitos benéficos na redução dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com sobrepeso ou obesidade (SPEZANI et al., 2020, LEE et al., 2010), há poucos estudos que exploraram a adaptação dessas proteínas inflamatórias em região hipotalâmica.

1.7 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública a nível mundial. O consumo de dietas densas em calorias provoca a desregulação da homeostase energética gerando a interrupção dos ritmos que controlam a alimentação favorecendo o desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica. Essas alterações na ritmicidade comportamental estão associadas com a interrupção da sinalização de hormônios que controlam a ingestão de alimentos em diferentes regiões do sistema nervoso central. Diante disso, as comunidades científicas têm estudado os mecanismos de bases fisiológicas da etiologia da obesidade a fim de compreender melhor a complexidade dessa patologia. A alimentação com restrição de tempo é uma intervenção dietética que vem sendo bastante estudada para reforçar os ritmos circadianos da alimentação e estabelecer um melhor controle temporal do apetite. Sendo assim, esse modelo de intervenção dietética demonstrou ser uma importante ferramenta no tratamento e prevenção da obesidade.

Embora a literatura apresente uma variedade de estudos aparentemente conflitantes sobre o JI, vale salientar que os protocolos existentes do JI variam desde o tempo de aplicabilidade, assim como, o período do dia em que será aplicado. Por isso, ainda não está bem elucidado os efeitos desses protocolos dietéticos diante aos parâmetros comportamentais do controle hedônico e homeostático da alimentação. Salientamos que devemos ter parcimônia aos resultados encontrados em modelos animais quando extrapolado em humanos, todavia, o modelo animal é uma ferramenta de alta relevância na pesquisa para estudar os mecanismos de intervenções alimentares sob um ambiente controlado e padronizado, além disso, analisar os efeitos diretamente das estruturas cerebrais, em especial, o hipotálamo e o núcleo Accumbens.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da ART sobre o comportamento alimentar e marcadores bioquímicos envolvidos com o controle do apetite homeostático e hedônico em ratos obesos induzido por uma dieta.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o consumo alimentar em calorias e gramas e o peso corporal ao longo do tempo;
- Avaliar os parâmetros murinométricos ao longo do tempo;
- Avaliar os níveis plasmáticos de glicose, leptina, triglicerídeos, colesterol total;
- Investigar o comportamento alimentar de saciedade;
- Investigar o comportamento motor e o comportamento alimentar hedônico;
- Avaliar o comportamento de preferência alimentar;
- Analisar o imunoconteúdo do receptor de leptina no hipotálamo;
- Analisar o imunoconteúdo das proteínas envolvidas com a neurotransmissão dopaminérgica (enzima tirosina hidroxilase e receptor do tipo 2 de dopamina) no núcleo accumbéns;
- Analisar marcadores inflamatórios no hipotálamo.

PARTE II

3. METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os tratamentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CEUA-UFRGS de número 43150), seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do CONCEA, em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), bem como normativas internacionais como o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “*Canadian Council on Animal Care*” (CCAC).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, solicitados ao Biotério de Criação do Departamento de Bioquímica desta Universidade. Os animais permaneceram em salas específicas do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, alojados em caixas-moradia individuais a partir do recebimento, mantidos em ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de 22°C +/- 1°C com acesso a alimento e à água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em número de 3 ou 4 animais por caixa moradia de propileno (41 x 34 x 17,8 cm) até o dia pós-natal 107. Posteriormente, foram eutanasiados por decapitação e coletadas as estruturas cerebrais para análises bioquímicas.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para este estudo, ratos *Wistar* machos, de 21 dias de idade, foram desmamados e separados para serem alocados em 2 grupos, onde receberam suas respectivas dietas por 6 semanas: (1) dieta padrão (50% de carboidrato, 22% de proteína e 4% de gordura); e (2) dieta hiperlipídica (25% de carboidrato, 28% de proteína e 42% de gordura). Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica foram chamados de grupo obesidade induzida por dieta

(do inglês, *diet-induced obesity* – DIO), enquanto os animais alimentados com a dieta padrão do biotério foi chamado de grupo controle.

Após este período de 6 semanas, fase de indução à obesidade (DPN 63), os grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica, alimentados com suas respectivas dietas experimentais, foram subdivididos em quatro grupos experimentais e, posteriormente, submetidos ou não ao protocolo da ART:

- (1) Grupo controle dieta padrão (CTRL-DP);
- (2) Grupo controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART);
- (3) Grupo obesidade induzida por dieta (DIO);
- (4) Grupo obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART).

Os animais submetidos à intervenção da ART, tiveram uma janela aberta de alimentação no período de 12 horas para que os animais tivessem acesso às suas respectivas dietas *ad libitum*, após a este período, os animais foram privados de suas dietas e permaneceram em jejum de 12 horas ininterruptas. Os demais grupos que não foram submetidos à ART permaneceram sendo alimentados *ad libitum*, com suas respectivas dietas, até o final do experimento; a intervenção dietética da ART foi realizada por 4 semanas (até o DPN 94). No dia posterior, DPN 95, todos os grupos experimentais foram submetidos a um jejum de 12h, início as 07h:00min até as 19h:00min, para a realização do teste de glicemia em jejum. Esse período de jejum de 12h foi estabelecido para não interferir com o jejum dos grupos submetidos ART.

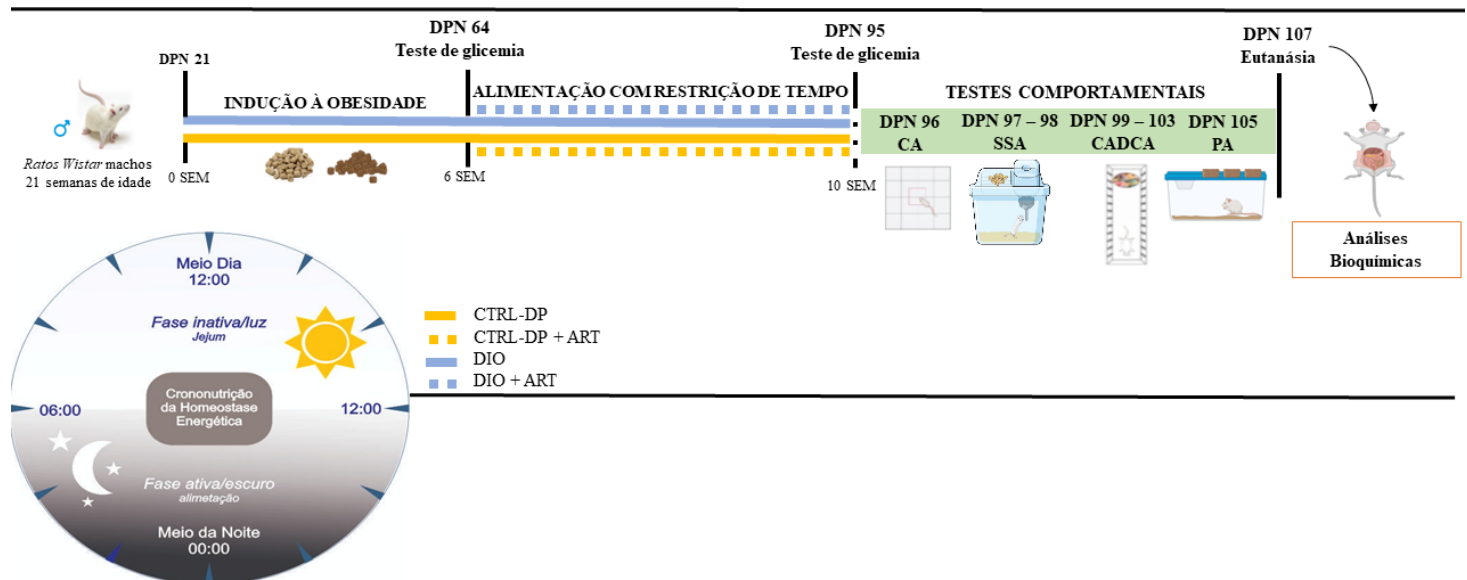
O experimento ocorreu respeitando às fases cíclicas de atividade biológica dos animais, onde foi programado o acesso livre à alimentação (escuro/ativo) e a privação do consumo alimentar (claro/jejum) em sincronia com o ciclo claro-escuro do alojamento onde os animais foram mantidos durante todo o experimento (o ciclo claro-escuro do biotério é estabelecido no período das 7h:00min às 19h:00min).

Durante todo o período experimental, foram avaliados os seguintes parâmetros nos animais: o consumo calórico, medidas murinométricas (peso corporal, comprimento corporal e circunferências torácica e abdominal). Além do mais, foi avaliado durante o protocolo experimental a medida da glicose e de corpos cetônicos no plasma dos animais. A partir do dia pós-natal 96 (DPN 96) os animais foram submetidos a tarefas comportamentais como: campo aberto (DPN 96), sequência de saciedade comportamental (DPN 97 e 98) e consumo de alimento doce no corredor alimentar (DPN 99 a 103) e preferência alimentar (DPN 105).

As tarefas comportamentais foram realizadas no final da intervenção do TRF (4 semanas), durante à fase de atividade dos animais, período noturno, a partir das 19h:00min.

Após a realização dos testes comportamentais, os animais (DPN 107) foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se guilhotina. Os animais destinados à eutanásia foram mantidos em outra sala até o momento em que foram levados, individualmente, para o ambiente destinado à eutanásia, a fim de evitar o estresse entre os grupos. A sala em que os animais foram mantidos foi adaptada ao ciclo escuro dos animais, isto é, foram mantidos em uma sala escura e quando levados ao momento do sacrifício, os animais estavam sem contato com a influência da luz até o momento da morte. Todo o procedimento foi realizado por alunos e pesquisadores treinados.

O desenho experimental está delineado na figura 1 abaixo:



Legenda: Desenho experimental. Após o desmame aos 21 dias de vida, os animais serão divididos e destinados a receber suas respectivas dietas experimentais, dieta padrão ou dieta hiperlipídica por 6 semanas e, posteriormente, serão submetidos à intervenção da alimentação com restrição de tempo por mais 4 semanas. Os testes comportamentais serão iniciados no DPN 96: teste de campo aberto, sequência de saciedade, consumo de alimento doce no corredor alimentar e preferência alimentar. No DPN 107, os animais foram eutanasiados e o plasma e estruturas cerebrais foram coletados para análises bioquímicas.

CTRL-DP = Controle dieta padrão; CTRL-DP + ART = Controle dieta padrão + alimentação com restrição de tempo; DIO = Obesidade induzida por dieta; DIO + ART = Obesidade induzida por dieta + alimentação com restrição de tempo; DPN = Dia pós-natal; SEM = Semana; CA = Campo aberto; SSA = Sequência de saciedade alimentar; CADCA = Consumo de alimento doce no corredor alimentar; PA = Preferência alimentar.

Nota: As linhas azul e dourado delineiam o período, semanas, em que os animais se alimentaram com as suas respectivas dietas, hiperlipídica e padrão, *ad libitum*, enquanto as linhas tracejadas (azul e dourado) representam os animais submetidos à intervenção dietética do jejum intermitente. A linha verde representa a última etapa experimental com os animais: a aplicabilidade dos testes comportamentais.

3.4 PROTOCOLO E COMPOSIÇÃO DA DIETA RICA EM GORDURA

A dieta rica em gordura será enriquecida com 42% de gordura provinda de banha de porco e óleo de soja, conforme demonstrado na tabela 1 (ARCEGO et al., 2014). Esta dieta foi composta por uma mistura de sal, vitaminas, proteína de soja purificada, metionina, lisina e amido. Seu conteúdo calórico será de 588,0 kcal/100g, em comparação com a ração padrão, que contém 360,0 kcal/100g. A banha suína é rica em ácidos graxos saturados, ácidos palmítico e oleico, enquanto o óleo de soja é uma gordura poliinsaturada, rica em ômega 3 e 6. Essas fontes de gorduras serão utilizadas para reproduzir a base do consumo de gorduras nas dietas ocidentais. Foi adicionado 1,6% (w:w) de óleo de soja para fornecer uma quantidade mínima de ácidos graxos do tipo ômega-3 (SIMOPOULOS, 2002).

Tabela 1: Composição nutricional/100 g de ração utilizada

Dieta	Energia (Kcal)	Proteínas totais (g)	Carboidratos totais (g)	Lipídios totais (g)
Padrão (Nuvilab®)	360,0	22	44,3 (de amido)	4 (0,62 de gordura saturada e 3,4 de gordura insaturada)
Rica em gordura	588,0	28	25 (12,5 de amido e 12,5 de sacarose)	42 (16 de gordura saturada e 16 de gordura insaturada)

3.5 PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO

O JI é uma estratégia dietética que abrange diferentes protocolos e aplicabilidades de forma individual, onde estabelece por um determinado período a privação ou a diminuição significativa da ingestão alimentar. O tempo determinado para a estratégia do jejum dependerá da escolha do protocolo utilizado (GOTTHARDT; BELLO, 2017; MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017; CATTERSON et al., 2018; WILSON et al., 2018).

O jejum de tempo restrito ou alimentação com restrição de tempo é um protocolo de intervenção dietética alternativo do JI, que concede a abertura de uma janela de tempo com disponibilidade do consumo alimentar *ad libitum* por determinadas horas (3-4h, 7-9h, ou 10-12h), ou uma janela média de jejum, privação do consumo alimentar, de 12 a 24 horas por dia (LECHEMINANT et al., 2013).

O protocolo que foi utilizado neste estudo é o da alimentação com restrição de tempo, onde os animais ficaram 4 semanas (28 dias) ininterruptos, sob a privação, jejum, da dieta por

12 horas (07h:00min às 19h:00min) e disponibilidade à dieta *ad libitum* por 12 horas (19h:00 às 07h:00min) (BELKACEMI et al., 2012). A escolha do protocolo foi determinada com base na literatura em estudos experimentais com roedores (BELKACEMI et al., 2012; VAN DER MERWE et al., 2020; ZHANG et al., 2020) e estudos clínicos (DOMASZEWSKI et al., 2020; JAMSHED et al., 2019).

3.6 MENSURAÇÃO DAS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS E DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

3.6.1 Aferição do peso corporal e dos marcadores murinométricos dos animais

A mensuração do peso dos animais foi realizada 1 vez por semana, em um horário fixo, utilizando uma balança analítica com precisão de 0.1g, para aferição do peso expresso em gramas.

Os marcadores murinométricos como a circunferência torácica (CT) (região mensurável atrás da pata dianteira), circunferência abdominal (AC) (região mensurável anterior ao antepé) e o comprimento corporal (comprimento naso-anal), foram determinados em todos os animais em 30, 60 e 90 dias (NOVELLI et al., 2007). A mensuração foi feita com uma fita métrica e os animais foram aferidos sempre por dois avaliadores treinados durante todo o experimento.

3.6.2 Determinação dos índices de adiposidade e massa muscular

Para o cálculo do Índice de Adiposidade (IA) foi utilizada uma fórmula matemática, expresso como o percentual de massa corporal total, onde a gordura individual representa as porções do tecido adiposo branco (periretal, epididimal, inguinal, retroperitoneal e mesentérico) e peso corporal total representa o peso do animal (SORATO, 2019). E para o cálculo do Índice de Massa Muscular (IMM), será utilizada, analogamente, a mesma fórmula matemática descrita anteriormente, sendo que, as porções do tecido muscular gastrocnêmio e sóleo, foram extraídos para mensurar o percentual de massa muscular.

$$IA\% = \frac{\Sigma(\text{Gordura individual})(g)}{\text{Peso Corporal Total (g)}} \times 100$$

$$\text{IMM}\% = \frac{\Sigma(\text{Gastrocnêmio} + \text{Sôleo})(g)}{\text{Peso Corporal Total (g)}} \times 100$$

3.7 MENSURAÇÃO DA GLICEMIA EM JEJUM

A glicemia de jejum foi mensurada em dois momentos, no final da fase de indução à obesidade e ao final da intervenção com o protocolo da alimentação com restrição de tempo. No dia do teste, os animais foram submetidos a um jejum de 12h, das 07h00min às 19h00min, e posteriormente, foi realizada a mensuração da glicemia de jejum. O sangue foi coletado por meio de punção da veia caudal do animal e as concentrações de glicose foram mensuradas em um aparelho de monitor de glicemia portátil *Freestyle Optium Neo* (Abbott Diabetes Care, São Paulo, SP, Brasil) com tiras de teste para monitoramento específicas para glicose.

3.8 TAREFAS COMPORTAMENTAIS

3.8.1 Campo aberto

A tarefa de campo aberto foi realizada no DPN 96 e consiste em uma arena contendo uma área central, aversiva para os ratos, e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade motora como de comportamentos relacionados à ansiedade (PRUT e BELZUNG, 2003). O aparato consiste em uma arena de madeira com assoalho preto (50x50 cm, altura 50 cm). Com o auxílio do programa de avaliação de imagens ANY-MAZE®, a locomoção central e periférica, a porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (locomoção periférica e locomoção central), cruzamentos e distância percorrida, foram avaliados durante 10 minutos após o animal ser colocado no aparato. A intensidade luminosa no centro do campo aberto será de 50 lux.

3.8.2 Sequência de saciedade comportamental

Foi realizada no DPN 97 e 98. Os animais foram mantidos em estado de privação alimentar prévia por 4 horas antes da entrega da comida, das 15h às 19 horas; a restrição foi feita apenas nos animais que não foram submetidos a intervenção com a alimentação com restrição de tempo, enquanto, os animais dos grupos da ART já estavam em jejum

estabelecido pelo próprio protocolo. A aplicabilidade deste teste foi realizada no início da fase ativa dos animais, às 19h:00min, período cronometrado para o término do protocolo do jejum e início da alimentação. A sequência de saciedade comportamental foi gravada por 1 hora. Foram registradas as durações, em segundos, dos seguintes comportamentos: a) Alimentação: o registro iniciava quando o rato for observado ingerindo o alimento no comedouro; b) Comportamento de *grooming*: avaliação das lambidas das patas dianteiras, movimentos das patas dianteiras na cabeça e lambidas da região ventral, o dorso e patas traseiras; c) Repouso: o animal foi observado na posição de repouso, com o corpo apoiado no chão da gaiola. Ainda, foram registradas medidas de: ingestão alimentar (diferença de peso entre a quantidade (g) de comida oferecida e rejeitada durante o período de 1 hora), duração da refeição (minutos que o animal gastará se alimentando), taxa de alimentação (número de calorias ingeridas pela medida do tempo em Kcal/min), tamanho da refeição (quantidade de alimento ingerido por unidade de peso corporal em Kcal/kg de peso corporal) e latência para início da alimentação (em segundos) (HALFORD et al., 1998).

3.8.3 Consumo de alimento doce no corredor alimentar

A avaliação do consumo de alimento palatável (Froot Loops) foi realizada a partir do DPN 99 a 103. Previamente, os animais foram habituados as rosquinhas doces durante 3 dias na caixa moradia e serão submetidos a uma restrição alimentar de 20% do consumo alimentar diário. A restrição alimentar foi realizada nos animais que se alimentavam *ad libitum*, acesso à alimentação no ciclo de 24h, enquanto os animais dos grupos submetidos a ART participaram sem a restrição estabelecida. O teste foi realizado durante 5 dias, sendo que, 4 dias foi determinado como fase de treinamento e o 5º dia foi determinado como o dia teste – a restrição alimentar foi realizada apenas nos primeiros cinco dias de treinamento, no quinto dia os animais participaram do teste alimentados de forma *ad libitum*, sem restrição, e os animais dos grupos do ART seguem o protocolo conforme foi estabelecido. Os animais tiveram ração padrão ou dieta rica em gordura à vontade nas 24 horas anteriores ou 12 horas, conforme a determinação dos protocolos de cada grupo. A quantidade de alimento ingerido, bem como a latência para chegar e provar o alimento, em restrição alimentar e no estado alimentado, foi avaliada durante 3 minutos. O teste foi realizado no início da fase ativa dos animais, às 19h:00min.

3.8.4 Preferência alimentar

O teste foi realizado no DPN 105, dias antes da eutanásia dos animais, com a finalidade de entender melhor a preferência alimentar predominante pelas dietas hiperpalátaveis (hiperglicídica e hiperlipídica) e uma dieta isocalórica (dieta padrão). As três dietas foram ofertadas de forma simultâneas às 19h. Os animais que participaram do teste foram isolados em caixa moradia única, 1 hora antes do teste, às 18h, e as três dietas foram ofertadas na mesma quantidade por um período de 12 horas. Ao final deste período, foi quantificado o consumo (a sobra) das dietas e os animais foram reagrupados aos seus devidos protocolos experimentais. O consumo de cada dieta foi calculado individualmente pela fórmula:

$$IA = OD - SA.$$

Onde, IA: Ingestão alimentar; OD: Oferta da dieta e SA: Sobra alimentar.

A composição da dieta hiperlipídica e isocalórica encontra-se na tabela (1); e na tabela (2) abaixo, a composição da dieta hiperglicídica.

Tabela 2: Composição da dieta hiperglicídica

Ingredientes	Valores em g/kg
Soja	126
Amido	397,8
Sacarose	367,2
Banha de porco	10,9
Óleo de soja	98,1
Mix de vitaminas*	10
Mix de minerais**	40
Lisina	2,5
Metionina	3
Macronutrientes	Valores em kcal/%
Proteína	12,6
Carboidratos	76,5
Lipídeos	10,9
Densidade Calórica (kcal/g)	3,4

Nota: mix de vitaminas* e minerais** baseados nas recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN93-G);

A composição da dieta hiperglicídica foi preparada com base no modelo da composição da dieta hiperlipídica utilizada neste mesmo estudo, os ajustes foram feitos no macronutriente carboidrato, tornando-se uma dieta rica em carboidratos.

3.9 EUTANASIA DOS ANIMAIS

A eutanásia foi realizada no DPN 107, após ao término dos testes comportamentais. Para a realização da análise de imunoconteúdo de proteínas por *Western Blotting*, os animais

foram rapidamente decapitados por guilhotina sem uso de anestesia. Justifica-se este tipo de procedimento pela necessidade de não interferir na liberação de neurotransmissores, evitando comprometer os resultados obtidos. O uso de doses anestésicas prévias à decapitação ou sobredosagem anestésica neste caso alteraria as propriedades intrínsecas e sinápticas das células neurais, o que tornaria inviável as avaliações bioquímicas propostas neste projeto.

Foram excluídos do estudo os animais que não estiverem de acordo com os critérios avaliativos da metodologia, como por exemplo: Animais que de alguma forma apresentaram alguma modificação metabólica que interfira nos resultados da pesquisa. Animais que apresentaram peso inadequado referente ao seu desenvolvimento fisiológico, animais com perda progressiva maior de 20% do peso corporal. Animais que durante o desenvolvimento da pesquisa apresentaram alguma complicação patológica, assim como, perda de animais e/ou tratamento inadequado.

3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.10.1 Preparo das amostras

Para a realização das técnicas de ELISA e *Western Blotting*, o plasma foi coletado, o hipotálamo e o núcleo accumbens foram dissecados e imediatamente congelados a -80°C para posterior utilização conforme cada técnica.

3.10.2 Marcadores inflamatórios

Os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo foram medidos usando kits ELISA da R&D Systems (IL-1 β : Cat. No. DY501, (IL-6: Cat. No. DY506, IL-10: Cat. No. DY522, TNF- α : Cat. No. DY510; Minneapolis, MN, EUA). 100 μL de anticorpo de captura (diluído) foi usado para revestir placas de noventa e seis poços e as placas foram incubadas durante a noite à temperatura ambiente. Após a incubação, cada poço foi lavado com tampão de lavagem e bloqueado com tampão de bloqueio por 1 h. Após a lavagem das placas, 100 μL de amostras ou padrões foram adicionados e incubados por 2 h em temperatura ambiente. A placa foi então incubada à temperatura ambiente por 2 h com 100 μL de anticorpo de detecção em cada poço. Após a incubação, as placas foram lavadas e 100 μL da solução de trabalho de *streptavidina*-HRP foram adicionados, seguidos de 20 min de incubação. Posteriormente, os

poços foram substituídos por 100 µL de solução de substrato e a placa foi incubada por mais 20 min. Finalmente, a solução de parada foi adicionada e o conteúdo da placa foi misturado suavemente. Um leitor de microplacas foi usado para ler a absorbância instantaneamente a 450 nm. Resultados expressos em termos de pg/mg de proteína.

3.10.3 Determinação proteica

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry usando albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951). Concentrações iguais de proteína (40 µg/proteína total), determinadas usando um kit comercial *BCA Protein Assay* (*Thermo Scientific*, EUA).

3.10.4 Parâmetros plasmáticos

Os níveis plasmáticos de leptina foram medidos usando kits de ensaio ELISA (Leptina, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis de glicose foram mensurados em um aparelho de monitor de glicemia portátil *Freestyle Optium Neo* (*Abbott Diabetes Care*, São Paulo, SP, Brasil) com tiras de teste para monitoramento específicas para glicose. Os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram determinados por kits comerciais da Bioclin (Belo Horizonte, Brasil). As amostras foram coletadas após jejum de 12 horas, centrifugadas a 3000 rpm, 4°C e durante 10 minutos para coleta apenas de plasma. Os resultados são apresentados em ng/mL.

3.10.5 Avaliação do imunoconteúdo de proteínas por Western Blotting

A detecção de proteína nas amostras de hipotálamo e núcleo accumbens foi realizada através de imunodeteção (ARCEGO et al., 2016). Foram utilizados anticorpos primários específicos para as seguintes proteínas: receptor para leptina, receptor para dopamina do tipo 2 e tirosina hidroxilase. Também foram utilizados anticorpos secundários específicos (anti-camundongo ou anti-coelho, conforme o anticorpo primário utilizado) ligados à peroxidase, os quais foram incubados com a proteína ligada ao anticorpo primário na sequência. A imunorreatividade foi detectada pela emissão de luz por quimioluminescência (ECL - *enhanced luminol-based chemiluminescent substrate*), usando um detector de imagem digital (*Image Quant LAS 4000 GE Healthcare Life Sciences*). Os blots foram quantificados por

análise de densitometria através do programa de análise de imagem *ImageJ software* (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa SPSS *Statistics 22.0* e representados em gráficos através do programa Prisma 5. Os dados paramétricos com distribuição normal serão analisados por *Teste-t de Student*, Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (dieta e jejum intermitente) ou medidas repetidas, utilizando o post-hoc de *Tukey* para ANOVA quando indicado. Para análises de Medidas Repetidas a correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada quando necessário (considerando a violação da suposição de esfericidade, como mostra o teste de *Mauchly*). Já para os dados não paramétricos foi utilizado o Teste de *Kruskal-Wallis* seguido do *test-post-hoc de Bonferroni* quando indicado. Os valores foram representados através de média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os níveis de significância foram aceitos como diferentes quando o valor de p for menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO ALTERA O CONSUMO ALIMENTAR E O PESO CORPORAL DOS ANIMAIS INDUZIDOS À OBESIDADE POR UMA DIETA

Na fase de indução à obesidade os animais aumentaram o consumo alimentar ao longo do tempo tanto em gramas (F [5,50] = 110,816, $p < 0,001$; Figura 2B) quanto em calorias (F [3,36;50] = 123,335, $p < 0,01$; correção para *Greenhouse-Geisser*; Figura 2A). Não houve diferenças significativas entre os grupos estudados $P > 0,05$. Após à fase de indução, os animais foram submetidos à intervenção dietética ou não da alimentação com restrição de tempo. Nessa fase houve também um efeito do tempo sobre o consumo alimentar em gramas (F [3,24] = 18,313, $p < 0,01$; Figura 2B) e, em calorias (F [3,24] = 16,485, $p < 0,01$; Figura 2A) dos animais. Adicionalmente, houve uma interessante interação entre os fatores (tempo x dieta x jejum), indicando que o protocolo da ART foi capaz de reduzir o consumo alimentar dos animais que receberam dieta rica em gordura. Esse efeito foi observado tanto no consumo

alimentar em gramas ($F [3,24] = 3,040$, $p < 0,05$; Figura 2B) quanto no consumo alimentar em calorias ($F [3,24] = 4,503$, $p < 0,02$; Figura 2A).

Com relação ao peso corporal, avaliado durante à fase de indução, foi observado apenas que os animais aumentaram o peso corporal ao longo do tempo ($F [2,620; 180] = 2338,91$, $p < 0,001$; correção para *Greenhouse-Geisser*; Figura 2C). Durante o protocolo da ART foi possível observar um efeito do tempo ($F [1,619;84] = 138,824$, $p < 0,001$; correção para *Greenhouse-Geisser*; Figura 2C), indicando que os animais continuaram se desenvolvendo e aumentando o peso corporal ao longo do tempo. Também houve um efeito do grupo DIO aumentando o peso corporal ao longo do tempo ($F [1,619;84] = 10,433$, $p < 0,001$; correção para *Greenhouse-Geisser*; Figura 2C). Outro resultado importante para o nosso estudo foi evidenciado por uma interação entre os fatores (tempo x dieta x jejum), indicando que os animais que consumiram uma dieta rica em gordura e passaram pelo protocolo da ART reduziram o peso corporal ao longo do tempo ($F [1,619;84] = 5,005$, $p=0,016$; correção para *Greenhouse-Geisser*; Figura 2C).

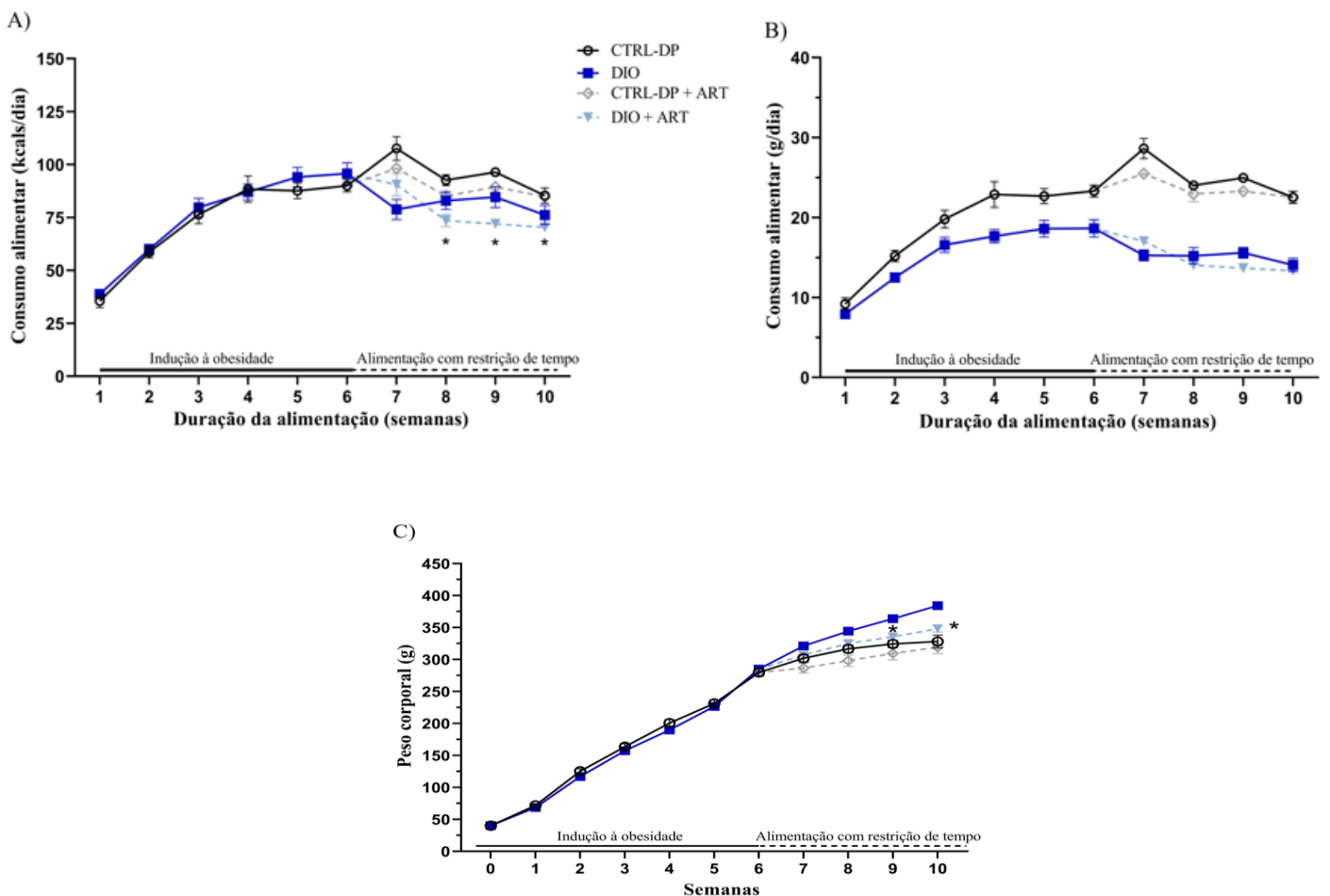


Figura 2. A alimentação com restrição de tempo altera o consumo alimentar e o peso corporal dos animais induzidos à obesidade por uma dieta. (A) Ingestão calórica (kcal/dia) durante à fase de indução à obesidade (0 a 6 semanas, n=6) e submetidos ou não à intervenção da alimentação com restrição de tempo (7 a 10 semanas, n=3/grupos); (B) Ingestão calórica (g/dia) durante à fase de indução à obesidade (0 a 6 semanas, n=6) e submetidos ou não à intervenção da alimentação com restrição de tempo (7 a 10 semanas, n=3); (C) Peso corporal durante à fase de indução à obesidade (0 a 6 semanas, n=16) e submetidos ou não à intervenção da alimentação com restrição de tempo (7 a 10 semanas, n=8). Dados calculados e expresso em média \pm EPM e analisados estatisticamente pela ANOVA de medidas repetitivas. O nível de significância estabelecido para o teste foi $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo DIO. Controle dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); Obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART).

4.2 AS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS AUMENTARAM AO LONGO DO TEMPO COM O CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM GORDURA

As medidas murinométricas foram avaliadas durante todo desenvolvimento experimental. Na primeira etapa do estudo, considerada fase de indução à obesidade foi verificado alguns parâmetros murinométricos nos animais. Aos 30 dias de vida pós-natal os animais não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros murinométricos avaliados ($P > 0,05$, Tabela 3). No entanto, ainda na fase de indução, os animais com 60 dias de vida pós-natal que receberam dieta rica em gordura aumentaram a circunferência abdominal [$t(30) = 0,438$, $p < 0,01$; Tabela 3]. Após o protocolo do jejum, aos 90 dias de idade pós-natal, o grupo DIO apresentou um maior ganho de peso ($F[1,28] = 11,440$, $p = 0,02$, Tabela 4), aumentou a circunferência abdominal ($F[1,28] = 5,653$, $p = 0,02$, Tabela 4), a gordura total ($F[1,27] = 18,903$, $p < 0,01$, Tabela 4) e o índice de adiposidade ($F[1,27] = 24,311$, $p < 0,01$, Tabela 4). Interessante foi observar que o grupo DIO +ART apresentou menor índice de massa muscular em relação ao grupo CTRL-DP +ART ($F[1,27] = 8,320$, $p < 0,01$, Tabela 4). Com relação aos efeitos da ART, foi possível observar uma redução da circunferência abdominal ($F[1,28] = 66,163$, $p < 0,01$, Tabela 4) e da circunferência torácica ($F[1,28] = 6,684$, $p = 0,015$, Tabela 4).

Tabela 3: Mensuração dos parâmetros murinométricas ao longo da fase de indução à obesidade nos períodos pós-natal 30 e 60.

PARÂMENTROS	FASE DE INDUÇÃO À OBESIDADE	
	DIA PÓS-NATAL	
	30	60

	CTRL-DP	DIO	CTRL-DP	DIO
GP (g/kg)	31,68 ± 1,33	28,37 ± 1,54	239,68 ± 5,16	244,87 ± 5,37
CC (cm)	14,06 ± 0,16	13,56 ± 0,22	21,28 ± 0,14	21,43 ± 0,15
CA (cm)	10,84 ± 0,12	10,63 ± 0,14	15,81 ± 0,19	18,78 ± 0,23 [#]
CT (cm)	9,12 ± 0,17	9,12 ± 0,15	13,53 ± 0,17	13,75 ± 0,18

Legenda: Dados calculados e expressos em média ± erro padrão da média e analisados estatisticamente por Teste t de Student. O nível de significância estabelecido para o teste foi de $p < 0,05$. ([#]) $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTRL-DP. Ganho de peso (GP); Comprimento corporal (CC); Circunferência Abdominal (CA); Circunferência Torácica (CT). Dia pós-natal (DPN); controle dieta padrão (CTRL-DP) (n=16); Obesidade induzida por dieta (DIO) (n=16).

Tabela 4: Mensuração dos parâmetros murinométricos ao final da intervenção da alimentação com restrição tempo, dia pós-natal 90.

INTERVENÇÃO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO TEMPO

PARÂMETROS	DIA PÓS-NATAL 90			
	CTRL-DP	DIO	CTRL-DP + ART	DIO + ART
GP (g/kg)	45,87 ± 10,20	89,87 ± 3,26 [#]	41,87 ± 17,97	72,25 ± 6,74 [#]
CC (cm)	22 ± 0,36	22,50 ± 0,37	21,37 ± 0,45	22,12 ± 0,40
CA (cm)	19,37 ± 0,26	20,00 ± 0,26	17,37 ± 0,26 [#]	17,93 ± 0,19 [#]
CT (cm)	16,12 ± 0,39	16,37 ± 0,41	14,68 ± 0,36 [#]	15,62 ± 0,49 [#]
GT (g)	12,73 ± 1,63	21,58 ± 4,09 [#]	10,10 ± 1,05	21,00 ± 1,63 [#]
IA (%)	3,75 ± 0,40	6,14 ± 1,03 [#]	2,95 ± 0,24	5,83 ± 0,32 [#]
IMM (%)	1,25 ± 0,40	1,20 ± 0,39	1,31 ± 0,39	1,15 ± 0,21 [‡]

Legenda: Dados calculados e expressos em média ± erro padrão da média e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias seguido de teste *post-hoc de tukey* quando indicado. O nível de significância estabelecido para o teste foi $p < 0,05$.

Controle dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); Obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART) (n=8). Ganho de peso (GP); Comprimento corporal (CC); Circunferência abdominal (CA); Circunferência torácica (CT); Gordura total (GT); Índice de adiposidade (IA); Índice de massa muscular (IMM).

4.3 A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICA A SEQUÊNCIA DE SACIEDADE DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM DIETA RICA EM GORDURA

A sequência à saciedade é avaliada considerando quatro parâmetros: alimentação, *grooming*, exploração e descanso. A saciedade comportamental é obtida quando ocorre um ponto de transição entre comportamento de alimentação para descanso. Ao final da refeição, é esperado que os ratos se engajem no comportamento de limpeza e exploração por um curto período de tempo, e, em seguida, deve ocorrer o descanso. Quando presentes nesta sequência, é possível perceber o disparo da saciedade. O grupo controle apresentou uma saciedade comportamental, com transição entre alimentação e descanso entre os 35 a 40 minutos, enquanto o grupo com acesso à DRG demonstrou uma saciedade mais antecipada, entre os 15 e 20 minutos de experimento. Aos 5 (F [1,24] = 7,77, p = 0,010, Figura 3), 10 (F [1,24] = 36,21, p < 0,001, Figura 3), 15 (F [1,24] = 20,55, p < 0,001, Figura 3), 20 (F [1,24] = 71,87, p < 0,001, Figura 3) e 25 minutos (F [1,24] = 5,45, p = 0,028, Figura 3) houve um efeito da dieta em relação à alimentação, demonstrando que animais com acesso à DRG consumiram menos e por um tempo menor. Os animais controles que passaram pelo protocolo da alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART) apresentaram uma sequência à saciedade semelhante ao grupo CTRL-DP, ocorrendo por volta dos 35 minutos. Já o grupo DIO-ART (animais que consumiram uma DRG e foram submetidos a alimentação com restrição de tempo) demonstrou uma sequência à saciedade mais tardia em relação ao grupo DIO por volta dos 35 minutos. Estes dados demonstram que a manipulação dietética realizada não interrompe a sequência comportamental de saciedade, apenas antecipa ou retarda, e provoca mudanças no tempo gasto nas atividades de descanso e, principalmente, de alimentação. Parâmetros microestruturais da alimentação como taxa de alimentação e tamanho e duração da refeição também foram avaliados neste texto. O grupo DIO diminuiu a duração da refeição (F [1,28] = 13,459, p=0,001, Tabela 5), demonstrando que os animais que consumiram uma DRG passaram menos tempo se alimentando. Também foi observado um efeito da DRG aumentando a taxa de alimentação (F [1,28] = 6,508, p<0,02, Tabela 5), uma vez que consomem por menos tempo uma refeição mais calórica.

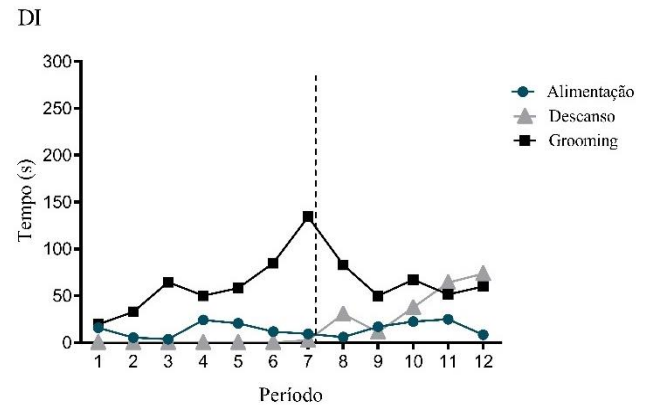
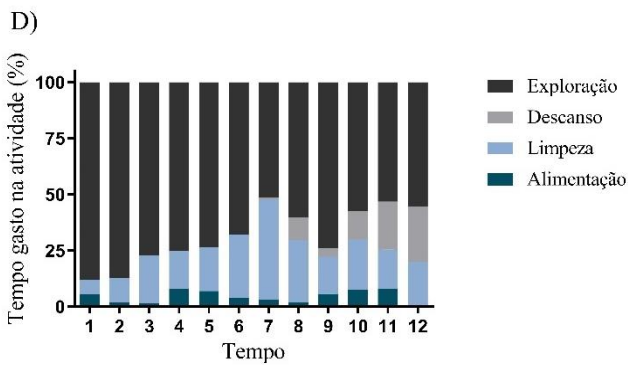
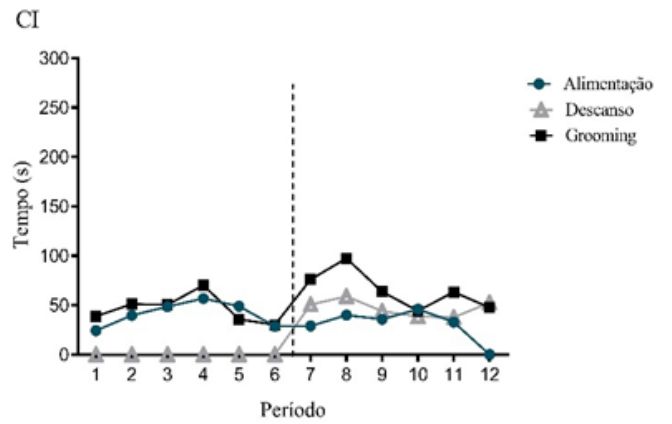
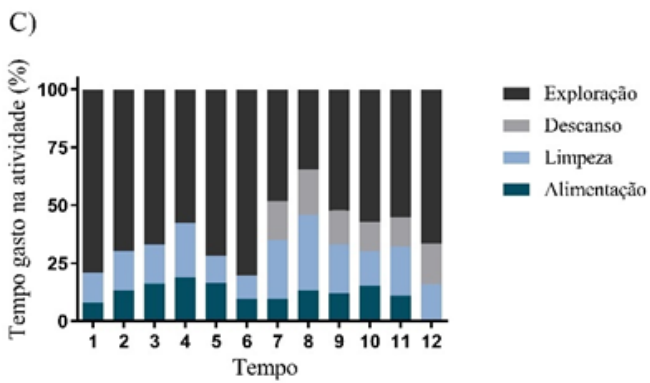
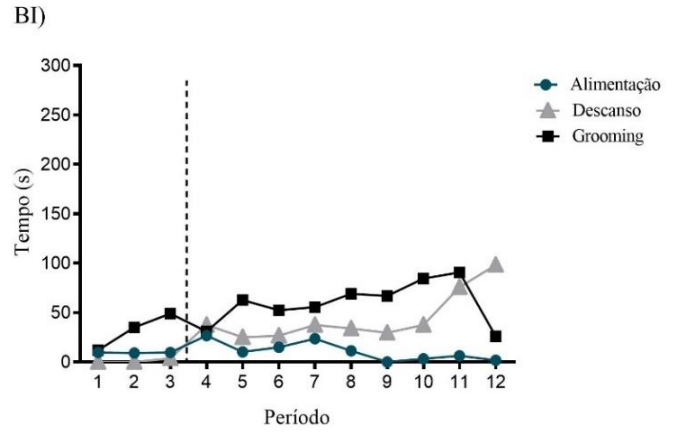
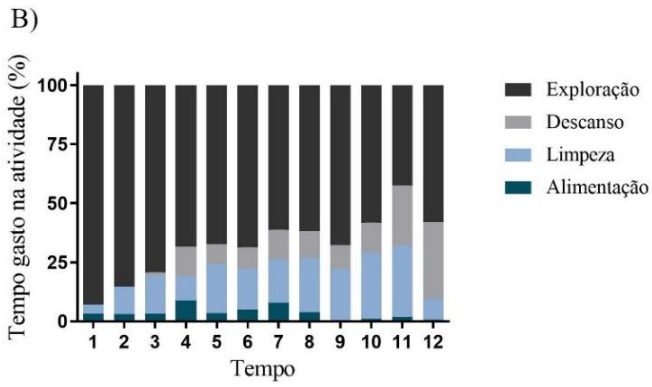
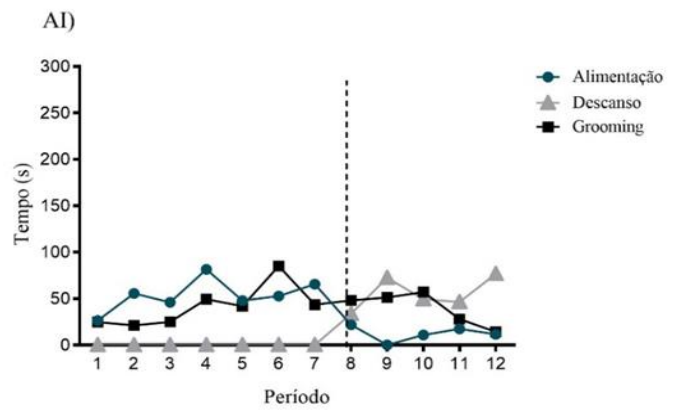
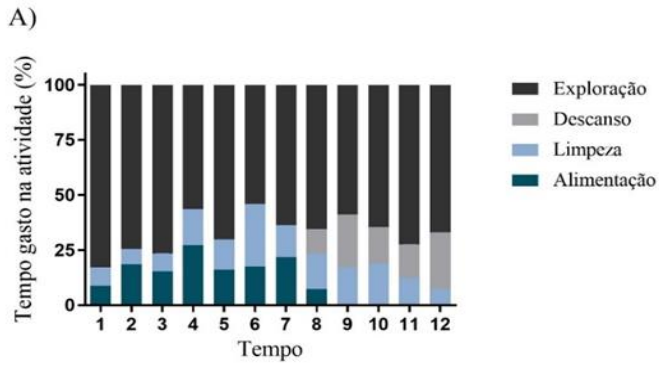


Figura 3: A alimentação com restrição de tempo modifica a sequência de saciedade dos animais que receberam dieta rica em gordura. O teste é apresentado em uma escala observacional em 12 períodos, intercalados por um determinado tempo de 5 minutos. As barras representam as observações comportamentais, expresso em porcentagem de atividades, determinadas em cada intervalo de tempo por período. **(A)** Grupo controle dieta padrão (CTRL-DP); **(B)** Grupo obesidade induzida por dieta (DIO); **(C)** Grupo controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); **(D)** Grupo Obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART) (n=8).

Nota: Os gráficos de linhas representam os mesmos dados expressos nos gráficos de barras, numa determinada escala de tempo (em segundos) por período, correspondentes aos comportamentos observados nos animais (Alimentação, Descanso e *Grooming*). A linhas vertical pontilhada, representa o ponto de transição entre os comportamentos alimentação e descanso. **(AI)** Grupo controle dieta padrão (CTRL-DP); **(BI)** Grupo obesidade induzida por dieta (DIO); **(CI)** Grupo controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); **(DI)** Grupo obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART). Dados calculados e expresso em média \pm erro padrão e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias. O nível de significância estabelecido para o teste foi $p < 0,05$.

Tabela 5: Parâmetro microestrutural da refeição dos animais submetidos ou não à alimentação com restrição de tempo.

PARÂMETROS	GRUPOS			
	CTRL-DP	DIO	CTRL-DP + ART	DIO + ART
Tamanho da refeição (kcal/kg de peso) x 100	6,15 \pm 0,55	5,26 \pm 0,82	6,33 \pm 1,12	5,92 \pm 1,07
Duração da refeição (min)	7,28 \pm 1,66	2,11 \pm 0,77 [#]	7,18 \pm 1,70	2,82 \pm 0,68 [#]
Taxa de alimentação (kcal/min)	5,13 \pm 1,80	14,11 \pm 3,79 [#]	5,37 \pm 1,98	9,73 \pm 2,39 [#]

Legenda: Dados calculados e expresso em média \pm erro padrão e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias. O nível de significância estabelecido para o teste foi $p < 0,05$. ([#]) $p < 0,05$ em comparação com os grupos CTRL-DP e CTRL-DP + ART. Grupo controle dieta padrão (CTRL-DP); Grupo obesidade induzida por dieta (DIO); Grupo controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); Grupo obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART) (n=8).

4.4 A DIETA RICA EM GORDURA E O PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICAM A BUSCA PELO ALIMENTO DOCE

A tarefa do corredor alimentar é dividida em 2 sessões de treino e teste. Durante o treino os animais estão em restrição alimentar enquanto no dia do teste os animais estão previamente alimentados. Durante o treino, houve efeito do tempo na latência para começar a comer ($F [3,84] = 31,752$, $p < 0,01$; Figura 4B), indicando que ao longo do tempo todos os grupos apresentaram uma latência menor para começar a comer as rosquinhas doces. Com

relação à quantidade de rosquinhas consumidas foi observado um efeito do tempo ($F [3,84] = 20,398$, $p < 0,001$; Figura 4C) que mostrou que todos os animais consumiram mais ao longo dos dias. No dia do teste, houve um efeito do grupo DIO ($F [1,28] = 5,621$, $p = 0,025$; Figura 4E), e do grupo DIO + ART ($F [1,28] = 13,041$, $p < 0,001$; Figura 4E), aumentando a latência para começar a comer o alimento doce. O grupo DIO também consumiu menos esse alimento ($F [1,28] = 15,480$, $p < 0,001$; Figura 4F). Com relação à atividade locomotora não houve diferenças significativas entre os grupos estudados $P > 0,005$, Figura 4G).

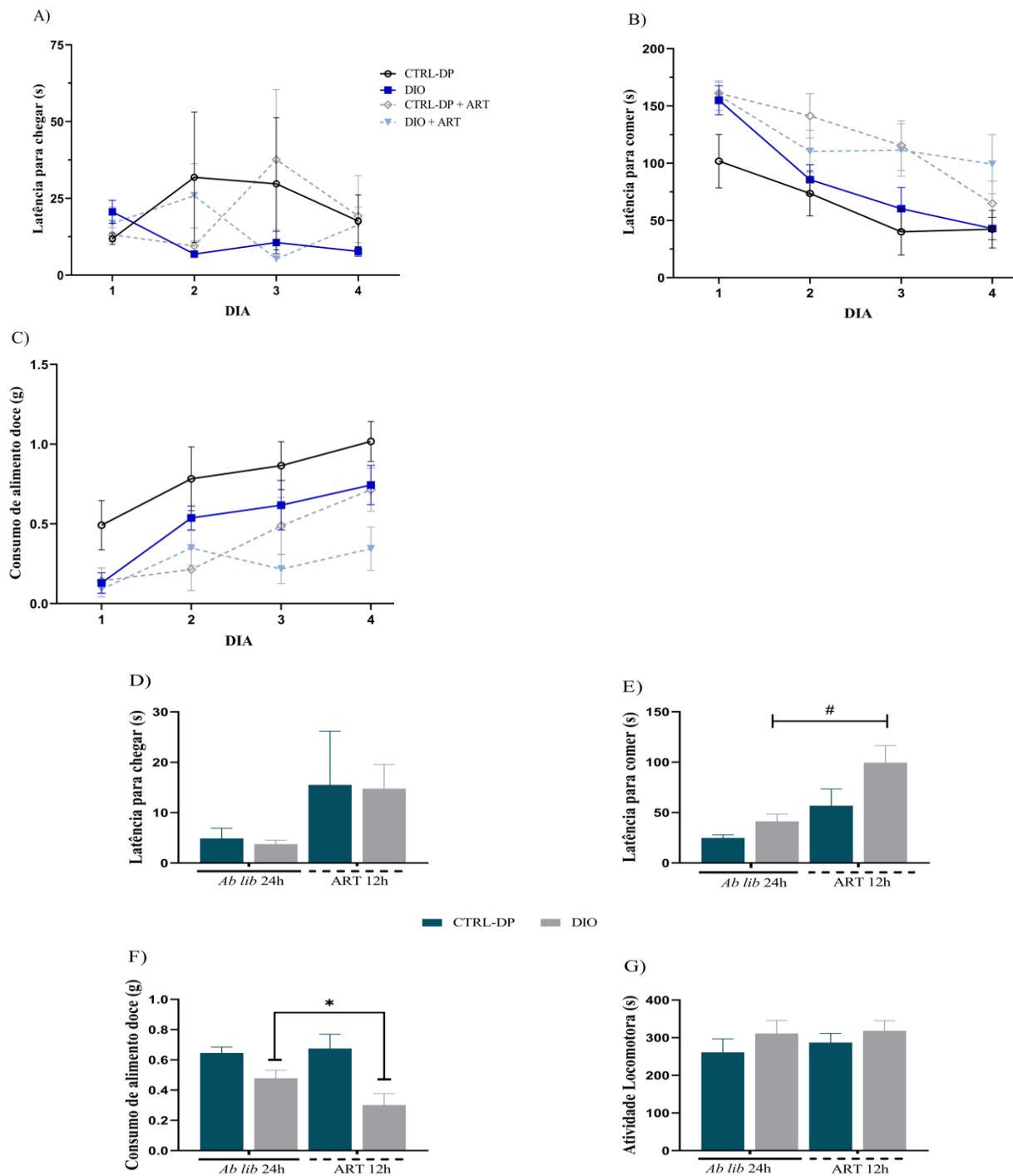


Figura 4: A dieta rica em gordura e o protocolo da alimentação com restrição de tempo modificam a busca pelo alimento doce. Os gráficos A, B e C são resultados expressos do treinamento (dia 1 ao dia 4). (A) Latência para chegar; (B) Latência para comer; (C) Consumo de alimento doce. Os gráficos D, F e G são os resultados expressos do dia do teste (dia 5). (D) Latência para chegar; (E) Latência para comer; (F) Consumo alimento doce; (G) Atividade locomotora (n=8). Dados calculados e expressos em média \pm erro padrão e analisados estatisticamente pela ANOVA de medidas repetitivas no treino e Anova de duas vias no dia do Teste. O nível de significância estabelecido para o teste foi de $p < 0,05$. (#) $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTRL-DP; (*) $p < 0,001$ em comparação ao grupo DIO + ART. Controle dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Alimentação com restrição de tempo 12h (ART 12h); *ad libitum* 24h (acesso livre 24h).

4.5 DIETA RICA EM GORDURA INDUZ A PREFERÊNCIA PARA CONSUMIR ALIMENTOS GORDUROSOS ENQUANTO A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO AUMENTA A PREFERÊNCIA PELO CONSUMO DE ALIMENTOS RICOS EM AÇÚCAR

Na tarefa de preferência alimentar foi observado que o grupo DIO mostrou preferência pela dieta rica em gordura [$\chi^2(3) = 16,559$, $p < 0,01$, Figura 5B], indicando um menor consumo na dieta rica em açúcar e na dieta padrão isocalórica. Já os animais do grupo controle dieta padrão (CTRL-DP) submetido ou não ao protocolo da alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART), preferiram consumir uma dieta rica em açúcar [$\chi^2(3) = 22,85$, $p < 0,01$, Figura 5A].

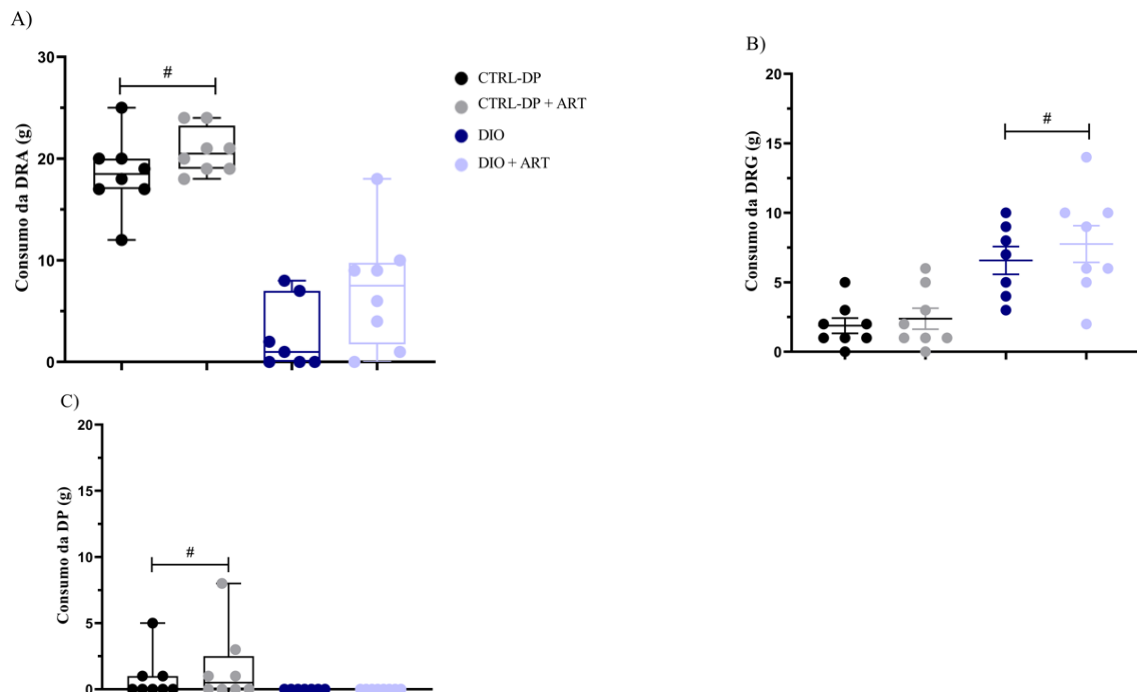


Figura 5: Dieta rica em gordura induz a preferência para consumir alimentos gordurosos enquanto a alimentação com restrição de tempo aumenta a preferência pelo consumo de alimentos ricos em açúcar. (A) Consumo da dieta rica em açúcar; (B) Consumo da dieta rica em gordura; (C) Consumo da dieta padrão (n=8). Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis*, seguido de *Bonferroni*. (#) $p < 0,01$ em comparação entre os grupos (CTRL-DP vs DIO e CTRL-DP vs DIO + ART). Controle de dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Controle de dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); Obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART).

4.6 O CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM GORDURA SUBMETIDO OU NÃO AO PROTOCOLO DA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO MODIFICAM PARÂMETROS METABÓLICOS

Na fase de indução à obesidade (por volta dos 60 dias de vida pós-natal), o grupo DIO aumentou os níveis sanguíneos de glicose [$t(30) = 2,783$, $p < 0,01$; Figura 6A). Após o protocolo da ART, DPN-90, os níveis glicêmicos do grupo DIO ainda permaneceram elevados ($F[1,30] = 5,556$, $p = 0,026$; Figura 6B). Também foi possível verificar que a ART induziu um aumento nos níveis de glicose sanguínea ($F[1,30] = 23,569$, $p = 0,01$; Figura 6B). Ao término dessa fase experimental, foi verificado os níveis plasmáticos de leptina, triglicerídeos e colesterol nos animais. Os resultados mostraram que o grupo DIO aumentou os níveis plasmáticos de triglicerídeos ($F[1,16] = 16,223$, $p < 0,001$) e leptina ($F[1,16] = 10,949$, $p < 0,01$), (Tabela 6). Enquanto os grupos submetidos a ART diminuíram os níveis de colesterol ($F[1,16] = 10,949$, $p < 0,01$) e de leptina ($F[1,16] = 13,530$, $p = 0,002$) no plasma dos animais (Tabela 6).

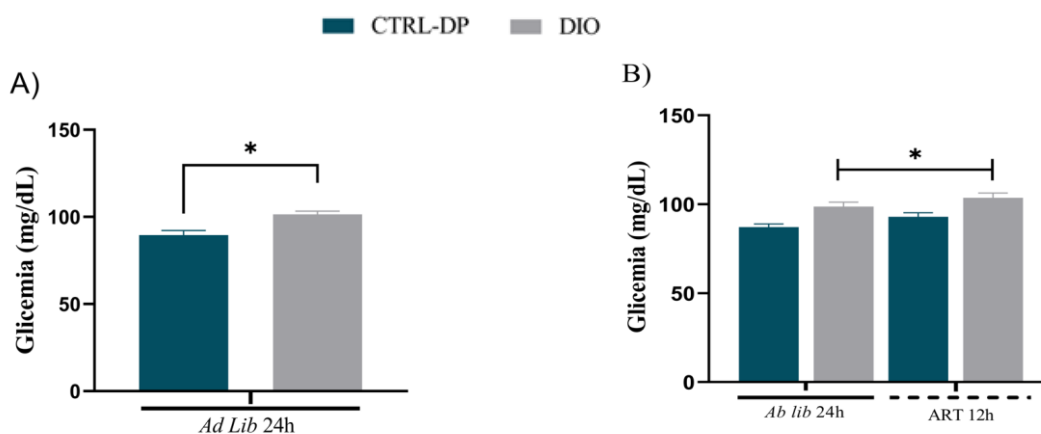


Figura 6: O consumo de uma dieta rica em gordura submetido ou não ao protocolo da alimentação com restrição de tempo modificam parâmetros metabólicos. (A) Glicemia de jejum (n=16), DPN 60; (B) Glicemia

de jejum (n=8), DPN 90. A glicemia de jejum foi mensurada em dois momentos do estudo, após ao final da fase de indução à obesidade (DPN-60) e, posteriormente, ao final do protocolo da alimentação com restrição de tempo (DPN 90). Dados calculados e expressos em média \pm EPM e analisados estatisticamente pelo *Test-t student* para a fase de indução e na fase do jejum, ANOVA de duas vias, seguida do teste post-hoc de *Tukey* quando indicado. O nível de significância estabelecido para o teste foi de $p < 0,05$. (*) em comparação entre os grupos (DIO vs CTRL-DP) e (DIO vs DIO + ART). Controle de dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Alimentação com restrição de tempo 12h (ART 12h); *ad libitum* 24h (acesso livre 24h).

Tabela 6: Mensuração plasmática de marcadores bioquímicos nos animais submetidos ou não à intervenção da alimentação com restrição de tempo.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS			
	DP	DIO	DP + ART	DIO + ART
Triglicerídeos (mg/dL)	34,72 \pm 1,80	49 \pm 3,39 [#]	34,68 \pm 1,86	43,93 \pm 4,22 [#]
Colesterol (mg/dL)	39,11 \pm 2,02	41,15 \pm 3,75	31,06 \pm 2,44 [#]	31,04 \pm 2,44 [#]
Leptina (mg/dL)	1262,84 \pm 171,30	3952,40 \pm 719,19 [#]	563,42 \pm 66,93	1894,60 \pm 104,14

Legenda: Os parâmetros bioquímicos foram analisados após a intervenção da ART. Dados calculados e expressos em média \pm EPM e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de *Tukey*. O nível de significância estabelecido para o teste foi de $p < 0,05$. ([#]) $p < 0,05$ em comparação entre os grupos (DIO vs DIO + ART), (CTRL-DP vs CTRL-DP + ART); ([°]) $p < 0,01$ diferente de todos os grupos. Controle dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Controle dieta padrão submetido à alimentação com restrição de tempo (CTRL-DP + ART); Obesidade induzida por dieta submetido à alimentação com restrição de tempo (DIO + ART) (n=8).

4.7 A ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO AUMENTA OS NÍVEIS DE CITOCINAS NO HIPOTÁLAMO

Com relação aos marcadores inflamatórios no hipotálamo foi observado uma interação entre os dois fatores (Dieta x Jejum) na citocina IL-6 (F [1,11] = 6,387, $p=0,028$; Figura 7A), indicando que os grupos DIO e ART aumentaram a quantidade dessa citocina, mas quando os fatores estavam juntos houve uma redução (DIO + ART). A ART também promoveu o aumento das citocinas IL1- β (F [1,13] = 8,204, $p=0,013$; Figura 7B) e TNF- α (F [1,10] = 8,349, $p=0,016$; Figura 7C) no hipotálamo dos animais.

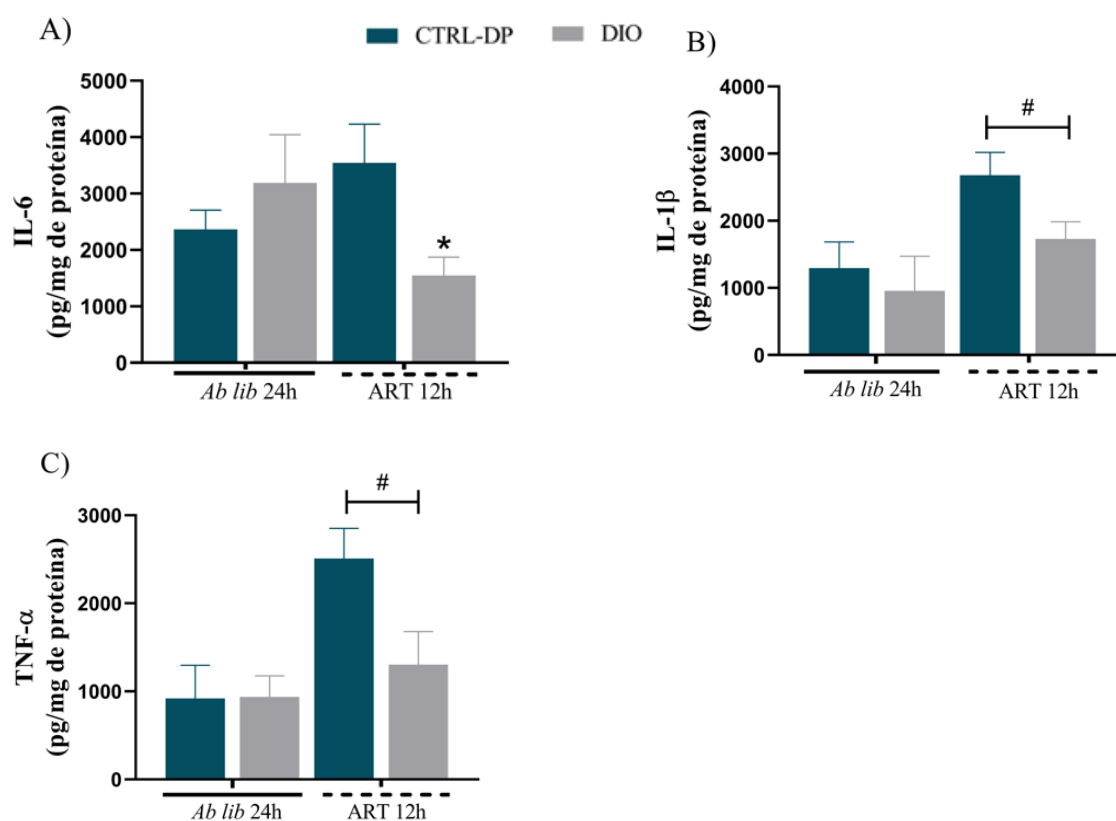


Figura 7: A alimentação com restrição de tempo aumenta os níveis de citocinas no hipotálamo.

(A) Expressão de IL-6 no hipotálamo (n=3-4); (B) Expressão de IL-1-β no hipotálamo (n=4-5); (C) Expressão de TNF-α no hipotálamo (n=3-4). Dados calculados e expresso em média ± EPM e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias seguido com o pós-teste Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste foi $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo DIO; (#) $p < 0,05$ ART 12h vs *ad lib* 24h. Controle de dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Alimentação com restrição de tempo 12h (ART 12h); *ad libitum* 24h (acesso livre 24h).

4.8 MARCADORES ENVOLVIDOS COM O CONTROLE DO APETITE SÃO ALTERADOS PELA DIETA RICA EM GORDURA E PELA ALIMENTAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE TEMPO

Uma interação entre os dois fatores (Dieta x Jejum) foi observada no imunocontéudo do receptor de dopamina do tipo D2 ($F [1,16] = 5,116$, $p=0,038$; Figura 8A). Essa interação indicou que o grupo DIO reduziu o imunocontéudo do receptor, mas quando associado a ART houve um aumento, mas sem chegar nos níveis do grupo controle. O grupo DIO também apresentou uma redução no imunocontéudo da proteína tirosina hidroxilase ($F [1,11] = 5,109$, $p=0,045$; Figura 8B). No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados no imunocontéudo do receptor de leptina (Figura 8C).

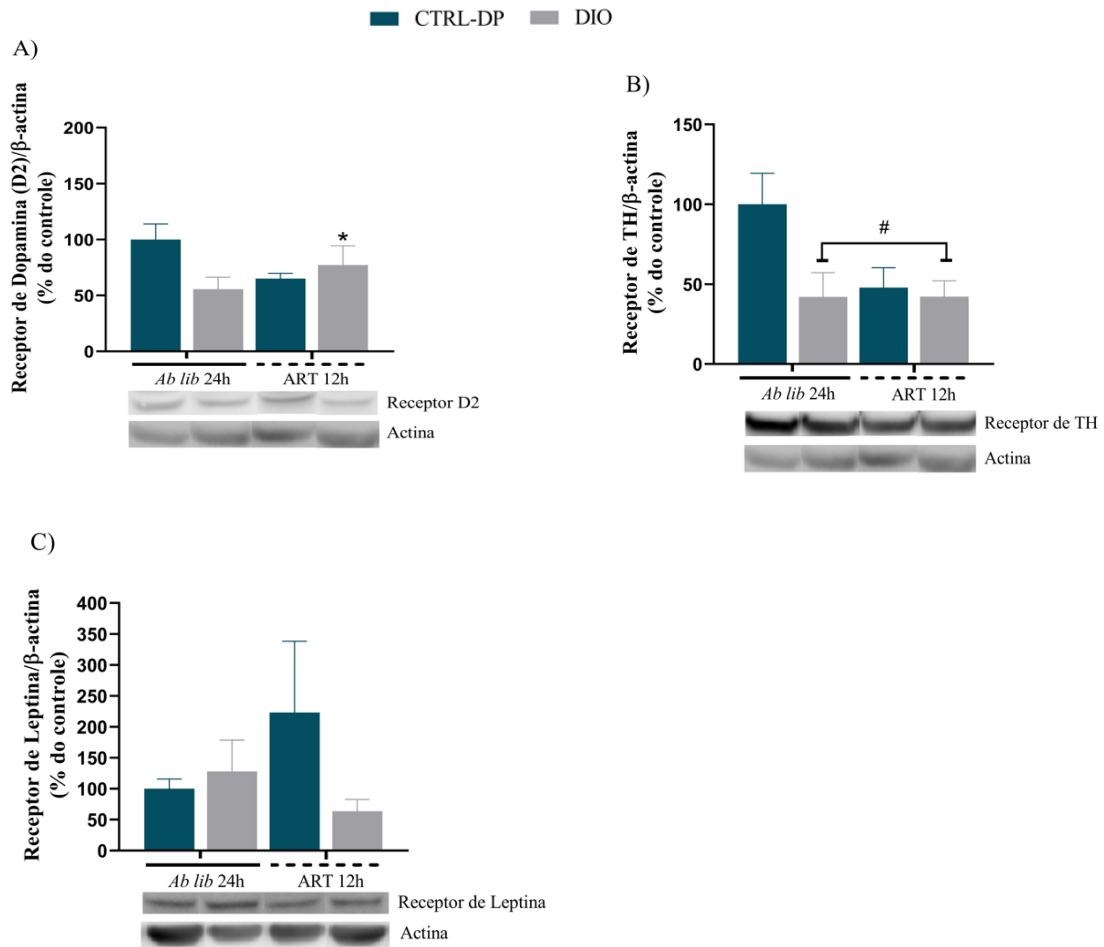


Figura 8: Marcadores envolvidos com o controle do apetite são alterados pela dieta rica em gordura e pela alimentação com restrição de tempo. (A) Imunconteúdo do receptor de dopamina D2 (n=5); (B) Imunconteúdo do receptor de tirosina hidroxilase TH (n=3-4); (C) Imunconteúdo do receptor de leptina (n=5). Dados calculados e expressos em média \pm EPM e analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias seguido com o teste de pós-hoc Turkey. O nível de significância estabelecido para o teste foi de $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo DIO; (#) $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTRL-DP. Controle de dieta padrão (CTRL-DP); Obesidade induzida por dieta (DIO); Alimentação com restrição de tempo 12h (ART 12h); *ad libitum* 24h (acesso livre 24h).

PARTE III

5. DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica que afeta bilhões de pessoas no mundo e pode desencadear um aumento de complicações na saúde da população, incluindo diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas, neurodegeneração entre outras (TSAI et al., 2013; BRUNING, 2000; WANG et al., 2001). Estudos em humanos mostram que o tratamento e prevenção da obesidade é baseado no controle do peso corporal e na redução da adiposidade (DAVIS, 2004). Nesse sentido, os profissionais da área da saúde, assim como, os pesquisadores buscam estratégias farmacológicas e não farmacológicas que visam prevenir o desenvolvimento de patologias relacionadas à obesidade. No nosso estudo, buscamos, através de uma estratégia não farmacológica, compreender e reverter os efeitos metabólicos e comportamentais induzidos por um consumo crônico de uma dieta rica em gordura saturada. Assim, investigamos os efeitos da alimentação por restrição de tempo, um protocolo de jejum intermitente, sobre os efeitos induzidos por uma dieta rica em gordura saturada oferecida *ad libitum* para os animais. A prática do jejum intermitente, como uma estratégia nutricional, ganhou grande visibilidade na população nos últimos anos, reforçando o nosso interesse de compreender os efeitos da alimentação por restrição de tempo sobre o comportamento alimentar homeostático e hedônico em ratos obesos induzido por uma dieta.

O nosso primeiro questionamento era se uma dieta com 42% de gordura saturada oferecida ao longo do desenvolvimento já seria capaz de induzir um fenótipo de obesidade nos animais na idade adulta. Nessa etapa do estudo nós chamamos de fase de indução à obesidade. Os resultados do presente estudo mostraram que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura foi capaz de induzir obesidade nos ratos adultos. A confirmação desse fenótipo foi obtida por alteração no peso corporal, em medidas murinométricas, e em parâmetros metabólicos. Os animais apresentaram maior peso corporal ao longo do tempo, acumularam mais gordura abdominal, apresentaram maior circunferência abdominal e consequentemente maior índice de adiposidade. Ao longo do protocolo experimental também foi possível verificar aumento da glicemia. A dieta rica em gordura também foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de triglicerídeos e de leptina. Estudos mostraram que para avaliar a obesidade em roedores é importante encontrar alterações em alguns parâmetros tais como: peso corporal, gordura total, concentração plasmática hormonal, glicemia, perfil lipídico, saúde hepática e inflamação (BRUNING et al., 2000; WANG et al., 2001; SUNDARAM; YAN, 2016; BUETTNER; SCHÖLMEIRICH; BOLLHEIMER, 2007). Os

nossos resultados apresentaram vários parâmetros alterados pelo uso da dieta gordurosa *ad libitum*, indicando que o tempo de protocolo, o tipo, a quantidade de gordura e oferta por 24 horas na caixa-moradia foram eficientes para induzir o fenótipo obeso nos animais na idade adulta.

Os animais submetidos cronicamente a uma dieta rica em gordura saturada apresentaram altos níveis plasmáticos de leptina, aumento do peso corporal, acúmulo de gordura total (mesentérica, epididimal e gonadal) sem redução do consumo calórico ao longo do tempo. O hormônio leptina é expresso nos adipócitos como um sinal de adiposidade, e os níveis de leptina no plasma e no tecido adiposo é paralelo a massa do tecido adiposo (FRIEDMAN, 2019). Além disso, esse hormônio age no hipotálamo em receptores específicos (por exemplo: OBRb) em distintas populações de neurônios para reduzir o apetite, aumentar o gasto energético e agir como um sinal de saciedade (KWON; KIM; KIM, 2016; FRIEDMAN, 2019). No entanto, quando ocorre um aumento nos níveis de leptina circulantes sem a prevenção do ganho de peso, é possível que possa estar ocorrendo resistência aos sinais mediados pelo hormônio leptina (KWON; KIM; KIM, 2016; FRIEDMAN, 2019). Baseado nesse contexto, é possível que os animais do grupo DIO estejam apresentando resistência à leptina, um fator também observado no fenótipo da obesidade.

Um outro resultado do nosso estudo relevante para a discussão foi sobre o consumo calórico dos animais. O grupo DIO não consumiu mais calorias em relação ao grupo controle com dieta padrão de biotério ao longo do tempo. Sabe-se que o excesso de calorias é importante para o desenvolvimento da obesidade (KOHSAK et al., 2007), mas dietas ricas em gordura saturada tem alta densidade calórica e uma grande capacidade de induzir à saciedade, que pode reduzir o consumo alimentar. No entanto, um menor consumo calórico deste tipo de dieta, já é capaz de aumentar o peso corporal e acumular gordura total nos animais (DUNCAN et al., 2016. KOHSAK et al., 2007). Os nossos resultados estão de acordo com esses estudos, uma vez que não observamos um aumento do consumo calórico, mas os animais aumentaram o peso corporal ao longo do tempo e o acúmulo de gordura total.

O consumo crônico de uma dieta com alto teor de gordura *ad libitum* altera expressivamente vários marcadores plasmáticos que atuam na regulação da homeostase energética (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). Sendo assim, propomos investigar se a alimentação com restrição de tempo durante a fase ativa dos animais (onde foi programado o acesso livre à alimentação, 19h:00min a 07h:00min, e a privação do consumo alimentar, 07h:00min 19h:00min), seria capaz de melhorar esses parâmetros metabólicos que foram alterados pelo consumo crônico de uma dieta com alto teor de gordura saturada. Os

diferentes protocolos de ART têm demonstrados por diversos estudos que o jejum intermitente pode ser uma estratégia não farmacológica eficiente que protege contra disfunções metabólicas relacionadas à obesidade (HATORI et al., 2012; SHERMAN et al., 2012; SHI et al., 2013; CHAIX et al., 2014; CHUNG et al., 2016; DELAHAYE et al., 2018). O grande benefício do protocolo de ART é na reorganização do padrão alimentar circadiano, em uma melhor adaptação metabólica no controle homeostático e na prevenção ou manutenção da obesidade (LONGO; MATTSON, 2014). Os nossos principais resultados mostraram que a alimentação com restrição apenas na fase ativa/escuro (por 12h) foi capaz de reduzir a circunferência abdominal, circunferência torácica, os níveis plasmáticos de colesterol e de leptina nos animais. Além disso, o protocolo de ART reduziu o peso corporal ao longo do tempo e apresentou uma tendência em reduzir os níveis plasmáticos de leptina nos animais que consumiram dieta rica em gordura. Interessante também, foi verificar que os animais do grupo DIO associado ao protocolo de alimentação por restrição de tempo mostraram redução nos níveis da interleucina-6 (IL-6) no hipotálamo. No entanto, o protocolo da ART também aumentou os níveis plasmáticos de glicose e aumentou os níveis hipotalâmicos das citocinas IL-1 β e TNF- α .

Consistente como os nossos achados, outros estudos com diferentes protocolos mostraram que essa estratégia nutricional de restringir o tempo da alimentação é eficiente e capaz de interferir no peso corporal, na adiposidade e, em vários parâmetros metabólicos (ARBLE et al., 2009; Hatori et al., 2012; MORAN-RAMOS et al., 2016; SHERMAN et al., 2012). Por exemplo, o estudo de Hatori et al. (2012) mostrou que ratos alimentados com uma dieta rica em gordura por 18 semanas apenas na fase escura ganharam menor peso corporal em relação aos animais alimentados *ad libitum*. Outro estudo mostrou que os animais ganharam 2,5 vezes mais peso corporal quando alimentados com uma dieta rica em gordura por seis semanas durante a fase clara em comparação com a fase escura (ARBLE et al., 2009). Já o estudo de Sherman et al., (2012) que avaliou por um período mais longo, observou que os animais alimentados com uma dieta rica em gordura por 18 semanas, só durante a fase ativa dos animais (escura), ganharam 18% menos de peso corporal, apresentaram uma redução de 30% nos níveis plasmáticos de colesterol e apresentaram uma melhora na sensibilidade à insulina do que os animais alimentados *ad libitum*. Contrário a esses achados, o estudo de Yasumoto et al. (2016) mostrou que os animais alimentados com uma dieta rica em gordura e açúcar durante a fase clara (fase em que os animais estão menos ativos) ganharam mais peso corporal, aumentaram os níveis plasmáticos de insulina e leptina, aumentaram a adiposidade, acumularam gordura no fígado e apresentaram elevada expressão de genes envolvidos com a

lipogênese, comparados com os animais alimentados só na fase ativa. Oishi et al. (2018) também verificou que utilizando um protocolo de alimentação durante a fase de descanso dos animais (fase clara) só por duas semanas foi suficiente para induzir resistência à leptina, fator chave que contribui para alterações metabólicas e para o desenvolvimento da obesidade. Com base nesses estudos, é possível enfatizar a importância de respeitar o ciclo circadiano alimentar do roedor, pois os protocolos do jejum intermitente realizados sem respeitar o ciclo circadiano pode alterar a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glicose e induzir um aumento na leptina plasmática e conseqüentemente, uma resistência aos efeitos da leptina e insulina nos animais. Por outro lado, um protocolo de alimentação que respeite o ciclo circadiano, respeitando uma janela alimentar na fase ativa dos animais mostrou benefícios para reduzir os desfechos negativos sobre o peso corporal, a hiperfagia e o metabolismo.

Baseado nos resultados encontrados nesse estudo, é possível imaginar que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura ao longo da vida pode estar alterando os ritmos circadianos e induzindo um prejuízo no controle do apetite. Em contrapartida, o protocolo de alimentação por restrição de tempo parece estar induzindo uma reorganização desse controle, uma vez que foi visto que os animais do grupo DIO +ART reduziram o consumo alimentar, o peso corporal ao longo do tempo e tiveram uma tendência a diminuir os níveis plasmáticos de leptina. Assim, nós tivemos o interesse de investigar o comportamento alimentar dos animais para conseguir compreender as alterações murinométricas e metabólicas encontradas nos animais.

Nesse sentido, para obter uma melhor compreensão do controle do apetite homeostático, nós utilizamos uma tarefa que avalia a sequência comportamental de saciedade (SCS). A SCS foi demonstrada pela primeira vez por Ritcher (1922). A sequência é determinada quando o animal termina de se alimentar e se engaja em comportamentos de limpeza e exploração, e logo em seguida, repousa ou dorme. Esses dados foram comprovados por Antin et al. (1975), onde observaram que os ratos após pararem de se alimentar, começavam a fazer comportamentos de limpeza e exploração e, logo após, repousavam ou dormiam. A hipótese de que a SCS pode ser alterada pelo consumo crônico de uma dieta rica em gordura *ad libitum* num ciclo de 24 horas, assim como, pela restrição da disponibilidade de alimentos a uma janela de 12 horas durante a fase ativa dos animais foram embasadas pelos nossos resultados. Foi observado que a manipulação dietética e o protocolo da alimentação com restrição de tempo não interromperam a sequência comportamental de

saciedade, apenas anteciparam ou retardaram o disparado da saciedade, e provocaram mudanças no tempo gasto nas atividades de descanso e, principalmente, de alimentação.

Os ritmos circadianos têm um papel fundamental na sincronização dos processos que controlam a ingestão alimentar e garante o controle homeostático energético. No entanto, a perda desses ritmos pode ocasionar distúrbios metabólicos e o desenvolvimento da obesidade, assim como, a obesidade induzida por dieta pode interromper esses ritmos potencializando o problema (PAGE et al., 2020).

No nosso estudo observamos que os animais que consumiram uma dieta rica em gordura (DIO) tiveram um disparo de saciedade antecipado quando comparado com o grupo controle, que receberam uma dieta padrão do biotério. Foi observado também que o grupo controle (CTRL-DP) teve um maior tempo de alimentação que o grupo DIO. Estudos têm demonstrados que a disponibilidade de dietas densas em calorias podem afetar o sistema circadiano alimentar. Por exemplo, roedores alimentados com uma dieta rica em gordura alteram seu padrão de ingestão alimentar exibindo um comportamento de “pastoreio”, com uma maior ingestão de alimentos durante a fase leve (período inativo, jejum) em comparação com animais alimentados com uma dieta padrão do biotério (KENTISH et al., 2016; KOHSAKA et al., 2007). Esses achados foram associados com a interrupção dos ritmos da alimentação mediados pela perda na sinalização da saciedade. Entretanto, não está claro se o comportamento de “pastoreio” está sendo induzido pela interrupção dos ritmos da alimentação mediada pela perda da sinalização da saciedade ou vice e versa. Essas alterações no comportamento alimentar pode ser uma explicação do porquê os animais do grupo DIO apresentaram um disparo de saciedade antecipado. Nossas perspectivas futuras é avaliar o consumo circadiano alimentar dos nossos grupos experimentais durante os seus respectivos ciclos de alimentação-jejum, e confirmar a hipótese de que os animais que receberam uma dieta rica em gordura tiveram seus ritmos de alimentação alterados.

Em condições habituais, os roedores noturnos se alimentam em conformidade a um padrão circadiano arrastado por alterações na iluminação do ambiente (LEVITSKY 1970; ZUCKER 1971). A ingestão de alimentos durante a noite é, geralmente, o dobro do que a do dia (KERSTEN et al. 1980; ZUCKER 1971). Kentish, (2013), demonstrou que roedores expostos sob um padrão de ciclo de 12/12h, claro-escuro, alimentados com uma dieta padrão *ad libitum* apresentaram ritmos diurnos na ingestão de alimentos, consumindo cerca de 60 a 80% de suas necessidades energéticas durante a fase escura. Correlacionando com esses achados, em nosso estudo, os animais que consumiram uma dieta padrão do biotério (CTRL-DP e CTRL-DP + ART), apresentaram um padrão alimentar semelhante aos dos autores

supracitados, também, podemos observar que o consumo alimentar logo nos períodos iniciais desses dois grupos foram maior do que os dos seus homólogos, no entanto, o disparo de saciedade (momento determinado pela transição do “parar de comer para o repouso”) foi mais tardio no grupo CTRL-DP + ART. Vale salientar que em nosso estudo não mensuramos o consumo alimentar periódico de 24 horas dos nossos grupos experimentais, mas podemos dizer a partir do teste da CSC, onde avaliamos o início da ingestão alimentar na fase ativa, período de 1 hora, que os grupos CTRL-DP e CTRL-DP + ART tiveram uma maior ingestão de alimentos em comparação com os animais que consumiram uma dieta rica em gordura (DIO e DIO + ART).

Para uma melhor compreensão sobre o padrão de comportamento alimentar, autores explicam que o consumo alimentar espontâneo de ratos são observados por uma interação de dois mecanismos que determinam a ingestão diária de alimentos: o primeiro, a alimentação ao entardecer, início da noite, que está relacionada a regulação homeostática das necessidades energéticas aguda; e a segunda, alimentação ao amanhecer, horas finais do período ativo, que está relacionada à regulação circadiana, que serve para abastecer os estoques de energia para o período de jejum (descanso) (RIVERA-ESTRADA et al., 2018).

Os ritmos circadianos não são regulados unicamente pelo ciclo claro-escuro. A comida é determinada como um potente *Zeitgeber*, que regulam os relógios do trato gastrointestinal. O consumo crônico de uma dieta com alto teor de gordura provoca uma interrupção nos ritmos da alimentação provocando uma dessincronização dos relógios circadianos (PAGE et al., 2020). A alimentação com restrição de tempo é eficaz na reorganização do comportamento e da fisiologia alimentar (MISTLBERGER et al., 2009; STEPHAN et al., 2002). Essa restrição da disponibilidade de alimentos estreita a uma janela diária, impulsiona um surto de atividade, denominada atividade antecipatória de alimentos. O controle dos relógios circadianos endógenos é consistente com os mecanismos apresentados pelas atividades antecipatórias de alimentos, ao invés de ser mediado pela alimentação. Isto é, se o período do acesso a alimentação é arrastado abruptamente, a fase inicial da atividade antecipatória de alimentos só será ressincronizado em alguns dias. Além do mais, a privação completa de alimento ao animal, fará com que a atividade antecipatória de alimentos persista até enquanto o jejum estiver mantido (MISTLBERGER et al., 2009; STEPHAN et al., 2002). Essa exibição da atividade antecipatória de alimentos inclui em um aumento da atividade locomotora, atividade de enzimas digestivas, temperatura e motilidade gastrointestinal, horas antes da disponibilidade de alimentos para os animais (STEPHAN et al., 2002; BOULAMERY-VELLY et al., 2005; COMPERATORE; STEPHAN, 1987).

Tahara e Shibata (2013) demonstraram em seu estudo que ratos submetidos ao protocolo da ART apresentaram um aumento na temperatura corporal e na atividade locomotora 2-3 horas do acesso ao alimento, propondo que esses animais antecipam o tempo da alimentação por meio fatores internos de prevenção do tempo denominado como oscilador arrasto pelo alimento. Constatamos em nossos dados que os animais submetidos ao protocolo da ART (CTRL-DP + ART e DIO + ART), apresentaram um maior tempo de atividade nos comportamentos de exploração e *Grooming* (comportamento de limpeza feito pelo animal) ao longo do teste da SCS. O comportamento de exploração dos animais também pode estar relacionado com a atividade locomotora. Foi avaliado a atividade locomotora dos animais em nosso estudo, mas não encontramos diferença significativa entre os grupos. Uma limitação do nosso estudo foi não ter avaliado a atividade antecipatória alimentar dos animais 1 ou 2 horas antes de iniciarem a se alimentar durante a fase ativa (as 19h, horário sincronizado para o início da alimentação dos grupos submetidos a ART).

Como descrito anteriormente, que a alimentação com restrição de tempo pode oferecer mecanismos para reforçar e realinhar os ritmos da alimentação. Os nossos dados demonstram que o grupo CTRL-DP + ART apresentou um disparo de saciedade num período (entre 30 e 35 minutos) menor do que o grupo CTRL-DP (40 minutos). E quanto os animais que se alimentaram com uma dieta rica em gordura, o grupo DIO + ART apresentou um disparo de saciedade bem mais tardio (35 minutos) do que o grupo DIO. Entretanto, uma observação interessante é vista na alimentação dos grupos CTRL-DP + ART e DIO + ART, esses animais tiveram um consumo alimentar relativamente gradual ao longo dos períodos avaliados no teste. Há evidências na literatura de que o controle circadiano da ingestão de alimentos é apontado pela hiperfagia transitória logo após a privação de alimentos. Isto é, a quantidade de alimentos ingeridos no decorrer de uma refeição atípica (onde não é o habitual do animal se alimentar) necessita dependentemente do tempo de reintegração diário da alimentação, e não apenas decorrente as respostas dos períodos de jejum (PERELLO et al., 2014). Isso pode explicar a diferença no padrão do comportamento alimentar apresentados pelos grupos experimentais no teste da SCS. Uma observação bastante relevante a ser considerada é que os animais que sempre receberam uma alimentação *ad libitum* 24 horas (os grupos CTRL-DP e DIO), passaram inesperadamente por uma privação de alimentos 4 horas antes de iniciar o teste. Não está claro se isso pode ocasionar em uma interrupção dos ritmos que controlam a alimentação dos animais desses grupos, mas podemos notar que eles tiveram um disparo de saciedade retardado comparados com os animais que foram submetidos a ART. Esses resultados podem reforçar a hipótese de que ART durante o período de atividade dos animais

é capaz de resincronizar os ritmos circadianos da alimentação perdidos pela indução da obesidade por dieta, como foi descrito anteriormente por autores nesse estudo.

Avaliamos também, os parâmetros microestruturais das refeições ofertadas durante o teste. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no tamanho da refeição entre os grupos. Entretanto os animais que consumiram uma dieta rica em gordura (DIO e DIO + ART) apresentaram uma duração menor da refeição com uma maior taxa de alimentação em comparação aos seus homólogos. A variação da frequência e o tamanho das refeições nos animais pode ser explicado pela hora do dia, ou mais claramente, pelo horário biológico da alimentação, definido de acordo pelos relógios circadianos que produzem diariamente ritmos comportamentais da alimentação (CHALLET, 2019). Como não foi visto nenhuma diferença significativa no tamanho das refeições entre os grupos, não pode ser afirmado com clareza que os grupos que apresentaram uma maior taxa e uma menor duração no consumo dessas refeições apresentaram um comportamento de hiperfagia alimentar, mas sim, uma voracidade alimentar diante a essa dieta mais densa em calorias. Há um consenso na literatura para determinar o comportamento de hiperfagia alimentar em roedores associado a privação inesperada de alimentos e/ou acesso a dietas palatáveis (PERELLO et al., 2014). Esse critério para hiperfagia alimentar é determinado quando os animais consomem 2 vezes mais calorias, independente da dieta, e em um mesmo intervalo de tempo em comparação com o grupo controle sob condições semelhantes de ambiente (PERELLO et al., 2014). Assim, embora os animais das diferentes intervenções estudadas tenham apresentados a SCS, é possível observar que durante a tarefa realizada eles se comportaram diferentemente.

Com o intuito de compreender melhor o hipotálamo, o centro regulador do comportamento alimentar homeostático, nós investigamos marcadores bioquímicos que poderiam ajudar a explicar essas diferenças observadas no consumo calórico, no peso corporal, nos níveis plasmáticos de leptina e no comportamento de SCS nos animais submetidos às diferentes intervenções (dieta rica em gordura e jejum). É importante destacar que efeitos deletérios sobre a sinalização hipotalâmica podem estar associados diretamente com a obesidade (SAINSBURY; ZHANG, 2010; THALER; SCHWARTZ, 2010). No hipotálamo, especificamente no núcleo arqueado, estão localizadas duas populações de neurônios responsáveis pelo controle do apetite, metabolismo da glicose e o gasto energético (OLIVEIRA et al., 2022). Os neurônios representados por AgRP e POMC recebem os sinais periféricos de diferentes hormônios com o intuito de desencadear uma resposta que possa controlar o apetite e o gasto energético. Por exemplo, quando o hormônio leptina é secretado pelo adipócito ele pode interagir com o receptor nos neurônios POMC e desencadear um sinal

para promover a saciedade e o gasto energético (VARELA; HORVATH, 2012). Nós verificamos no presente estudo, que animais DIO aumentaram, enquanto os animais submetidos ao protocolo ART diminuíram os níveis plasmáticos de leptina. Interessante foi observar que quando os dois fatores estavam juntos houve uma tendência em reduzir os níveis plasmáticos de leptina. Nesse sentido, investigamos o imunoconteúdo do receptor de leptina no hipotálamo, mas não observamos diferenças significativas entre os grupos. No entanto, acreditamos que os animais DIO possam estar com resistência aos efeitos da leptina e o que o hipotálamo possa estar com alterações na via de sinalização desse hormônio. O hormônio leptina se liga no receptor hipotalâmicos e pode ativar o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT 3), esse por sua vez, ativa a transcrição gênica do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS-3) (LADYMAN; GRATTAN, 2013). O aumento da expressão de SOCS3 gera uma retroalimentação negativa e atenua a sinalização da leptina-STAT-3 (LADYMAN; GRATTAN, 2013). Alguns estudos, verificaram que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura leva a um aumento na expressão de SOCS-3 no hipotálamo (TONIAZZO et al., 2018, LADYMAN; GRATTAN, 2013), e esse, aumento está relacionada com um ambiente inflamatório induzido por também outras citocinas nessa região causando prejuízo nos sinais mediados pela leptina, e provavelmente, sendo este um dos principais mecanismos da resistência aos efeitos da leptina nas células neuronais hipotalâmicas (SPEZANI et al., 2020, LEE; SHIN; CHOUE, 2010). Em contrapartida, a alimentação com restrição de tempo reduziu os níveis plasmáticos de leptina e ainda apresentou uma tendência em reduzir os níveis plasmáticos de leptina no grupo DIO e contribuiu para reduzir o consumo calórico e o peso corporal desses animais, indicando um possível controle hipotalâmico. No entanto, o protocolo de alimentação com restrição de tempo aumentou os níveis de IL-1 β , TNF- α no grupo controle e diminuiu os níveis da IL-6 quando associado ao grupo DIO no hipotálamo. Vários estudos mostraram que diferentes protocolos de jejum intermitente reduziram os níveis plasmáticos de moléculas inflamatórias em indivíduos com sobrepeso ou obesidade (SPEZANI et al., 2020, LEE; SHIN; CHOUE, 2010). No entanto, poucos estudos já avaliaram marcadores inflamatórios no hipotálamo, e os resultados são contraditórios. Um estudo que avaliou o jejum de 24 horas com dias intercalados com dieta rica em frutose e indutora da obesidade também observou que o jejum aumentou a expressão de TNF- α e reduziu a expressão de SOCS-3 no hipotálamo quando comparado ao grupo controle (SPEZANI et al., 2020). Um estudo em indivíduos obesos submetidos ao protocolo de jejum intermitente alternado de 24 horas também não foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α (TREPANOWSKI et al., 2018). Outros estudos estão de acordo

que o jejum pode aumentar a produção de citocinas (KAUSHIK et al., 2012, TREPANOWSKI et al., 2018; SPEZANI et al., 2020). Um estudo mostrou que o jejum agudo de 24 horas aumentou a infiltração de macrófagos do tipo M1, aumentou a lipólise e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e outras interleucinas no tecido adiposo dos animais (DING et al., 2016). Outro estudo mostrou que períodos de jejum, pode induzir um aumento da IL-6 e da lipólise para promover substrato disponível para atender as necessidades metabólicas (WUEEST et al., 2014). Apesar de curioso e inesperado os achados sobre os marcadores inflamatórios no hipotálamo, é possível especular que o nosso protocolo de jejum por 4 semanas pode ainda estar promovendo uma resposta adaptativa nas células do hipotálamo, no entanto se faz necessário verificar se essas moléculas normalizam nessa região após a interrupção do protocolo de jejum. Interessante foi observar que isoladamente as intervenções mostraram um aumento nos níveis de IL-6 no hipotálamo, mas quando os dois fatores estavam juntos os níveis ficaram reduzidos. Baseado nos nossos achados anteriores, observamos que esse grupo experimental apresentou alguns benefícios como reduziu o consumo calórico, reduziu o peso corporal e ainda quase apresentou diferença significativa na redução dos níveis de leptina no plasma. Assim, é possível que essa redução nos níveis de IL-6 possa ser um fator importante para as células hipotalâmicas e possa estar associada com os desfechos murinométricos e metabólicos observados nesses animais. No entanto, é importante enfatizar que o estudo sobre os marcadores inflamatórios no hipotálamo é extremamente relevante, uma vez que estes estão diretamente relacionados com a progressão da obesidade e podem ser fatores envolvidos para o prejuízo no controle do apetite e do balanço energético.

Além de investigar os efeitos da dieta rica em gordura e da alimentação com restrição de tempo sobre controle homeostático do apetite, o nosso estudo também investigou o controle hedônico da alimentação através da busca e preferência pelo alimento altamente palatável. A tarefa do corredor alimentar foi feita para avaliar a motivação de busca desses animais por um alimento palatável rico em açúcar. Essa análise comportamental é realizada em um aparato retangular com alimento doce disponível em uma das extremidades e por 3 minutos é avaliado o tempo para chegar nessa extremidade, o tempo para iniciar a comer e o consumo do alimento. Observamos que nos dias de treinamentos com restrição alimentar prévia, houve um efeito ao longo do tempo mostrando que os grupos apresentaram uma menor latência para iniciar a comer os alimentos doces. Referente ao consumo desse alimento, foi visto um efeito dos grupos ao longo do tempo (dias) aumentando o consumo do alimento doce. No dia do teste, foi visto que o grupo DIO e os grupos que foram submetidos ao protocolo da ART (CTRL-DP + ART e DIO + ART) apresentaram uma maior latência para

iniciar a comer o alimento doce em comparação ao CTRL-DP, e notavelmente, o grupo DIO e DIO + ART consumiram menos alimento doce em comparação aos seus controles (CTRL-DP e CTRL-DP + ART). Esses resultados sugerem que os animais DIO e DIO + ART apresentaram uma menor motivação para buscar alimento doce rico em açúcar simples quando estavam previamente alimentados. Além da dieta rica em gordura saturada ter grande capacidade de induzir saciedade, é possível que a falta de motivação para buscar um alimento doce também possa estar relacionado com fenótipo do tipo depressivo e ansioso que os animais que consomem este tipo de dieta ao longo da vida apresentam na idade adulta (ARCEGO et al., 2018; BERRIDGE, 2004). O protocolo da alimentação com restrição de tempo não foi capaz de reverter esse comportamento.

Para excluir que possivelmente o aparato novo poderia ter acentuado a ansiedade nos animais que consumiram gordura ao longo da vida, e possivelmente, apresentar menor motivação para buscar o alimento doce, além de também disponibilizar um maior tempo para os animais consumirem alimentos palatáveis, foi realizado o teste da preferência alimentar por 12 horas. Essa tarefa utilizou três tipos de dietas, uma dieta hiperlipídica, uma hiperglicídica e uma dieta padrão do biotério, simultaneamente, na caixa moradia durante a fase ativa (19h:00min as 07h:00min). Foi observado que os grupos CTRL-DP e CTRL-DP, que sempre receberam uma dieta padrão do biotério, demonstraram ter uma preferência alimentar por uma dieta rica em açúcar, enquanto os grupos DIO e DIO + ART, que sempre tiveram acesso a uma dieta rica em gordura ao longo de todo estudo, apresentaram uma preferência por uma dieta hiperlipídica, mantendo seu interesse por essa dieta com alto teor de gordura. Essas preferências podem demonstrar modificações nos sistemas que regulam o controle alimentar, ritmos circadianos e em expressão de neuropeptídeos (KYRKOULI; STRUBBE; SCHEURINK, 2006). O início da fase de atividade, primeiras horas da fase ativa, os animais demonstram ter uma clara preferência por carboidratos, a seletividade desse macronutriente está relacionado com a liberação de noradrenalina e glicocorticóides nos núcleos paraventriculares (PVN) do hipotálamo. Em contraposição, as refeições das horas finais da fase ativa, ao amanhecer, tendem a fornecer energia para períodos prolongados de jejum do sono, assim, visam uma preferência pelos macronutrientes gorduras e proteínas com um menor custo de escolha de carboidratos (LEIBOWITZ, 1988). Corroborando com esses achados, Beck, Musse e Stricker-Kongrad. (2002) observaram que nas horas iniciais da fase ativa os animais preferiram consumir carboidratos em relação a gordura e que a escolha desses macronutrientes estão relacionados com a expressão de neuropeptídeos envolvidos no

controle alimentar. Segundo esses autores os animais selecionam essas dietas pelo período de atividade alimentar e pela composição do nutriente específico.

No intuito de entender esses achados comportamentais nós investigamos o imunoconteúdo do receptor de dopamina do tipo 2 e o imunoconteúdo da enzima tirosina hidroxilase no núcleo accumbens dos animais. Nós observamos que os animais do grupo DIO apresentaram uma redução do imunoconteúdo de D2 e da enzima tirosina hidroxilase em comparação com o grupo controle (CTRL-DP) e, curiosamente, quando associado com ART (DIO + ART) teve um aumento da expressão de D2, mas sem igualar com o grupo CTRL-DP. As projeções dopaminérgicas da área Tegmental Ventral para o núcleo accumbens estão envolvidas na motivação para obter recompensas alimentares (BERRIDGE, 2004), assim a redução na enzima tirosina hidroxilase e no receptor D2 induzida pela dieta rica em gordura, pode indicar menor atividade dopaminérgica nessa região e isso pode estar relacionado com uma menor motivação para ingerir outros alimentos palatáveis. No entanto, mais estudos serão necessários para compreender a neurotransmissão dopaminérgica nos animais submetidos às duas intervenções (Dieta e Jejum). Já o aumento na preferência pelo consumo de alimentos ricos em açúcar observados nos animais dos grupos CTRL-DP e CTRL-DP + ART, pode indicar uma situação comum e adaptativa quando os animais estão em condições de estresse metabólico induzidos pela restrição alimentar, que pode proporcionar um maior consumo de alimento doce (PAGE et al., 2020. BELLO; HAJNAL, 2010).

Assim, os nossos resultados mostraram que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura foi capaz de induzir obesidade nos animais por apresentar um maior peso corporal ao longo do tempo, maior glicemia, maiores níveis plasmáticos de leptina e triglicérides, maior índice de adiposidade, maior taxa de alimentação e menor motivação para consumir um novo alimento palatável. O protocolo de alimentação por restrição de tempo foi capaz de sincronizar a alimentação e foi capaz de atuar, provavelmente, sobre os sinais homeostáticos do controle do apetite dos animais obesos, uma vez que houve uma redução do consumo calórico e do peso corporal ao longo do tempo. Nesse sentido, alimentação por restrição de tempo é uma eficiente estratégia nutricional no combate a obesidade. No entanto, é importante destacar que com os nossos achados foi possível validar o modelo experimental, mas ainda não foi possível identificar o preciso mecanismo envolvido nessas alterações metabólicas e comportamentais observadas. Sendo assim, fica como perspectiva investigar o metabolismo das células hipotalâmicas com foco em marcadores bioquímicos envolvidos com o sistema imune, com os processos autofágicos, com o metabolismo energético e com a expressão dos peptídeos POMC e NPY. Além também de compreender se a interrupção do protocolo da

alimentação com restrição de tempo (jejum) conseguiria manter a sincronização alimentar por mais tempo e evitar o sobrepeso e obesidade nos animais.

6. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura *ad libitum* num ciclo de alimentação de 24h, provou efeitos deletérios nos animais causando a interrupção das ritmicidades do controle alimentar e alterações metabólicas favorecendo o desenvolvimento da obesidade. Em contraste, a alimentação com restrição de tempo foi capaz reverter os efeitos deletérios provocado pela obesidade induzida por dieta, sobre o peso corporal e o consumo alimentar. Além do mais, a ART com acesso ao alimento por 12h durante o período biológico da alimentação é suficiente para sustentar e prevenir a saúde metabólica dos animais (veja a Figura 9).

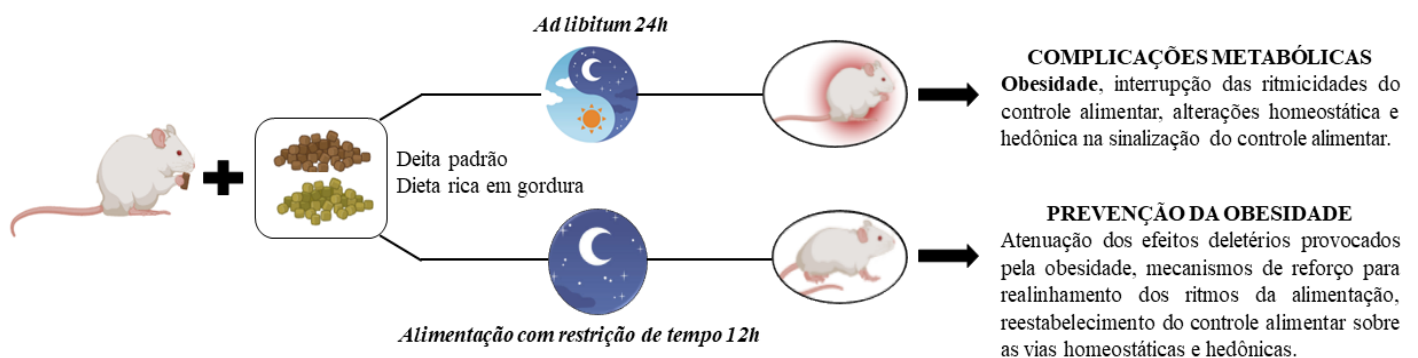


Figura 9: Resumo gráfico. A alimentação com restrição de tempo (ART, 12h de acesso ao alimento durante a fase ativa) pode melhorar a saúde metabólica dos animais induzidos à obesidade por dieta. Os nossos resultados embasam que o consumo de uma dieta rica em gordura *ad libitum* 24h compromete os ritmos comportamentais da alimentação (perda da sinalização do apetite), e que a ART pode corrigir esse problema.

7. PERSPECTIVAS

- **Avaliar o comportamento alimentar antecipatório dos animais;**
- **Verificar os níveis plasmáticos de grelina;**
- **Avaliar a expressão gênica de POMC, AGRP e NPY;**
- **Avaliar a expressão gênica do receptor semelhante a Toll do tipo 4 (TLR4);**
- **Investigar marcadores envolvidos com o metabolismo energético no hipotálamo;**
- **Investigar marcadores de autofagia no hipotálamo;**
- **Avaliar o imunoconteúdo do transportador de Dopamina e do receptor de dopamina do tipo D1;**
- **Verificar diferenças sexo-específicas.**

REFERENCIAS

- ADAMOVICH, Y. et al. Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. **Cell metabolism**. Israel, v. 19, n. 2, p. 319-330, 2014.
- AINSLIE, Deborah A. et al. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 438-442, 2000.
- ANSON, R. Michael et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 6216-6220, 2003.
- ARCEGO, Danusa Mar et al. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 50, p. 16-25, 2016.
- ARRUDA, Ana Paula et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1314-1326, 2011.
- AYALA, Julio E. et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease models & mechanisms**, v. 3, n. 9-10, p. 525-534, 2010.
- BAIK, Ja-Hyun. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. **BMB reports**, v. 46, n. 11, p. 519, 2013.
- BASTARD, Jean-Philippe et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3338-3342, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar; 2017.
- BELKACEMI, L. et al. Intermittent Fasting Modulation of the Diabetic Syndrome in Streptozotocin-Injected Rats. **International Journal of Endocrinology**, v.2012, p. 1–12, 2012.
- BENRICK, A. et al. Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. **Journal of neuroendocrinology**, v. 21, n. 7, p. 620-628, 2009.
- BELLO, Nicholas T.; HAJNAL, Andras. Dopamine and binge eating behaviors. **Pharmacology Biochemistry and behavior**, v. 97, n. 1, p. 25-33, 2010.
- BERRIDGE, Kent C. ‘Liking’and ‘wanting’food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. **Physiology & behavior**, v. 97, n. 5, p. 537-550, 2009.

BERRIDGE, Kent C.; KRINGELBACH, Morten L. Pleasure systems in the brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646-664, 2015.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BERNADI, F. et al. Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. **Revista Psiquiátrica Rio Grande do Sul**, v. 31, n. 2, p. 170 -176, 2009.

BOULAMERY-VELLY, A. et al. Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. **Chronobiology international**, v. 22, n. 3, p. 489-498, 2005.

BRUNING, Jens C. et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v. 289, n. 5487, p. 2122-2125, 2000.

BUETTNER, Roland; SCHÖLMERICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

BLUNDELL, J. E.; GOODSON, S.; HALFORD, J. C. G. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 1, p. S29-S34, 2001.

BRUCE-KELLER, Annadora J. et al. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 45, n. 1, p. 8-15, 1999.

CABRAL-COSTA, J. V. et al. Intermittent fasting uncovers and rescues cognitive phenotypes in PTEN neuronal haploinsufficient mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CAMERA, Fernanda Dal'Maso et al. Cardioprotective effects of physical exercise on redox biology in mice exposed to hand-rolled cornhusk cigarette smoke. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 661, p. 50-55, 2019.

CATENACCI, V. A. et al. A randomized pilot study comparing zero-calorie alternate-day fasting to daily caloric restriction in adults with obesity. **Obesity**, v. 24, n. 9, p. 1874–1883, 2016.

CATTERSON, James H. et al. Short-term, intermittent fasting induces long-lasting gut health and TOR-independent lifespan extension. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. 1714-1724. e4, 2018.

CHAIX, A.; ZARRINPAR, A. The effects of time-restricted feeding on lipid metabolism and adiposity. **Adipocyte**. Estados Unidos, v. 4 , n. 4 , p. 319-324 , 2015.

CHAIX, A. et al. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. **Cell metabolism**. Estados Unidos, v. 20, n. 6, p. 991-1005, 2014.

CHALLET, Etienne. The circadian regulation of food intake. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 7, p. 393-405, 2019.

COCCURELLO, Roberto. Anhedonia in depression symptomatology: Appetite dysregulation and defective brain reward processing. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112041, 2019.

COCCURELLO, Roberto; MACCARRONE, Mauro. Hedonic eating and the “delicious circle”: from lipid-derived mediators to brain dopamine and back. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 271, 2018.

COMPERATORE, Carlos A.; STEPHAN, Friedrich K. Entrainment of duodenal activity to periodic feeding. **Journal of biological rhythms**, v. 2, n. 3, p. 227-242, 1987.

COLLIER, R. Intermittent fasting: the science of going without. **Canadian Medical Association journal**, v. 185, n. 9, p. 363–364, 2013.

DAVIS, Caroline; STRACHAN, Shaelyn; BERKSON, Mami. Sensitivity to reward: implications for overeating and overweight. **Appetite**, v.42, n. 2, p. 131-138, 2004.

DALVI, Prasad S. et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. **International journal of obesity**, v. 41, n. 1, p. 149-158, 2017.

DE FARIAS, J. M. et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Hormone and metabolic research**, v. 45, n. 03, p. 190-196, 2013.

DI MEO, Sergio; IOSSA, Susanna; VENDITTI, Paola. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 3, p. R159-R181, 2017.

DING, Hanying et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 11533, 2016.

DOMASZEWSKI, P. et al. Effect of a six-week intermittent fasting intervention program on the composition of the human body in women over 60 years of age. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.11, p. 1–9, 2020.

DROR, Erez et al. Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. **Nature immunology**, v. 18, n. 3, p. 283-292, 2017.

DORIGHELLO, Gabriel G. et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 6, p. 979-986, 2014.

DUBE, S. et al. Assessment of insulin action on carbohydrate metabolism: physiological and non-physiological methods. **Diabetic Medicine**, v. 30, n. 6, p. 664-670, 2013.

ESPITIA-BAUTISTA, Estefania et al. Social jet-lag potentiates obesity and metabolic syndrome when combined with cafeteria diet in rats. **Metabolism**, v. 72, p. 83-93, 2017.

FAUL, F., et al. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

FERNÁNDEZ, Mariana Alejandra Rosas et al. Intermittent food restriction in female rats induces SREBP high expression in hypothalamus and immediately postfasting hyperphagia. **Nutrition**, v. 48, p. 122-126, 2018.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FURNES, Marianne W.; ZHAO, Chun-Mei; CHEN, Duan. Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. **Obesity surgery**, v. 19, n. 10, p. 1430-1438, 2009.

FRIEDMAN, Jeffrey M. Leptin and the endocrine control of energy balance. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 8, p. 754-764, 2019.

GABEL, Kelsey et al. Effect of time restricted feeding on the gut microbiome in adults with obesity: A pilot study. **Nutrition and health**, v. 26, n. 2, p. 79-85, 2020.

GALLISTL, S. et al. Changes in serum interleukin-6 concentrations in obese children and adolescents during a weight reduction program. **International journal of obesity**, v. 25, n. 11, p. 1640-1643, 2001.

GAMEZ-MENDEZ, Ana María et al. Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138609, 2015.

GOTTHARDT, Juliet D. et al. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide Y gene expression in diet-induced obese male mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 679-691, 2016.

GOTTHARDT, Juliet D.; BELLO, Nicholas T. Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding. **Physiology & behavior**, v. 174, p. 49-56, 2017.

GUMAA, K. A. et al. The effects of fasting in Ramadan. **British Journal of Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 573-581, 1978.

HALFORD, Jason CG; WANNINAYAKE, Shamila CD; BLUNDELL, John E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 61, n. 2, p. 159-168, 1998.

HARRIS, Leanne et al. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review and meta-analysis. **JBI Evidence Synthesis**, v. 16, n. 2, p. 507-547, 2018.

HARROLD, Joanne A. et al. CNS regulation of appetite. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 3-17, 2012.

HARIRI, Niloofar; THIBAUT, Louise. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HARVIE, M. N. et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: A randomized trial in Young overweight women. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 5, p. 714–727, 2011.

HARVIE, M. et al. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v. daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 8, p. 1534–1547, 2013.

HATORI, Megumi et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell metabolism**, v. 15, n. 6, p. 848-860, 2012.

HEILBRONN, Leonie K. et al. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 69-73, 2005.

HEYDEMANN, Ahlke. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

HORVATH, Tamas L. et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 107, n. 33, p. 14875-14880, 2010.

HU, Yuan et al. Postoperative intermittent fasting prevents hippocampal oxidative stress and memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. **European journal of nutrition**, v. 58, n.1, p. 423-432, 2019.

JAMSHED, H. et al. Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 3–5, 2019.

KENTISH, Stephen J. et al. Circadian variation in gastric vagal afferent mechanosensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 49, p. 19238-19242, 2013.

KENTISH, Stephen J. et al. High-fat diet-induced obesity ablates gastric vagal afferent circadian rhythms. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 11, p. 3199-3207, 2016.

KAUSHIK, Susmita et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. **EMBO reports**, v. 13, n. 3, p. 258-265, 2012.

KENNY, Paul J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 664-679, 2011.

KOHSAKA, Akira et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. **Cell metabolism**, v. 6, n. 5, p. 414-421, 2007.

KLEMPPEL, Monica C. et al. Intermittent fasting combined with calorie restriction is effective for weight loss and cardio-protection in obese women. **Nutrition journal**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2012.

KIM, Joonki et al. Transcriptome analysis reveals intermittent fasting-induced genetic changes in ischemic stroke. **Human molecular genetics**, v. 27, n. 9, p. 1497-1513, 2018.

KRISHNAN, Sridevi; COOPER, Jamie A. Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 3, p. 691-710, 2014.

KOHSAKA, Akira et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. **Cell metabolism**, v. 6, n. 5, p. 414-421, 2007.

KWON, Obin; KIM, Ki Woo; KIM, Min-Seon. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 1457-1477, 2016.

LADYMAN, Sharon R.; GRATAN, David R. JAK-STAT and feeding. **Jak-stat**, v. 2, n. 2, p. e23675, 2013.

LECHEMINANT, J. D. et al. Restricting night-time eating reduces daily energy intake in healthy young men: a short-term cross-over study. **British journal of nutrition**. United States of America, v. 110, n. 11, p. 2108-2113, 2013.

LEIBOWITZ, Sarah Fryer. Hypothalamic paraventricular nucleus: Interaction between α 2-noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 101-109, 1988.

LE FOLL, Christelle et al. Amylin-induced central IL-6 production enhances ventromedial hypothalamic leptin signaling. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1621-1631, 2015.

LEE, In Seok; SHIN, Gina; CHOUE, Ryowon. A 12-week regimen of caloric restriction improves levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in Korean women with BMIs greater than 23 kg/m². **Inflammation Research**, v. 59, p. 399-405, 2010.

LEVITSKY, David A. Feeding patterns of rats in response to fasts and changes in environmental conditions. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 291-300, 1970.

LI, Guolin et al. Intermittent fasting promotes white adipose browning and decreases obesity by shaping the gut microbiota. **Cell metabolism**, v. 26, n. 4, p. 672-685. e4, 2017.

LIU, Y. et al. SIRT3 mediates hippocampal synaptic adaptations to intermitente fasting and ameliorates deficits in APP mutant mice. **Nature Communications**, v.10, n. 1, p. 1–11, 2019.

LONGO, Valter D.; MATTSON, Mark P. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. **Cell Metabolism**, vol. 19, no. 2, 2014, p. 181-92.

LONGO, V. D.; PANDA, S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. **Cell Metabolism**. Los Angeles, v. 23, n. 6, p. 1048-1059, 2016.

LUNDBAEK, Knud. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **British medical journal**, v. 1, n. 5291, p. 1507, 1962.

LUTTER, Michael; NESTLER, Eric J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 3, p. 629-632, 2009.

MAJCHER-MAŚLANKA, Iwona et al. The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 57, p. 24-33, 2017.

MANOOGIAN, E. N. C.; PANDA, S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. **Ageing research reviews**. United States of America, v. 39, p. 59-67, 2017.

MATTSON, Mark P.; LONGO, Valter D.; HARVIE, Michelle. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. **Ageing research reviews**, v. 39, p. 46-58, 2017.

MATTHEWS, David R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MISTLBERGER, Ralph E. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 9, p. 1718-1729, 2009.

MISHRA, Devesh et al. Parabrachial interleukin-6 reduces body weight and food intake and increases thermogenesis to regulate energy metabolism. **Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 3011-3026. e5, 2019

MITCHELL, S. J. et al. Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 221- 228.e3, 2019.

Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2009) 297:E1247–59. doi: 10.1152/ajpendo.00274.2009

MUNHOZ, Ana Cláudia et al. Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1029, 2020.

MURPHY, Tytus; DIAS, Gisele Pereira; THURET, Sandrine. Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. **Neural plasticity**, v. 2014, 2014.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OLIVEIRA, Luciana da Costa et al. Using intermittent fasting as a non-pharmacological strategy to alleviate obesity-induced hypothalamic molecular pathway disruption. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 858320, 2022.

PANDA, S. Circadian physiology of metabolism. **Science**, La Jolla, v. 354, n. 6315, p. 1008-1015, 2016.

PARK, Sunmin et al. Ketone production by ketogenic diet and by intermittent fasting has different effects on the gut microbiota and disease progression in an Alzheimer's disease rat model. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 188-198, 2020.

PATTERSON, R. E.; LAUGHLIN, G. A.; SEARS, D. D.; LACROIX, A. Z.; MARINAC, C.; GALLO, L. C.; VILLASEÑOR, A. Intermittent fasting and human metabolic health. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, no. 115, vol. 8, 2015, p. 1203-1212. <http://doi.org/10.1016/j.jand.2015.02.018>.

PATTERSON, R. E.; SEARS, D. D. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. **Annual Review of Nutrition**. California, v. 37, n. 6, p. 71 – 393, 2017.

PERES, Ariadni Mesquita. Estudo do consumo de azeite de oliva sobre o controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar de ratos adolescentes submetidos à separação materna. 2021.

PEREIRA-LANCHA, Luciana O. et al. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 5, p. 75, 2012.

PERELLO, Mario et al. Considerations about rodent models of binge eating episodes. **Frontiers in psychology**, v. 5, p. 372, 2014.

PINHO, Ricardo A. et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. **Free radical biology and medicine**, v. 110, p. 381-389, 2017.

RADA, Pedro et al. Reduced accumbens dopamine in Sprague–Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 3, p. 394-400, 2010.

RIBEIRO, Gabriela; SANTOS, Osvaldo. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. **Revista portuguesa de endocrinologia, diabetes e metabolismo**, v. 8, n. 2, p. 82-88, 2013.

RIVERA-ESTRADA, David et al. The homeostatic feeding response to fasting is under chronostatic control. **Chronobiology International**, v. 35, n. 12, p. 1680-1688, 2018.

ROLLS, Barbara J.; VAN DUIJVENVOORDE, P. M.; ROWE, Edward A. Variety in the diet enhances intake in a meal and contributes to the development of obesity in the rat. **Physiology & behavior**, v. 31, n. 1, p. 21-27, 1983.

ROMERO, Carla Eduarda Machado; ZANESCO, Angelina. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 85-91, 2006.

ROTHEMUND, Yvonne et al. Differential activation of the dorsal striatum by high-calorie visual food stimuli in obese individuals. **Neuroimage**, v. 37, n. 2, p. 410-421, 2007.

ROYTBLAT, Leonid et al. Raised interleukin-6 levels in obese patients. **Obesity research**, v. 8, n. 9, p. 673-675, 2000.

SAINSBURY, Amanda; ZHANG, L. Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 109-119, 2010.

SALAMONE, John D.; CORREA, Mercè. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. **Neuron**, v. 76, n. 3, p. 470-485, 2012.

SARNYAI, Zoltán; SHAHAM, Yavin; HEINRICHS, Stephen C. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 209-244, 2001.

SASAKI, Tsutomu; MATSUI, Sho; KITAMURA, Tadahiro. Control of appetite and food preference by NMDA receptor and its co-agonist d-serine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1081, 2016.

SEIMON, Radhika V. et al. Do intermittent diets provide physiological benefits over continuous diets for weight loss? A systematic review of clinical trials. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 418, p. 153-172, 2015.

SIMOPOULOS, Artemis P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SHIRAZI, Rozita et al. Glucagon-like peptide 1 receptor induced suppression of food intake, and body weight is mediated by central IL-1 and IL-6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 40, p. 16199-16204, 2013.

SO, Mandy et al. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2011.

SOLFRIZZI, Vincenzo et al. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 11, p. 1694-1704, 2006.

SORATO, Helen Rebelo. Efeitos da redução calórica associada ao treinamento resistido sobre resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação em camundongos com obesidade induzida por dieta. 2019.

SURWIT, R. S. et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and AJ mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645-651, 1995.

SUNDARAM, Sneha; YAN, Lin. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. **Nutrition research**, v. 36, n. 6, p. 603-611, 2016.

SPEZANI, Renata et al. Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 83, p. 108419, 2020.

STEPHAN, Friedrich K. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. **Journal of biological rhythms**, v. 17, n. 4, p. 284-292, 2002.

STENLÖF, Kaj et al. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 9, p. 4379-4383, 2003.

STICE, E. et al. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. **Science**, v. 322, n. 5900, p. 449-452, 2008.

TATULLI, Giuseppe et al. Intermittent fasting applied in combination with rotenone treatment exacerbates dopamine neurons degeneration in mice. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 4, 2018.

TAHARA, Y.; SHIBATA, S. Chronobiology and nutrition. **Neuroscience**, v. 253, p. 78-88, 2013.

TIMPER, Katharina et al. IL-6 improves energy and glucose homeostasis in obesity via enhanced central IL-6 trans-signaling. **Cell reports**, v. 19, n. 2, p. 267-280, 2017.

TONIAZZO, Ana Paula et al. Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats. **Nutrition**, v. 50, p. 18-25, 2018.

THALER, Joshua P.; SCHWARTZ, Michael W. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4109-4115, 2010.

THIRUPATHI, Anand et al. Modulatory effects of taurine on metabolic and oxidative stress parameters in a mice model of muscle overuse. **Nutrition**, v. 54, p. 158-164, 2018.

TREPANOWSKI, John F. et al. Effects of alternate-day fasting or daily calorie restriction on body composition, fat distribution, and circulating adipokines: secondary analysis of a randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 6, p. 1871-1878, 2018.

TSAI, Ju-Yun et al. Influence of dark phase restricted high fat feeding on myocardial adaptation in mice. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 55, p. 147-155, 2013

VARADY, Krista A. et al. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1138-1143, 2009.

VARADY, K. A. et al. Effects of weight loss via high fat vs. low fat alternate day fasting diets on free fatty acid profiles. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-7, 2015.

VARELA, Luis; HORVATH, Tamas L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBO reports**, v. 13, n. 12, p. 1079-1086, 2012.

VAN DER MERWE, Marie et al. Time of feeding alters obesity-associated parameters and gut bacterial communities, but not fungal populations, in C57BL/6 male mice. **Current Developments in Nutrition**, v. 4, n. 2, p. nzz145, 2020.

VAN DE SANDE-LEE, Simone; VELLOSO, Licio A. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 341-350, 2012.

VOLLMERS, Christopher et al. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21453-21458, 2009.

VOLKOW, Nora D. et al. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D2receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 409-415, 1999.

WANG, Jiali et al. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2786-2791, 2001.

WANG, Huei-Bin et al. Time-restricted feeding improves circadian dysfunction as well as motor symptoms in the Q175 mouse model of Huntington's disease. **Eneuro**, v. 5, n. 1, 2018.

WANG, Chao-Yung; LIAO, James K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. In: **mTOR**. Humana Press, 2012. p. 421-433.

WALKER, Deena M. et al. Adolescence and reward: making sense of neural and behavioral changes amid the chaos. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 45, p. 10855-10866, 2017.

WEDELL-NEERGAARD, Anne-Sophie et al. Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: roles of inflammation and abdominal obesity. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194991, 2018.

WILLIAMS, Gareth et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 683-701, 2001.

WILLIAMS, Lynda M. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 521-533, 2012.

WILSON, Robin A. et al. Intermittent fasting with or without exercise prevents weight gain and improves lipids in diet-induced obese mice. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 346, 2018.

WHO (World Health Organization). Newsroom. Obesity and overweight. 2018. Acesso em 07 de janeiro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>.

WUEEST, Stephan et al. Interleukin-6 contributes to early fasting-induced free fatty acid mobilization in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, n. 11, p. R861-R867, 2014.

YAMASHITA, Alex S. et al. Regulation of metabolic disease-associated inflammation by nutrient sensors. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

ZARRINPAR, Amir et al. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. **Cell metabolism**, v. 20, n. 6, p. 1006-1017, 2014.

ZHANG, X. et al. Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. **Redox Biology**, v. 32, p. 101535, 2020.

ZUCKER, Irving. Light-dark rhythms in rat eating and drinking behavior. **Physiology & Behavior**, v. 6, n. 2, p. 115-126, 1971.

ANEXO

Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRGS)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 43150

Título: EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA MODULAÇÃO DO CONTROLE ALIMENTAR HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO EM RATOS WISTAR INDUZIDOS À OBESIDADE POR DIETA

Vigência: 01/10/2022 à 30/06/2024

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Rachel Krolow Santos Silva Bast - coordenador desde 01/10/2022
Rodrigo de Oliveira Corrêa da Cunha Herrmann - desde 01/10/2022
Ricardo Maia Dantas - desde 01/10/2022
Aline Cândida Ferreira - desde 01/10/2022
ANA CAROLINE SILVA SILVEIRA - desde 01/10/2022
Ariadni Mesquita Peres - desde 01/10/2022
Thiago Ângelo Smaniotto - desde 01/10/2022
Lais Thiele Felipe - Auxiliar de Laboratório desde 01/10/2022

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Projeto N°43150 - Efeito do jejum intermitente na modulação do controle alimentar homeostático e hedônico em ratos Wistar induzidos à obesidade por dieta, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de solicitam 96 ratos Wistar (48 machos e 48 fêmeas) com 21 dias de idade provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 2 de Dezembro de 2022

MAITE DE MORAES VIEIRA
Coordenador da comissão de ética