

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

ANA CAROLINA OLIVEIRA COSTA

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR E METABOLISMO EM RATOS A PARTIR DE
MUDANÇAS DA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO E/OU COMPOSIÇÃO
DIETÉTICA**

RECIFE

2017

ANA CAROLINA OLIVEIRA COSTA

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR E METABOLISMO EM RATOS A PARTIR DE
MUDANÇAS DA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO E/OU COMPOSIÇÃO
DIETÉTICA**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Elizabeth do Nascimento

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Lopes de Souza

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C837c Costa, Ana Carolina Oliveira.
Comportamento alimentar e metabolismo em ratos a partir de mudanças da disponibilidade de alimento e/ou composição dietética / Ana Carolina Oliveira Costa.– 2017.
84 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Elizabeth do Nascimento.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Ritmo circadiano. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Comportamento alimentar. 4. Metabolismo. I. Nascimento, Elizabeth do (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-153)

ANA CAROLINA OLIVEIRA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição, área de concentração bases experimentais.

COMPORTAMENTO ALIMENTAR E METABOLISMO EM RATOS A PARTIR DE MUDANÇAS DA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO E/OU COMPOSIÇÃO DIETÉTICA

Dissertação aprovada em: 21/02/2017

Prof^a. Dr^a. Gisélia de Santana Muniz
Departamento de Nutrição/UFPE

Prof^a. Dr^a. Matilde Cesiana da Silva
Centro Acadêmico de Vitória/UFPE

Prof^a. Dr^a. Rhowena Jane Barbosa de Matos
Centro Acadêmico de Vitória/UFPE

**RECIFE
2017**

Dedico esse trabalho aos meus pais Paulo e Ilza, e minha irmã Gabriela pela confiança, amor e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de realizar um sonho que é o mestrado.

Agradeço aos meus pais Paulo e Ilza por toda dedicação, amor, carinho, compreensão e confiança.

Agradeço à minha irmã Gabriela por todo amor e pelas palavras que me fizeram permanecer em busca desse sonho.

Agradeço a toda minha família que sempre me apoiou.

Agradeço as minha amigas Andressa, Geirla e Sarah que mesmo distantes se fizeram presentes durante todo esse processo.

Agradeço aos meus colegas de mestrado que enfrentaram todas as dificuldades para alcançar seus objetivos.

Agradeço as minhas orientadoras professoras Elizabeth e Sandra pela confiança e apoio.

Agradeço à Izabel e Skalyt que estiveram comigo desde o início dos experimentos até o final deles, assim como seus familiares que as acompanhavam.

Agradeço a todos que me ajudaram diretamente nos experimentos Cornélio, Mariana, Nathalia Cavalcanti, Nathália Melo, professora Gisélia e professora Elizabeth.

Agradeço ao senhor França e ao Bruno que me ajudaram no biotério.

Agradeço a Fernando, a Cecília e todas as funcionárias da PPGN pela disponibilidade de ajudar.

Agradeço as minhas amigas Jacqueline e Rafaely por toda ajuda e compreensão.

Agradeço as minhas amigas Alyne e Aleksandra pela torcida e apoio.

Agradeço aos animais que doam sua vida pela ciência.

RESUMO

A modificação dos hábitos alimentares tanto em composição dietética como energética, ou ainda, mudanças dos horários das refeições podem contribuir para as alterações dos parâmetros metabólicos e comportamentais. O comportamento alimentar envolve aspectos psicológicos, operacionais e eventos fisiológicos periféricos e metabólicos. Este é controlado por demandas internas e pode ser modulado por características do ambiente externo (ex.: desnutrição perinatal e desmame precoce). Para análise desse comportamento em ratos, utiliza-se a sequência comportamental de saciedade. Hipotetizou-se que a inadequação dietética e alteração no período de disponibilidade de alimento causariam distúrbios de forma individual ou em associação em parâmetros comportamentais, metabólicos e no padrão alimentar. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da alteração da disponibilidade do alimento segundo as fases claro/escuro do ciclo 24hs e/ou da composição dietética sobre o ritmo alimentar, preferência e comportamento alimentar, e parâmetros metabólicos. Inicialmente utilizou-se 40 ratos machos da linhagem *Wistar* que aos 60 dias de vida formaram 4 grupos: GC- Grupo Controle; GRC- Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; GO- Grupo Ocidentalizada; GRO- Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade. Os GC e GO receberam dieta *ad libitum*, os GRC e GRO tiveram alteração da disponibilidade (sem acesso ao alimento nas primeiras 8 horas da fase escura) de alimento por um período de 120 dias. Os parâmetros avaliados foram: peso corporal, ritmo de consumo alimentar, curva glicêmica de 24 horas, teste oral de tolerância à glicose (TOTG), sequência comportamental de saciedade, teste de preferência alimentar, peso de órgãos e gordura abdominal. Os resultados demonstraram que o consumo de dieta ocidentalizada levou ao aumento do peso (16%) e das medidas corporais; reduziu a ingestão alimentar (40%) e energética (30%), mas, elevou a curva glicêmica, alterou o TOTG na fase clara, a SCS e elevou a quantidade de gordura abdominal (75%). A restrição de alimento durante 8hs da fase escura do ciclo reduziu o peso corporal do grupo GRC em 23% comparado ao GC, mas não no GRO comparado ao GO. O GRO exibiu um peso 25% maior que o GRC mesmo ingerindo 60% menos alimento que o GRC. Por outro lado, a alteração da disponibilidade de dieta modificou o ritmo e o padrão de consumo alimentar nas fases do ciclo em ambos os grupos, modificou a curva glicêmica, sobretudo no grupo GRC que mostrou diferenças entre as fases clara e escura do ciclo, além de aumento do peso do estômago. Ademais, alterou a SCS e a preferência alimentar em ambos os grupos restritos, onde o GRC mostrou preferência para carboidratos e o GRO para lipídios. Curiosamente, o grupo GRO mesmo com reduzida ingestão alimentar mostrou alta quantidade de gordura na região abdominal, com 80% a mais de depósito que o GRC. Conclui-se que a dieta ocidentalizada mesmo sem elevação da quantidade ou de energia altera o peso, o comportamento alimentar e o metabolismo. E, que a restrição imposta aos grupos causa alterações metabólicas distintas conforme a composição dietética.

Palavras-chave: Ritmo Circadiano. Dieta Hiperlipídica. Comportamento Alimentar. Metabolismo.

ABSTRACT

Modification of dietary habits in both dietary and energetic composition, or changes in meal times may contribute to changes in metabolic and behavioral parameters. The eating behavior involves psychological, operational aspects and physiological peripheral and metabolic events. This is controlled by internal demands and can be modulated by characteristics of the external environment (ex.: perinatal malnutrition and early weaning). For the analysis of this behavior in rats, the behavioral satiety sequence is used. It was hypothesized that dietary inadequacy and alteration in the period of food availability would cause disorders individually or in association with behavioral, metabolic and food patterns. The aim of the study was to evaluate the effects of changes in food availability according to the light / dark phases of the 24h cycle and/or the dietary composition on rhythm, dietary preferences, behavior and metabolic parameters. Initially 40 male *Wistar* rats were used, which at 60 days of age formed four groups: GC- Control Group; GRC- Commercial Ration Group Availability Change; GO- Westernized Group; GRO- Westernized Ration Group Availability Change. GC and GO received a free diet, since GRC and GRO had a variation in food availability over (no access to food in the first 8 hours of the dark phase) a period of 120 days. The parameters evaluated were: body weight, food consumption rhythm, 24-hour glucose curve, oral glucose tolerance test (OGTT), behavioral satiety sequence, food preference test, organ weight and abdominal fat. The results showed that the Westernized diet caused weight gain (16%) and body measurements; reduced food intake (40%) and energy intake (30%), but elevated a glycemic curve, altered OGTT in the light phase, the BSS and increased abdominal fat (75%). Feed restriction during 8hs of the dark phase of the cycle reduced body weight of the GRC group by 23% compared to GC, but not GRO compared to GO. The GRO exhibited a 25% higher weight than the GRC even though it consumed 60% less food than GRC. On the other hand, a change in the availability of diet modified the rhythm and the pattern of food consumption in the phases of the cycle in both groups, modified a glycemic curve, mainly no GRC group that showed the differences between the phases light and dark of cycle, besides increasing the weight of the stomach. In addition, it changed BSS and food preference in both restricted groups, where GRC showed preference for carbohydrates and GRO for lipids. Interestingly, the GRO group even with reduced food intake showed high amounts of fat in the abdominal region, with 80% more storage than GRC. It is concluded that the westernized diet even without quantity or energy elevation alters weight, feeding behavior and metabolism. And, that the restriction imposed on distinct metabolic causes groups conform to the dietary composition.

Key words: Circadian Rhythm. High-Fat Diet. Feeding Behavior. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Desenho experimental do estudo segundo dietas, período e grupos formados..... Pg. 32
- FIGURA 2 –** Esquema de avaliação do padrão circadiano da curva da glicemia e do consumo alimentar dos animais experimentais..... Pg. 35

RESULTADOS

- FIGURA 1-** Peso corporal; ganho de peso dos animais aos 60-120 dias de vida; ganho de peso dos animais aos 120-180 dias de vida por grupo durante o período experimental de acordo com a dieta e a disponibilidade de alimento..... Pg. 40
- FIGURA 2-** Medidas murinométricas intragrupos aos 60 dias de vida..... Pg. 41
- FIGURA 3-** Medidas murinométricas intragrupos aos 180 dias de vida..... Pg. 42
- FIGURA 4-** Ritmo circadiano da alimentação (g%); consumo alimentar relativo médio (g%); ingestão energética relativa média a cada 4 horas ao longo de 3 dias segundo dieta e alteração da disponibilidade de alimento..... Pg. 44
- FIGURA 5-** Ingestão relativa (g/100g e kcal/100g) intragrupos segundo as fases de claro e de escuro durante 3 dias..... Pg. 45
- FIGURA 6-** Curva glicêmica de um ciclo de 24 horas intergrupos..... Pg. 46
- FIGURA 7-** Curva glicêmica por fase intragrupos..... Pg. 47
- FIGURA 8-** Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e área sob a curva de glicose intragrupos segundo a fase de claro e de escuro..... Pg. 49
- FIGURA 9-** Teste de preferência alimentar intragrupos ao final do experimento segundo dietas com predominância de macronutrientes..... Pg. 50
- FIGURA 10-** Sequência comportamental de saciedade de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração. Os períodos correspondem aos 12 intervalos de tempo de 5 minutos que compõem o teste. As colunas representam a proporção do número total de observações para cada comportamento por cada intervalo de tempo..... Pg. 51
- FIGURA 11-** Sequência comportamental de saciedade de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração. As linhas correspondem a duração (s) dos comportamentos (alimentação, limpeza, descanso) em cada 12 x 5 min intervalos do teste. A linha vertical representa o ponto de transição entre o comportamento de alimentação e o de descanso..... Pg. 52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição de macronutrientes segundo o Valor energético total (VET) da dieta ocidentalizada baseada na AIN-93 para roedores e da dieta comercial..... Pg. 33

TABELA 2. Composição centesimal da dieta experimental ocidentalizada..... Pg. 33

TABELA 3. Composição de macronutrientes das dietas hiperglicídica, hiperproteica e hiperlipídica utilizadas no teste de preferência alimentar agudo..... Pg. 38

RESULTADOS

TABELA 1. Peso relativo de órgãos e gordura visceral de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade de ração..... Pg. 50

TABELA 2. . Parâmetros da microestrutura da refeição de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração..... Pg. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGRP	neuropeptídeo Agouti	12
CE	Claro/Escuro	31
<i>Bmal1</i>	gene “do relógio” <i>brain and muscle ARNT-like protein 1</i>	21
CART	transcrito relacionado à cocaína e anfetamina	12
CCK	Colecistoquinina	65
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis	12
FAA	<i>Food Anticipatory Activity</i>	23
FEO	<i>Food-Entrainable Oscillator</i>	21
GABA	Ácido gama amino-butírico	16
IMC	Índice De Massa Corporal	34
LEO	<i>Light-Entrainable Oscillator</i>	20
LP	Dieta hipoproteica	26
NPY	neuropeptídeo Y	12
NSQ	Núcleo Supraquiasmático	20
<i>Orx</i>	Gene	66
<i>Per1</i>	gene “do relógio” <i>period 1</i>	21
<i>Per2</i>	gene “do relógio” <i>period 2</i>	21
POMC	peptídeo pro-opiomelanocortina	12
SCS	Sequência Comportamental de Saciada	18
SNC	Sistema Nervoso Central	21
TTOG	Teste de Tolerância Oral à Glicose	35
ZT	“Zeitgeber Time”	27

Grupos Experimentais

GC	Grupo controle
GRC	Grupo ração comercial alteração da disponibilidade
GO	Grupo ocidentalizada
GRO	Grupo ração ocidentalizada alteração da disponibilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	COMPORTAMENTO ALIMENTAR E SEQUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE	15
2.2	RITMO CIRCADIANO E ALIMENTAÇÃO	20
2.3	INFLUÊNCIA DA DIETA NA ALTERAÇÃO DO RITMO E DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR	24
3	HIPÓTESES	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	MÉTODOS	31
5.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
5.2	COMPOSIÇÃO E HORÁRIO DE DISPONIBILIDADE DA DIETA	32
5.3	AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL	34
5.4	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO SOMÁTICO	34
5.4.1	Avaliação antropométrica	34
5.4.2	Índice de Massa Corporal	34
5.5	CONSUMO ALIMENTAR E CURVA GLICÊMICA	34
5.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	35
5.7	TESTE COMPORTAMENTAL: SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE	36
5.8	TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR	37
5.9	AVALIAÇÃO DA GORDURA CORPORAL E PESAGEM DE ÓRGÃOS	38
6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
7	RESULTADOS	40
8	DISCUSSÃO	54
9	CONCLUSÃO	68
	Referências	69
	Apêndice	81
	APÊNDICE A – Sequência Comportamental de Saciedade	82
	Anexo	83
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	84

1 INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares sofreram influência do estilo de vida e das facilidades do mundo contemporâneo favorecendo o aumento da ingestão energética. Associado ao aumento energético encontra-se a sobrecarga de carboidratos simples, sódio e lipídios, destacando os saturados e os ácidos graxos trans, sendo conhecida como dieta “ocidentalizada” ou de “*fast-food*” (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006; MENDONÇA; ANJOS, 2004).

A nova tendência alimentar com alto consumo de gorduras e/ou açúcares, consequentemente associa-se o aumento da síntese de gordura corporal e aumento da circulação de frações lipídicas a exemplo do triglicerídeo, colesterol total e lipoproteínas de alta densidade. Em conjunto gera acúmulo excessivo de gordura corporal, sobrepeso/ obesidade, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (SANTOS et al, 2010).

A regulação do comportamento alimentar é pensado para ser um sistema de alvo chave para o tratamento e prevenção da obesidade (ADAMS et al, 2008). Este sistema de regulação em vertebrados é atualmente considerado como constituído por uma rede composta de neuropeptídeos e hormônios que parecem residir no hipotálamo (SCHWARTZ et al, 2000). Entre os neuropeptídeos que são expressos no hipotálamo e são conhecidos por inibirem o comportamento alimentar, são o fator liberador de corticotrofina, a transcrição regulada pela cocaína e anfetamina (CART), o hormônio estimulante dos melanócitos, a pró-opiomelanocortina (POMC) (OWENS; NEMEROFF, 1991; BECK, 1992). Em contraste, o neuropeptídeo Y (NPY), a galanina, a proteína relacionada ao agouti (AgRP), o hormônio de concentração da melanina e as orexinas parecem estimular a ingestão de alimentos em vários paradigmas de alimentação (GROPP et al, 2005; BECK, 2006; NAHON, 2006).

O ciclo da alimentação (períodos de fome e saciedade) é um ritmo biológico que ocorre ao longo de 24 horas, mas é altamente influenciado pelos fatores ambientais, como horário de trabalho e de sono. Portanto, não apenas o que selecionamos para comer, mas, quando ou em que horário o comemos, correlaciona-se com o desenvolvimento da obesidade (ARBLE et al, 2009; BARON et al, 2011). Na maioria dos indivíduos, o desjejum consiste de uma pequena

refeição que contribui com cerca de 16 a 18% da ingestão energética diária. Na sociedade ocidental, o jantar passa a constituir a maior refeição energética contribuindo com 35 a 36% das calorias diárias (US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2012). Este aumento da ingestão calórica noturna geralmente influencia ou leva a redução do apetite matinal.

Em um estudo realizado com população adulta de ambos os sexos residentes da zona urbana de Pelotas (Rio Grande do Sul - RS), investigou-se a prevalência e os fatores que determinam ou estão associados à obesidade. Dentre as variáveis pesquisadas, o número de refeições diárias, apresentou relação inversa com a obesidade, sendo essa relação estatisticamente significativa entre o sexo feminino. A maior parte dos entrevistados referiu consumir até 3 refeições por dia. De acordo com o estudo a variável pode ser considerada um marcador de risco uma vez que uma alta concentração energética em uma única refeição pode estar associada com mais rápido acúmulo de gordura (GIGANTE et al, 1997). No estudo, a contribuição energética e a periodicidade das refeições não foram mencionadas.

O ritmo alimentar foi relatado em humanos (SCHEER; MORRIS; SHEA, 2013) e em animais (NASCIMENTO et al, 2013), mostrando semelhanças entre ambos. Em humanos, ritmo circadiano da fome mais robusto foi observado às 7h50min da manhã e às 20h50min da noite (SCHEER; MORRIS; SHEA, 2013). Em ratos, são exibidos dois horário de picos que coincidem com o início e o final do período de vida ativa desses animais (NASCIMENTO et al, 2013).

Dentre os ritmos biológicos, os mais facilmente observados são os ritmos circadianos. Definidos como aqueles que se repetem com periodicidade ao redor de 24 horas (BELISIO et al, 2012). Assim, tanto em humanos como em ratos, a curva circadiana da alimentação mostra-se de forma bastante similar, comprovando o ritmo endógeno da ingestão de alimentos.

O comportamento por sua vez, pode ser compreendido tanto como uma junção de fatores filogenéticos, que atuam durante o processo de evolução de uma dada espécie, quanto de fatores ontogenéticos, que operam nas interações de um dado organismo dessa espécie com seu ambiente (CATANIA, 1999). O comportamento alimentar pode ser definido como uma resposta adaptativa ao aparecimento de demandas do ambiente interno e modulado por características proeminentes do ambiente externo (ISHII et al, 2003). Portanto, comportamento

alimentar vai além da ingestão de alimentos. Em ratos especificamente, o comportamento alimentar envolve uma sequência de comportamentos expressos pelo animal que pode ser modificada por fatores como a desnutrição perinatal (OROZCO-SÓLIS et al, 2009) ou composição dietética (MELHORN et al, 2010).

Apesar do conhecimento de que alguns fatores atuam como moduladores da sequência comportamental de saciedade, por exemplo, a composição dietética, ainda é desconhecida como a alteração da disponibilidade de ração ao longo do ciclo de 24 horas pode modifica-la, tanto na dieta com adequadas proporções de macronutrientes quanto em dieta com alterada distribuição de macronutrientes (ex.: dieta ocidentalizada).

Portanto, a proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da alteração da disponibilidade do alimento segundo as fases claro/escuro do ciclo 24hs e/ou da composição dietética sobre o ritmo alimentar, parâmetros metabólicos e aspectos do comportamento alimentar.

A disponibilidade de ração foi alterada mimetizando hábitos alimentares de indivíduos que não costumam realizar as refeições em horários regulares e costumam alimentar-se mais no período destinado ao descanso. O escopo foi avaliar tanto com dieta padrão quanto com a dieta alterada em sua composição nutricional e energética. Os resultados poderão respaldar a existência de outros fatores relacionados ao risco ao desenvolvimento de distúrbios que envolvem o balanço energético do organismo.

Pretende-se publicar dois artigos originais em revista com fator de impacto acima de 1,06.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E SEQUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE

O comportamento alimentar é controlado pela interação entre eventos psicológicos (percepção de fome, ânsias, sensações hedônicas), operações comportamentais (ingestão de refeições, lanches, energia e macronutrientes), e eventos fisiológicos periféricos e metabólicos, além dos níveis de neurotransmissores e de interações metabólicas no cérebro (BLUNDELL; GOODSON; HALFORD, 2001).

Dois mecanismos distintos, porém relacionados, explicam a regulação da ingestão alimentar, são eles: mecanismos homeostáticos e mecanismos não homeostáticos ou hedônicos (LUTTER; NESTLER, 2009; EGECIOGLU et al, 2011). O sistema homeostático inclui reguladores hormonais da fome, saciedade e dos níveis de adiposidade. Nesse tipo de sistema, hormônios como leptina, grelina e a insulina atuam em circuitos cerebrais hipotalâmicos e do tronco cerebral, estimulando ou inibindo a fome, de forma a manter um balanço energético adequado. Também desempenha um papel importante na ingestão alimentar, o sistema hedônico ou do circuito de recompensa (prazer) (LUTTER; NESTLER, 2009; KENNY, 2011). Em geral, alimentos poucos saborosos não são consumidos em excesso; enquanto os alimentos considerados palatáveis são frequentemente consumidos mesmo após as necessidades energéticas terem sido atingidas (KENNY, 2011), justamente porque o controle hedônico pode se sobrepôr ao controle homeostático. Alterações no tamanho ou na frequência da refeição têm sido apontadas como fatores modulados pela composição dietética da refeição (MELHORN et al, 2010). A gordura, por exemplo, é conhecida por proporcionar alto teor de saciedade, mas, baixo poder de saciação.

A ingestão de alimentos e o metabolismo destes nutrientes são controlados por sistemas neuroquímicos e neuroendócrinos específicos. Modificações nesses

sistemas podem correlacionar-se as alterações no comportamento alimentar (CAMBRAIA, 2004).

O hipotálamo está envolvido em diversas atividades ligadas a alimentação, como: auto-seleção de alimentos, no estresse alimentar, no paladar e na aprendizagem aversiva (BERNARDIS; BELLINGER, 1996). O hipotálamo lateral especificamente está associado aos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico, envolvido no controle circadiano da alimentação. Já o hipotálamo basomedial e a expressão gênica do neuropeptídeo Y estão envolvidos de forma direta com o aumento na ingestão de alimentos (WHITE; DEAN; MARTIN, 1998).

O controle da ingestão energética e a preferência por gordura tem participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Um estudo com animais demonstrou que a alta preferência por gordura pode está relacionada a sensibilidade exacerbada ao hormônio liberador da corticotropina (HERMINGHUYSEN et al, 1998).

No controle da alimentação também há uma participação do hipocampo, exercendo funções na motivação para consumo de alimentos. Não há influência no total de alimento ingerido em animais com ablação do bulbo olfatório, entretanto o padrão alimentar desses animais é afetado ocasionando uma redução no tamanho da refeição e gerando uma compensação em número de refeições, além de um aumento na atividade de cheirar durante e entre refeições (MEGUID; GLEASON; YANG, 1993).

A nível neuroquímico, a ação do ácido gama amino-butírico (GABA), da noradrenalina e do neuropeptídeo Y associados com corticosterona e glicose circulantes no sangue parecem estar envolvidos no balanço da ingestão de carboidrato. Sendo a região medial do hipotálamo um dos locais de ação dessas substâncias no cérebro.

A ingestão de gordura é controlada por um grupo específico de substâncias que agem no hipotálamo medial. Dentre essas substâncias incluem o peptídeo galanina, peptídeos opióides e o mineralocorticoide aldosterona que potencializam a ingestão de gordura sendo essa ação maior nas últimas horas do ciclo alimentar, podendo ocorrer independente da ação da corticosterona (BARTON; YORK; BRAY, 1996).

Os mecanismos de controle da ingestão alimentar envolvem uma série de interações morfológicas, moleculares e funcionais. Na regulação desse processo, numerosos peptídios agem como neurotransmissores ou peptídeos hormonais (MORLEY, 1987). Portanto, a alimentação está sob o controle de um sistema central que é regulado pelo equilíbrio entre monoaminas e neuropeptídios. Nos quais os estoques de seus precursores dietéticos influenciam os níveis e as possíveis funções de diversos neurotransmissores. As aminas biogênicas (serotonina, dopamina, noradrenalina, histamina) fazem parte dos principais neurotransmissores, são formadas a partir de triptofano, tirosina e histidina, além de acetilcolina e glicina que podem constituir-se a partir de colina e treonina (YOUNG, 1996). Alguns estudos com animais sugerem que a serotonina também esteja envolvida no controle da ingestão alimentar, a qual em altos níveis diminui a ingestão energética total, ou de forma seletiva reduz a preferência de carboidrato em relação à proteína (HOLDER, 1990; LEIBOWITZ, 1992). Dentre outras implicações da histamina, é um neurotransmissor que suprime o apetite (KUROSE; TERASHIMA, 1999). Isso porque, a histamina inibe a liberação de noradrenalina no hipotálamo, suprimindo a ingestão alimentar e demonstrando sua ação anorética (MORIMOTO; YAMAMOTO; YAMATODANI, 2001).

Algumas propriedades sensoriais do alimento são priorizadas sobre os aspectos fisiológicos internos, no controle da ingestão alimentar (SWIERGIEL; CABANAC, 1989; ACKROFF; SCLAFANI, 1996). Modificação na densidade energética das dietas provoca efeito no comportamento alimentar do rato, da mesma forma que o padrão alimentar é afetado por algumas propriedades dos alimentos. Receptores do paladar participam sensorialmente da ingestão de alimentos regulando o comportamento e a homeostase corporal. A gustação ou sentido do paladar é um mecanismo quimiosensório primário que detecta e identifica muitos estímulos em humanos e animais. O consumo de alimento e a motivação para comer podem ser afetados pelos sons associados à alimentação, assim como características do próprio alimento e a exposição ao odor também influenciam a preferência pela dieta (STETTER et al, 1995; MACHT, 1998).

O alimento é ingerido após a percepção da fome sendo a ingestão finalizada quando a sensação de saciedade é atingida, isto é, sob condições usuais. Distintos sistemas são responsáveis pelo início e o término do consumo de alimentos, cada

um é regulado por sinais de respostas oriundos do sistema central e periférico, que incluem a trato gastrointestinal, fígado, cérebro e sistemas sensoriais periféricos. A secreção hormonal pode ser afetada pela dieta que conseqüentemente influencia o comportamento. Após o consumo de uma refeição, o trato gastrointestinal parece ter maior participação na saciedade (estado do organismo no qual a alimentação é inibida, geralmente após alimentado) e no controle da duração da saciedade (BURTON-FREEMAN; GIETZEN; SCHNEEMAN, 1997). A saciedade pode ser descrita pela duração e/ou tamanho da refeição.

Em ratos, a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) é um eficiente método para analisar o comportamento alimentar (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998; OLIVEIRA; SOUZA; MANHÃES-DE-CASTRO, 2011). A SCS foi utilizada pela primeira vez em 1975 como um modelo experimental para estudo da saciedade e é o nome dado às transições de medidas ordenadas de alimentação, atividade de limpeza e descanso durante o período pós ingestão (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998).

Embora uma redução ou um aumento na ingestão de alimentos reflita um efeito sobre o processo saciação/saciedade, a mensuração do consumo de alimento por si só não permite determinar se essas mudanças são devido a uma alteração de mecanismos fisiológicos que regulam a ingestão de alimentos, ou a efeitos não específicos (sedação, hiperatividade, náuseas, palatabilidade ou aumento da saciedade) (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998).

A SCS é definida como uma forma mais rigorosa de observação contínua que permite que a verdadeira duração e a real frequência de cada comportamento possam ser determinadas. Observação contínua pode ser utilizada para determinar se os perfis associados com a redução da ingestão de alimentos são causados por náuseas, sedação, hiperatividade, ou alterada palatabilidade dos alimentos. Este tipo de análise comportamental pode melhorar a compreensão do complexo psicológico e fisiológico envolvido na regulação do comportamento alimentar (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998; OLIVEIRA et al, 2011). Em uma revisão da literatura, foi demonstrado que a SCS mostrou ser uma ferramenta sólida para estudar manipulações no comportamento alimentar (OLIVEIRA; SOUZA; MANHÃES-DE-CASTRO, 2011).

Estudos realizados com SCS mostraram influência da desnutrição perinatal (OROZCO-SÓLIS et al, 2009), do desmame precoce em ratos adultos (OLIVEIRA et al, 2011) e em função do ciclo de luz/escuridão (TALLETT; BLUNDELL; RODGERS, 2009) sobre o comportamento alimentar.

Através dos estudos com SCS foi observado que a desnutrição proteica durante a gestação e lactação promovia na prole jovem hiperfagia associada ao aparecimento tardio da saciedade, um aumento no tamanho da refeição e redução da latência para comer (tempo gasto para iniciar a alimentação). Em associação, os autores também encontraram no grupo desnutrido uma elevada expressão de peptídeos orexígenos (proteína Agouti e neuropeptídeo Y) e uma redução na expressão de peptídeos anorexígenos (pró-opiomelanocortin) no hipotálamo. Em uma segunda avaliação da SCS aos 180 dias de vida, os ratos do grupo desnutrido persistiram com um maior tamanho de refeição comparado ao grupo controle, mas sem alteração na quantidade de alimentos consumidos diariamente (OROZCO-SÓLIS et al, 2009).

Oliveira et al (2011) estudando o efeito do desmame precoce em ratos adultos sobre o comportamento alimentar, observaram que o grupo desmamado precocemente (ao 15º dia de vida pós-natal) não exibiam alteração na ingestão de alimentos mas apresentaram atraso no disparo da saciedade quando comparado ao grupo desmamado mais tardiamente (30º dia de vida pós-natal).

A SCS também foi estudada segundo as fases de claro e escuro no ciclo 24hs (TALLETT; BLUNDELL; RODGERS, 2009). Ratos machos foram testados quando a ingestão de alimentos e a SCS durante as fases clara e escura do ciclo e mostraram pouco impacto sobre a ingestão de alimentos ou outras medidas de comportamentos (alimentar ou não). Contudo, diferenças foram encontradas na locomoção, higiene e limpeza (maior na fase escura).

Essas pesquisas demonstraram que alguma modificação de variáveis ambientais pode provocar mudanças comportamentais e no ritmo alimentar circadiano.

2.2 RITMO CIRCADIANO E ALIMENTAÇÃO

Variações diárias, fisiológicas e comportamentais são dependentes de oscilações endógenas que se ajustam a variações cíclicas do ambiente externo. A expressão comportamental, por conseguinte, se expressa de forma oscilatória (recorrente) em várias frequências (BELISIO et al, 2012). A alimentação, por exemplo, é considerada uma variável biológica de recorrência periódica, ou o que se chama de ritmo biológico.

Uma das variáveis ambientais sincronizadoras dos ritmos biológicos refere-se aos estímulos não fóticos (não mediados pela luz). São estímulos não fóticos: mudança de gaiola, entrada do pesquisador no biotério, ciclo estral, horário da alimentação (BOULOS; TERMAN, 1980; BOULOS et al, 1996; MROSOVSKY, 1996; REFINETTI, 2004; MELO et al, 2006; BELISIO et al, 2012).

Na natureza, os animais vivem ajustados a essas mudanças ambientais periódicas e tal ajuste é denominado sincronização. Quando um ritmo está sincronizado a um zeitgeber, diz-se que o ritmo mantém uma relação de fase estável com a variável ambiental. Por exemplo, o momento (fase) de início da atividade está atrelado ao início do dia (nascer do sol) na espécie *Callithrix jacchus* (sagui comum). Para rato, no entanto, o início da fase de claro está relacionado com o início de sua fase de repouso.

Há também os estímulos fóticos, isto é, mediados pela luz. A estrutura que recebe essas informações fóticas é chamada de núcleo supraquiasmático (NSQ), está localizado no hipotálamo, além de “marcapasso ou oscilador central”, é considerado um elemento do sistema de sincronização pela luz (LEO, do inglês *Light-Entrainable Oscillator*). O NSQ recebe informações da retina e as transmite para um grupo seletivo de áreas do encéfalo. Entretanto as projeções do NSQ não explicam todas as alterações fisiológicas e comportamentais em resposta ao ciclo claro/escuro (LU et al, 2001; CHOU et al, 2003; CAVALCANTE, 2008). Porém, o controle da duração das fases clara e escura ao longo de 24 horas afeta consistentemente a ritmicidade circadiana. Outras variáveis que podem interferir na expressão da ritmicidade circadiana são: a temperatura, a umidade e ruídos no ambiente experimental (BELISIO et al, 2012).

Ritmos ou ciclos circadianos são regidos por um sistema conhecido como circadiano, composto por uma integrada rede de estruturas organizadas hierarquicamente para a geração de ritmos, e, para sua sincronização com o ambiente. Estes ritmos circadianos são controlados por células osciladoras do “oscilador biológico” central que estão localizadas no núcleo supraquiasmático (NSQ). Essas células são sincronizadas pela luz captada pela retina via trato retino-hipotalâmico, que regulam além de outros sistemas, o metabolismo energético, influenciando processos como a ingestão alimentar e a expressão, secreção e atividade de hormônios e enzimas metabólicas através de sinais neuronais e endócrinos (BARCLAY et al, 2012; OISHI; ITOH, 2013). O NSQ é necessário para a expressão de ritmos circadianos endógenos e sincronização à luz, e sua lesão causa perda destes ritmos (VAN ESSEVELDT; LEHMAN; BOER, 2000).

Após a definição de ritmo circadiano outros ritmos foram classificados de acordo com a frequência, são eles: ultradianos (vários ciclos ocorrem em 24 horas, apresentam períodos menores do que 20 horas) e infradianos (um ciclo necessita de mais de 28 horas para ocorrer, têm períodos maiores do que 28 horas) (BELISIO et al, 2012).

Além da sincronização pela luz, a alimentação figura como potente sincronizador de osciladores periféricos (células osciladoras localizadas em estrutura externa ao NSQ). Dentre os tecidos e órgãos periféricos influenciados pela alimentação podem-se citar tecidos como o sangue, o tecido adiposo, o pâncreas e o fígado. A modulação da atividade das “células do oscilador” pela alimentação, e, por conseguinte da expressão gênica, é conhecida como oscilador sincronizado por alimento (do inglês, *Food-Entrainable Oscillator* ou FEO) (DÍAZ-MUÑOZ et al, 2010). Mesmo lesionado o NSQ, a sincronização alimentar continua a influenciar essas estruturas periféricas, sugerindo a existência de osciladores sincronizados pelo alimento (FEO) (KRIEGER; HAUSER; KREY, 1977; STEPHAN; SWANN; SISK, 1979; CAVALCANTE, 2008).

A influência do horário da alimentação como um sincronizador periférico foi investigada através da expressão diária dos genes relógio (*Per1*, *Per2* e *Bmal1*) em várias regiões hipotalâmicas, com a finalidade de determinar se o horário da restrição de alimento afeta os genes do relógio em osciladores externos ao sistema nervoso central (SNC) de forma uniforme. Ratos *Wistar* foram mantidos em restrição

alimentar (duas horas de acesso diário ao alimento) ou com alimentação “ad libitum” durante 3 semanas. O horário de restrição alimentar afetou a expressão dos genes provocando uma mudança de fase, ou seja, uma modificação de acordo com a combinação de núcleos hipotalâmicos e genes direcionados. Esses dados reforçam que os sinais metabólicos ou temporais provocados pela alimentação modificam a organização temporal no hipotálamo (MIÑANA-SOLIS et al, 2010).

Em uma breve revisão sobre sincronizadores alimentares, foi demonstrada em mamíferos uma atividade antecipatória diária aos ciclos de disponibilidade de alimento. Estudos com atividade antecipatória arrastada pelo alimento identificaram essa antecipação como uma forma comportamental do FEO para separar do LEO, localizado no NSQ (CARNEIRO; ARAÚJO, 2012).

Faz sentido pensar que o FEO poderia estar localizado no sistema digestório já que o alimento é a variável ambiental sincronizadora. Entretanto para promover alterações fisiológicas observadas durante a sincronização pelo alimento o “marcapasso” periférico deveria ter comunicação com o sistema nervoso central. No entanto, se as vias que trazem informação visceral fossem destruídas (por vagotomia ou induzidas por capsaicina) a sincronização pelo alimento não seria limitada (COMPERATORE; STEPHAN, 1990; DAVIDSON; STEPHAN, 1998; CAVALCANTE, 2008). Estes achados supõem que o FEO pode não está localizado no sistema digestório (CAVALCANTE, 2008).

Somente quando uma quantidade mínima de calorias é disponibilizada ao animal ocorre a sincronização devido à disponibilidade de alimento (STEPHAN, 1997), apesar da informação gustatória isolada não ser suficiente para gerar sincronização (STEPHAN; DAVIDSON, 1998). Através de diversos hormônios o sistema digestório contata a parte central do sistema nervoso, porém a identidade de um sinal humoral servindo ao propósito de sincronização através do alimento ainda não foi descoberta (CAVALCANTE, 2008).

Quando o alimento é restrito de ratos de laboratório a poucas horas durante a fase clara, observa-se atividade tipicamente noturna, podendo ter sua atividade diurna aumentada (STEPHAN, 2002; CAVALCANTE, 2008). Essa atividade diurna antecipada não se limita ao período de disponibilidade do alimento (EDMONDS, 1977; STEPHAN, 1984) e é conhecida como atividade antecipatória arrastada pelo alimento. Portanto, o alimento interfere no comportamento e na sincronização de

ritmos fisiológicos através da comida a partir da expressão de um oscilador arrastado pelo alimento, FEO (DÍAZ-MUÑOZ et al, 2010). A maior atividade locomotora do animal momentos antes da oferta de alimento, que é conhecida como atividade antecipatória pelo alimento (*food anticipatory activity*- FAA). Além de alterar outros comportamentos e ritmos endógenos como a temperatura corporal e concentração de corticosterona no plasma (FEILLET; ALBRECHT; CHALLET, 2006; YOUNG; BRAY, 2007). Embora tenham propriedades semelhantes aos ritmos circadianos sincronizados pela luz, os ritmos sincronizados pelo alimento não compartilham as mesmas bases neurais (CAVALCANTE, 2008).

Kohsaka et al (2007) demonstraram que animais com restrição de dieta hiperlipídica apenas a fase clara do ciclo desenvolvia atividade antecipatória da alimentação algumas horas antes do horário do dia em que o alimento era disponibilizado. Além desse estudo, existem outros autores que demonstraram que o consumo de uma dieta de alto teor calórico altera a função do oscilador circadiano do mamífero, influenciando o metabolismo dos carboidratos pela amplificação da variação circadiana na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (VIEIRA et al, 2012).

A dessincronização entre os relógios centrais e periféricos como alteração do tempo de ingestão de alimentos e/ou da composição da dieta pode conduzir ao desacoplamento dos relógios periféricos do precursor central provocando em humanos, desenvolvimento de distúrbios metabólicos, incluindo a obesidade e o diabetes tipo 2 (OOSTERMAN et al, 2015).

O leque de evidências na literatura aponta em direção de que a perturbação dos ritmos circadianos pode estar diretamente ligada à regulação do metabolismo energético e de muitas condições patológicas, incluindo distúrbios do sono, depressão, síndrome metabólica e câncer. A hipótese mais plausível é que a regulação do oscilador circadiano ocorra em via dupla. Enquanto os osciladores circadianos regulam várias vias metabólicas, o comportamento e a ingestão alimentar, bem como, a circulação de metabólitos, podem, por sua vez, regularem relógios circadianos periféricos (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2012).

2.3 INFLUÊNCIA DA DIETA NA ALTERAÇÃO DO RITMO E DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A maioria dos países da Ásia, América Latina, África do Norte, Oriente Médio e as áreas urbanas da África Subsaariana têm experimentado uma mudança na estrutura geral do seu padrão alimentar relacionadas com padrões de doenças ao longo das últimas décadas. A principal mudança na dieta inclui um grande aumento no consumo de gordura e adição de açúcar na dieta, muitas vezes um acentuado aumento nos produtos de origem animal contrastando com uma queda no consumo de cereais e fibras. Em muitos aspectos, isso parece ser uma mudança inexorável para a dieta ocidental mais rica em gordura, refletida em uma grande proporção da população que consome mais de 30% da energia proveniente da gordura (POPKIN, 2001).

Características da dieta como desequilíbrio nos nutrientes que a compõe, excessos ou carência de alguns macronutrientes e micronutrientes, têm consequências prejudiciais em curto, médio e em longo prazo nos índices de saúde dos indivíduos. A alimentação atual, nos países ocidentais e industrializados é caracterizada por conter proteínas, gorduras e açúcar em excesso, reduzido teor de fibras vegetais (VIANA, 2002).

No Brasil, o processo da transição nutricional ocorrido nas últimas décadas reflete relevantes alterações nos hábitos alimentares da população. Redução na compra de alimentos agrícolas e expressivos aumentos (em até 40%) na compra de alimentos processados (bolachas e biscoitos, refrigerantes, embutidos) ou ultra processados e comida pronta foram notáveis. Em paralelo, ocorreu aumento na contribuição energética oriunda de gorduras aumentando de 25,8% para 30,5% e da energia proveniente de gorduras aumentando de 25,8% para 30,5% e da energia proveniente de gorduras saturadas aumentou de 7,5% para 9,6% (LEVY, CLARO, MONTEIRO, 2009; WHO, 2008-2013). De acordo com uma pesquisa nacional sobre gastos das famílias com alimentos em 2003, o açúcar adicionado corresponde a 16% a 18% da energia total disponível (FAO, 2004), excedendo a ingestão máxima recomendada em 60-80% (SCHMIDT et al, 2011). Apesar de não existir estimativas sobre a ingestão de gorduras trans no Brasil, em alimentos processados (batatas

fritas, sorvetes e bolachas) são encontrados teores excessivos de ácidos graxos trans nesses alimentos (CHIARA; SICHIERI; CARVALHO, 2003; SCHMIDT et al, 2011). Em concomitância, ocorreu um aumento nos índices de sobrepeso/obesidade e doenças crônicas correlatas (TARDIDO; FALCÃO, 2006)

Esse padrão dietético é denominado de “dieta ocidental”. Estudos em roedores têm reproduzido os efeitos fisiológicos e metabólicos associados com o consumo de um estilo ocidental com dieta de cafeteria (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; ESTRELA et al, 2015), combinando uma dieta comercial contendo alimentos ricos em gorduras e açúcares. Essas dietas experimentais consistiam, principalmente, em quantidades inadequadas de proteínas e não retratam com precisão os padrões de consumo da população humana (CAVALCANTE et al, 2013).

Estudo em animais, correlacionando uma dieta rica em gordura ao ganho de peso corporal, foi descrito pela primeira vez em 1959 através de uma intervenção nutricional com “*high-fat diet*” (do inglês, dieta rica em gordura), isto é, uma proporção elevada de gordura dietética por si conduz ao desenvolvimento de obesidade (MASEK; FABRY, 1959). Na literatura várias dietas com diferentes composições de ácidos graxos estão resumidas com o termo “*high-fat diet*”, levando a uma considerável variabilidade nos resultados (BUETTNER et al, 2006).

Em geral dietas baseadas em ácidos graxos saturados induzem o fenótipo típico de dieta rica em gordura, enquanto que dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados ω -3 exercem efeitos benéficos sobre composição corporal e ação da insulina (STORLIEN et al, 1991; STORLIEN et al, 1996; BUETTNER et al, 2006).

Teste de preferência alimentar realizado em ratos que consumiam dietas com banha (20%) selecionaram mais proteína e menos carboidrato que os ratos alimentados com dietas de óleo de soja (20%). Para determinar se este efeito é específico para a fonte de gordura saturada e para medir as alterações na composição de ácidos graxos de fosfolípidos sinaptossomos, os ratos *Wistar* machos foram alimentados com uma dieta de óleo de soja a 20% ou uma dieta de banha a 20% as duas contendo 24% de proteína e 48% de carboidrato por 2 semanas (GREENWOOD, 1989).

Os ratos foram auto-selecionados a partir de duas dietas com a mesma gordura que foram previamente alimentados, mas com diferentes proteínas e

carboidratos (5% de proteínas, 67% de carboidratos e 55% de proteínas e 17% de carboidratos). Os ratos alimentados com dieta rica em banha selecionaram mais proteína e menos carboidrato do que os ratos alimentados com óleo de soja. A gordura dietética também afetou a composição de ácidos graxos de fosfolípidos sinaptossomos, sendo a fosfatidilcolina mais afetada, e o fosfatidilinositol, mais resistente. Quando os ratos se auto-selecionaram sem exposição prévia às dietas, os ratos alimentados com banha selecionaram mais proteína e menos carboidrato que os ratos alimentados com óleo de soja durante as duas últimas semanas, mas não nas duas primeiras semanas. Quando os ratos foram selecionados a partir de dietas idênticas em composição de proteínas e carboidrato, mas gordura dietética diferente, os ratos consumiram quantidades ligeiramente maiores da dieta com banha em cada nível de proteína. A ingestão relativa de dietas de banha e óleo de soja, no entanto, não variou significativamente com o tratamento da proteína na dieta. Estes resultados confirmam que os ratos alimentados com dietas com gordura saturada selecionam mais proteínas e menos carboidrato que os ratos alimentados com dietas ricas em gordura poliinsaturada e sugerem que esta diferença não é devido ao sabor (GREENWOOD, 1989).

Existem diversas hipóteses relacionando a obesidade aos estilos alimentares. O conceito de estilo alimentar remete-nos para a categorização do comportamento alimentar, considerado como o resultado da influência de fatores psicológicos e sociais (VIANA, 2002). O comportamento alimentar por sua vez envolve o ato de ingestão e aspectos qualitativos relacionados com a seleção e decisão de quais os alimentos serão consumidos. Enquanto que o padrão de ingestão diz respeito aos aspectos quantitativos implícitos na ingestão (VIANA, 2002; VIANA; SINDE, 2002).

A manipulação no comportamento alimentar em animais em função da dieta foi investigado através da sequência comportamental de saciedade nos descendentes de ratos *Sprague-Dawley* alimentados com uma dieta controle (20% de proteína - C) ou uma dieta hipoproteica (8% de proteína - LP) durante a gestação e a lactação. Os filhotes foram alimentados com ração padrão (18% de proteína). Aproximadamente os 60 dias de vida pós-natal, os animais com restrição proteica exibiram hiperfagia caracterizada por um aparecimento tardio de saciedade, um aumento no tamanho da refeição e uma latência reduzida para comer. Os filhotes com restrição proteica também exibiram uma expressão aumentada dos peptídeos

orexígenos (proteína relacionada com Agouti e neuropeptídeo Y) e níveis hipotalâmicos diminuídos do peptídeo anorexígeno pró-opiomelanocortina. Aos 240 dias de vida, os ratos de grupo dietético materno foram divididos em dois subgrupos. Um dos subgrupos, com uma dieta rica em gordura (45% de gordura) e o restante dos animais continuou a ser alimentado com a dieta padrão. Os ratos LP ainda consumiam refeições maiores que os seus homólogos do grupo controle, mas ingeriram diariamente a mesma quantidade de alimento que a prole controle. Exibiram também gordura abdominal aumentada e níveis aumentados de triglicéridos e ácidos graxos no soro. Estas observações indicam que a hiperfagia observada em ratos LP jovens resulta de uma ação diminuída de sinais de feedback negativo crítico para a finalização da refeição e uma eficácia de resposta a sinais que estimulam o início e manutenção da ingestão. Esses resultados também sugerem que a desnutrição perinatal programa a obesidade independente dos seus efeitos sobre o comportamento alimentar (OROZCO-SÓLIS et al, 2009).

Além da influência da ingestão de alimentos sobre o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, alguns estudos têm demonstrado relação entre o ciclo circadiano e o risco de DCNT. Knutsson (2003) encontrou um aumento do risco cardiovascular entre indivíduos que tiveram uma alteração do turno de trabalho para o período noturno. A desregulação do ciclo circadiano pode ser citada como uma explicação para esse achado, visto que trabalhadores noturnos invertem seu período de maior atividade para a noite, turno em que o organismo está biologicamente programado para o descanso (PIMENTA et al, 2012).

O horário de refeições atua como um *Zeitgeber*, neologismo alemão que significa “marcador de tempo”, indicando que as refeições seriam determinadas por uma organização social ou de sincronização do ritmo biológico. O mais importante *Zeitgeber* (ZT) dos ritmos circadianos é o ciclo claro-escuro. No entanto, outros fatores cíclicos como ciclos sociais, temperatura e alimentação, também agem como sincronizadores. Os *Zeitgebers* agem interferindo nas funções digestivas e de absorção e nas variações da concentração de carboidratos, aminoácidos e lipídeos na corrente sanguínea ao longo do dia (HIDALGO et al, 2003).

Em situações de dessincronização da ritmicidade, a partir de mudanças na quantidade, qualidade e horário das refeições repercussões adversas podem atuar sobre o metabolismo e fisiologia endógena culminando com a instalação de

distúrbios metabólicos e risco do surgimento de patologias correlatas, a exemplo do excesso de gordura corporal, resistência insulínica, hiperlipidemia, e outros (OIKE; OISHI; KOBORI, 2014).

A incipiente exploração da influência dos horários e/ou composição dietética sobre desordens do metabolismo ainda é um campo a ser explorado. Recentes estudos mostraram que restrição do período de alimentação durante a fase ativa do animal amplia os osciladores circadianos e agrava distúrbios metabólicos induzidos por dietas com maior teor de gordura sem redução da ingestão calórica, e que a alimentação irregular por si só, induz diversas disfunções metabólicas. Assim, os estudos nutricionais que avaliam a influência do sistema circadiano nestas repercussões têm constituído um novo ramo de investigação na ciência da nutrição, a crononutrição (OIKE; OISHI; KOBORI, 2014).

Portanto, este estudo tem como escopo avaliar os efeitos da alteração da disponibilidade de alimento segundo o ciclo claro/escuro e/ou da composição dietética sobre o estado nutricional, ritmo e preferência alimentar, parâmetros metabólicos e aspectos do comportamento alimentar em ratos adultos.

3 HIPÓTESES

- Manipulações dietéticas causarão distúrbios nutricionais e metabólicos além de alterações no ritmo e comportamento alimentar de ratos machos adultos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da alteração da disponibilidade de alimento segundo o ciclo claro/escuro e/ou da composição dietética sobre o estado nutricional, ritmo e preferência alimentar, parâmetros metabólicos e aspectos do comportamento alimentar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos adultos submetidos à alteração da disponibilidade de alimento ou não, com modificação da composição dietética ou não, os seguintes parâmetros:

- O padrão circadiano da alimentação;
- O estado nutricional ao longo do período experimental;
- A curva circadiana da glicose sanguínea e a tolerância oral à glicose;
- A sequência comportamental de saciedade;
- A preferência dietética.

5 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Biotério Prof^a Naíde Regueira Teodósio, do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram previamente submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.019767/2014-38 – **ANEXO A**).

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram mantidos em condições ambientais padrão de biotério controlados em temperatura, umidade e luminosidade (ciclo claro/escuro – CE 12:12 - invertido, luzes acesas às 20h). Foram utilizados inicialmente 40 ratos machos, da linhagem *Wistar*, nascidos de matrizes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, recebidos do biotério de criação aos 21 dias de vida. Após desmame metade dos animais (n=20) receberam dieta comercial de biotério e a outra metade (n=20) receberam dieta experimental chamada de “ocidentalizada” (**Tabela 1 e 2**). Aos 60 dias de idade os grupos foram divididos e distribuídos segundo as dietas e a disponibilidade de alimentos no período claro/escuro. Durante o período experimental, alguns animais foram retirados do estudo por motivos como perfuração esofágica na gavagem, doença respiratória, finalizando 36 animais assim distribuídos: Grupo Controle (GC), Grupo Ração Controle Alteração da Disponibilidade (GRC), Grupo Ocidentalizada (GO) e Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (GRO), a partir de então os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas ao longo de toda a pesquisa. Teve-se um total de quatro grupos de ratos machos (8-10 em cada) recebendo dietas *ad libitum* nas fases claro e escuro do ciclo ou tendo sua disponibilidade invertida por período de 120 dias. O desenho esquemático encontra-se abaixo delineado

(Figura1). Os nomes dos grupos foram estabelecidos em função da dieta utilizada e da variável alteração do horário de disponibilidade de dieta.

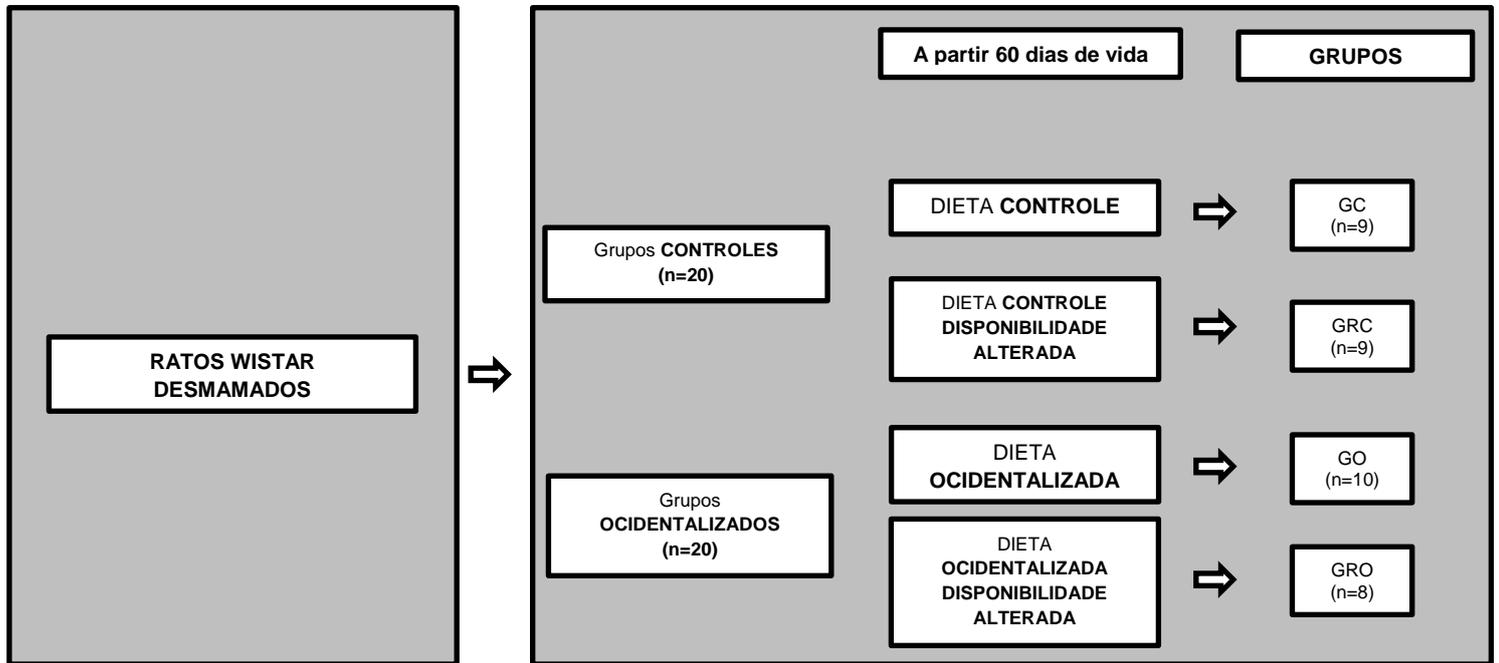


Figura 1- Desenho experimental do estudo segundo dietas, período e grupos formados. GC- Grupo Controle; GRC- Grupo Ração Controle Alteração da Disponibilidade; GO- Grupo Ocidentalizada; GRO- Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade.

5.2 COMPOSIÇÃO E HORÁRIO DE DISPONIBILIDADE DA DIETA

O grupo controle recebeu dieta comercial de biotério® (23% de proteína - **Tabela 1**) por todo o experimento. O grupo com dieta ocidentalizada recebeu dieta experimental “ocidentalizada” formulada a partir da adaptação do estudo de Cavalcante et al (2013) até os 60 dias de vida e, após essa idade, recebeu a mesma dieta ajustada a fase de manutenção (**Tabela 2**). O período de experimentação com inversão da disponibilidade de alimento foi de 120 dias. Nesse íterim, grupos controle e ocidentalizado se alimentaram *ad libitum* por todo o ciclo de 24 horas e grupos controle e ocidentalizado que apesar de ter a dieta disponibilizada, tiveram uma inversão da oferta (alteração da disponibilidade), ou seja, a dieta foi ofertada ao animal após 8 horas de iniciado o ciclo escuro, sendo oferecida a vontade até o

horário de 8 horas do dia seguinte. O consumo alimentar (g) foi obtido pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e o rejeitado.

Tabela 1. Composição de macronutrientes segundo o Valor energético total (VET) da dieta ocidentalizada baseada na AIN-93 para roedores e da dieta comercial.

DIETAS*	PROTEÍNA (%kcal VET)	CARBOIDRATO (%kcal VET)	LIPÍDIO (%kcal VET)	VET (kcal/g)
Ocidentalizada (crescimento)	18	43	39	4,0
Ocidentalizada (manutenção)	14	46	40	4,1
Comercial	26	63	11	3,6

*Os cálculos da composição centesimal da dieta ocidentalizada foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). A análise da composição centesimal final das dietas é realizada pelo Laboratório de Experimentação e Análise de alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE.

Tabela 2. Composição centesimal da dieta experimental ocidentalizada

Constituintes (g%)	Dieta ocidentalizada (crescimento)	Dieta ocidentalizada (manutenção)
Amido de milho	11,70	15,70
Ração comercial de biotério	8,00	8,00
Biscoito maisena de chocolate	5,00	5,00
Farinha de soja	4,00	4,00
Caseína	20,00	15,00
Celulose	4,00	4,00
Óleo de milho	-	1,50
Óleo de soja	3,00	2,50
Banha	5,30	5,30
Manteiga	4,00	4,00
Margarina (85% lipídio)	4,00	4,00
Creme de leite (20% lipídio)	4,00	4,00
Açúcar	22,00	22,00
Sais – mix mineral	2,50	2,50
Vitaminas	0,70	0,70
Colina	0,25	0,25
Metionina	0,25	0,25
BHT = 0,14mg	0,0014	0,014
NaCl (39,34% de Na)	0,30	0,30
Glutamato Monossódico (12,3% de Na)	1,00	1,00
% Kcal	402,28	409,71

Fonte: o autor, adaptado de Cavalcante et al, (2013).

5.3 AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL

A aferição do peso corporal foi realizada semanalmente até o final período do experimental. O procedimento foi realizado na balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g).

5.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO SOMÁTICO

5.4.1 Avaliação antropométrica

Foi utilizado papel milimetrado para medir o comprimento corporal do animal (da região do focinho até a base da cauda) aos 60 dias e ao final do experimento. Em momentos semelhantes, medidas de perímetro torácico (cm) e abdominal (cm) também foram obtidas no animal.

5.4.2 Índice de Massa Corporal

Calculou-se o índice de massa corporal (IMC) dividindo o peso do animal (g) pelo quadrado de seu comprimento (cm) (NOVELLI et al, 2007).

5.5 CONSUMO ALIMENTAR E CURVA GLICÊMICA

Para medida de ingestão alimentar relativa a cada 4 horas do ciclo de 24 horas, o animal, previamente ambientado, foi acompanhado durante 5 dias e a média do registro de 3 dias consecutivos foi analisada (**Figura 2**). Dessa forma, foi obtido o padrão de consumo circadiano e o total de ração consumida em cada

fotoperíodo dos grupos com dieta padrão e ocidentalizada *ad libitum* e com alterada disponibilidade de alimento na fase escura do ciclo (ao término do período de 120 dias com a inversão da disponibilidade de alimento).

Em paralelo, foi realizada a curva circadiana da glicose durante 1 dia em todos os grupos nos mesmos intervalos de tempo de controle do consumo alimentar.

O consumo circadiano da alimentação e a curva glicêmica a cada 4 horas, foi utilizado para observar a ritmicidade alimentar e glicêmica (NASCIMENTO et al, 2013) em função do ciclo, da dieta e da alteração da disponibilidade de alimento.

A ritmicidade foi medida através de um ciclo ambiental (*zeitgeber*) que pode corresponder ao horário que as luzes acendem ou apagam durante o período de 24 horas. Para fins de compreensão do temporizador externo, os *Zietgebers* serão denominados segundo os fusos horários dos ciclos, começando ZT0 no primeiro intervalo do período da fase clara do ciclo.

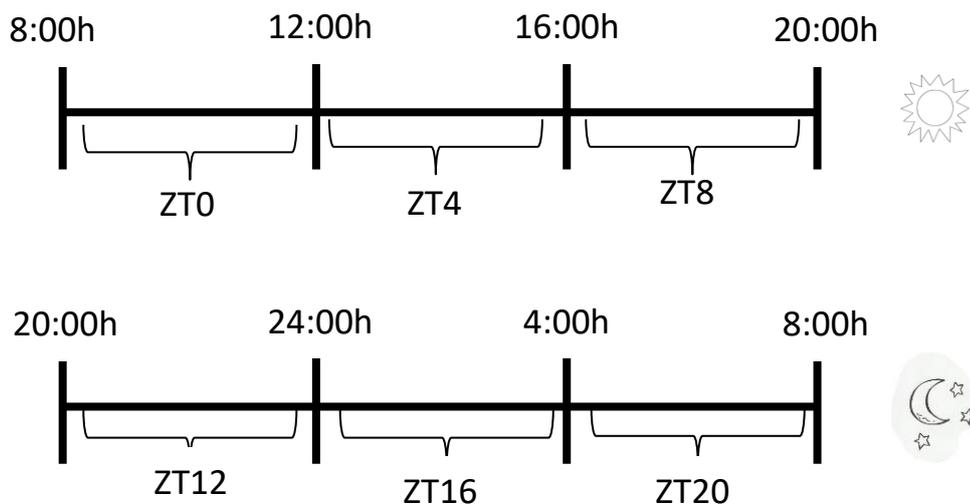


Figura 2 – Esquema de avaliação do padrão circadiano da curva da glicemia e do consumo alimentar dos animais experimentais.

5.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado entre os 123-146 dias de vida no fotoperíodo claro e escuro em todos os grupos. O animal foi submetido a um jejum de 6 horas e, após esse período, foi coletada a primeira amostra de

sangue (tempo 0) para dosagem da glicose basal com uso do aparelho *Accu-Check Performa*®. Posteriormente, foi administrado por gavagem uma solução de glicose a 50%, na dosagem de 2mg/g de peso do animal para o teste de tolerância oral à glicose (ANDRIKOPOULOS et al, 2008) e a glicemia obtida nos tempos 30, 60, 90 e 120min. Foi calculada a área sob a curva de glicose (ΔG) por meio do método trapezoidal (LE FLOCH et al, 1990).

5.7 TESTE COMPORTAMENTAL: SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE

O comportamento alimentar foi mensurado através da Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) determinada por Halford, Wanninayake e Blundell (1998). Os animais foram submetidos ao teste comportamental a partir dos 60 dias de vida nos grupos com dieta *ad libitum* e, nos grupos com alteração da disponibilidade de alimento somente após 8 semanas de alterado o período de alimentação. A metodologia utilizada para realização da SCS consiste em colocar o animal em uma gaiola transparente para observação permitindo a plena expressão da sequência. Para a realização do teste, os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas transparentes em privação alimentar por 2 horas na fase escura, a partir de metodologia adaptada de Halford, Wanninayake e Blundell (1998) antes da oferta de alimento com peso determinado. Pesos do animal e da ração foram realizados antes, e, ao final de cada sequência (após 1 hora de observação). Os ratos foram monitorados sob luz vermelha de baixa intensidade na fase escura do fotoperíodo de 24 horas (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998). A SCS foi registrada em formulário próprio (**Apêndice A**) por um observador treinado que quantificou a duração (em segundos) dos seguimentos comportamentais:

- **Alimentação:** registro iniciado quando o rato aproxima-se do comedouro e inicia a ingestão de ração. A finalização foi determinada no momento em que o rato abandona o comedouro.

- **Limpeza:** o início do registro foi quantificado quando o rato lambeu as patas anteriores e os movimentos dessas sobre a cabeça, bem como a continuidade de lambe-se na região ventral, dorso e patas posteriores.
- **Repouso/Descanso:** quantificado o tempo que o rato ficou em posição de descanso, com o corpo repousando sobre o assoalho da gaiola.
- **Atividade de exploração:** caminhando ao redor da gaiola ou circulando; movimentos envolvendo os quatro membros. Este dado foi obtido a partir da soma dos demais comportamentos subtraído do total de 300 segundos em cada um dos 12 subperíodos de observação.

Após registro de uma hora de SCS foram obtidas medidas complementares, como duração, frequência, tempo médio de ingestão de alimento, e tamanho da refeição (g/kg de peso corporal) e velocidade ou taxa de ingestão tanto em kcal/min quanto em g/min.

- Medida do consumo alimentar: obtida entre a diferença do peso da quantidade de ração oferecida e rejeitada (g) durante o período de uma hora de registro da SCS.
- Taxa de alimentação: foi determinada a partir da relação entre a quantidade total de alimento ingerida pelo tempo de registro de alimentação (g/min).

5.8 TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR

Nos 3 últimos dias prévios a eutanásia, foi realizado o teste de preferência alimentar com dietas em formato de pellets com predominância de macronutrientes chamadas de dieta hiperproteica, hiperlipídica e hiperglicídica (**Tabela 3**). Todas as 3 dietas foram oferecidas na mesma quantidade e seu consumo mensurado em 24 horas durante 3 dias. A ingestão foi determinada pela equação: $CA = DO - (RS + RL)$ onde, CA: Consumo alimentar; DO (dieta oferecida); RS (rejeito sujo); RL (rejeito limpo).

Tabela 3. Composição de macronutrientes das dietas hiperglicídica, hiperproteica e hiperlipídica utilizadas no teste de preferência alimentar agudo.

DIETAS*	PROTEÍNA (%kcal VET)	CARBOIDRATO (%kcal VET)	LIPÍDIO (%kcal VET)	VET (kcal/g)
Hiperglicídica (CHO)	12,6	76,5	10,9	3,4
Hiperproteica (PTN)	34,5	53	12,6	3,3
Hiperlipídica (LIP)	11,6	50,1	38,3	3,9

*Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos. Todas as dietas foram baseadas nas recomendações da AIN-93M.

FONTE: a autora

5.9 AVALIAÇÃO DA GORDURA CORPORAL E PESAGEM DE ÓRGÃOS

Após jejum entre 12 e 14 horas, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico (Ketamina, 40mg/kg e Xilazina, 5mg/kg), para realização de uma laparotomia mediana. Os tecidos coletados: fígado, rins, coração, gordura retroperitoneal/gonadal/abdominal e estômago foram mensurados em balança eletrônica digital, marca Marte (modelo ASF11).

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade dos dados foi verificada a partir do teste de Kolmogorov Smirnov e a significância considerada foi de $p < 0,05$. Para análises intragrupo, antes e depois de uma intervenção, foi utilizado o teste “t” de Student pareado. Para análise de peso corporal e consumo alimentar tendo a inversão de alimento e o tempo como cofatores, foi usada a Análise de variância (ANOVA) *two-way* de medidas repetidas (repeated measure, RM), seguido do pós-teste de Bonferroni quando observada diferença entre os grupos. Para análises com apenas uma variável, foi utilizada a Análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni quando detectada diferença entre os grupos. Todos os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0 versão 2007.

7 RESULTADOS

A partir dos 90 dias o peso corporal dos grupos com ração ocidentalizada (*ad libitum* e restrito) apresentaram maior peso comparado aos seus respectivos grupos com ração comercial até o final do período experimental. O GRC diferiu do controle, GC, aos 150 e 180 dias (figura 1A).

Dividindo-se o período de ganho de peso entre 2 períodos de 60 dias cada, devido as diferenças nas taxas de crescimento dos mesmos, foi observado que de 60 a 120 dias, o ganho de peso (figura 1B) foi menor no grupo GRC comparado ao controle, GC. Não observamos diferenças em relação à dieta, GO não diferiu de GC. No entanto, no intervalo de 120-180 dias, esse ganho foi menor para o grupo GRO comparado ao GO; e o grupo GO manteve semelhante proporção de ganho que o GC. O GRC não mostrou diferenças quando comparado ao GC (figura 1C).

Interessante notar que a divisão entre os períodos evidencia a menor proporção de ganho de peso em todos os grupos com o avanço da idade.

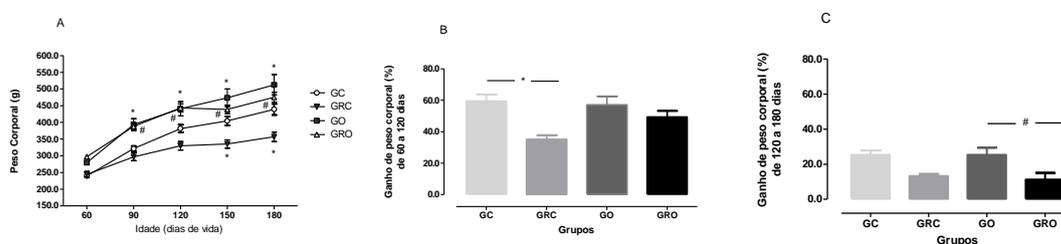


Figura 1- (A) Peso corporal (g); (B) ganho de peso dos animais (n=8-10) dos 60-120 dias de vida; (C) ganho de peso dos animais (n= 8-10) dos 120-180 dias de vida por grupo durante o período experimental de acordo com a dieta e a disponibilidade de alimento. Grupos: GC = Grupo Controle (círculo aberto); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (triângulo invertido fechado); GO = Grupo Ocidentalizada (quadrado fechado); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (triângulo aberto). (A) ANOVA *two way* de medidas repetidas; (B e C) ANOVA *one way* e (A, B e C) seguido do pós-teste de Bonferroni. (A) * vs GC; # GRO vs GRC. (B e C) * vs GC; # GRO vs GO ($p < 0,05$).

Foram observadas dimensões corporais maiores no grupo alimentado com ração ocidentalizada aos 60 dias de vida: circunferência torácica (figura 2A), circunferência abdominal (figura 2B) e índice de massa corporal (figura 2D) em relação ao controle. Entre os grupos restritos, diferença foi mostrada somente na

circunferência abdominal. Nenhuma diferença foi encontrada no comprimento corporal do animal (figura 2C).

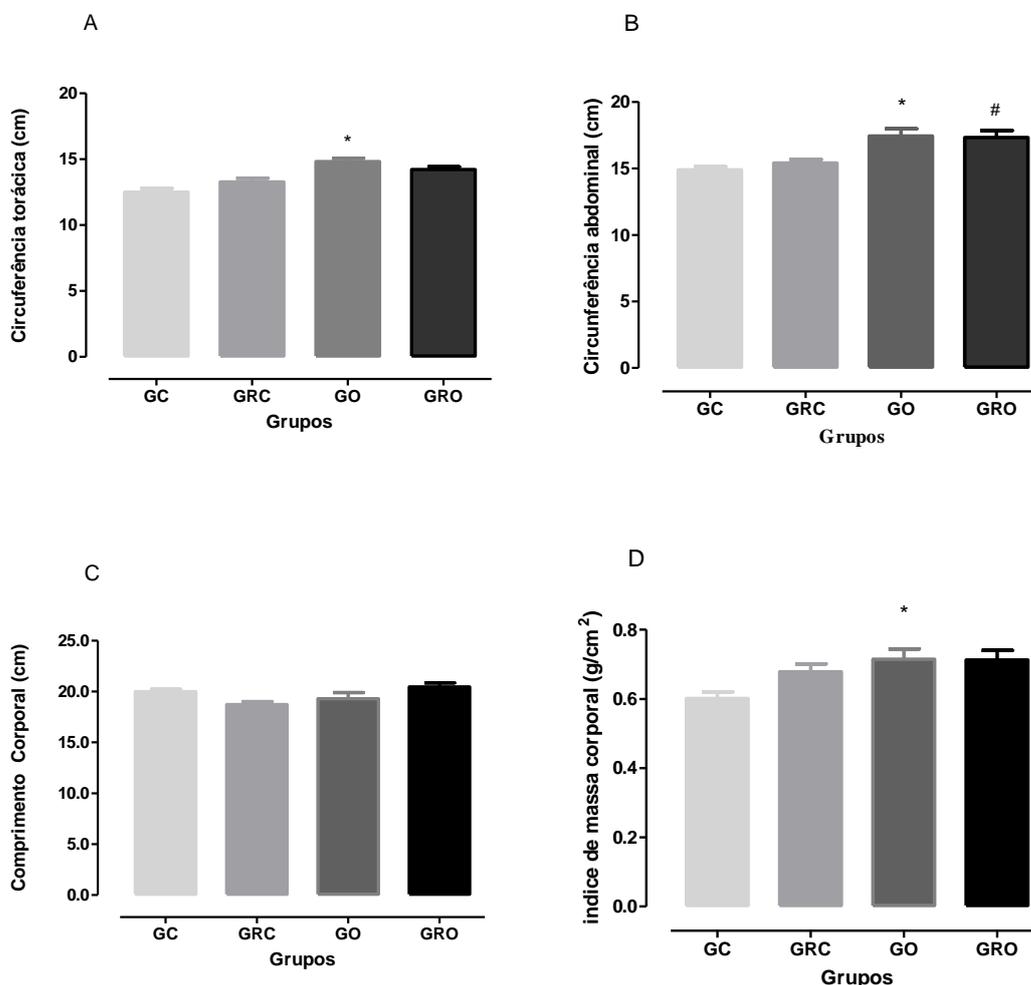


Figura 2- Medidas murinométricas intergrupos aos 60 dias de vida. (A) circunferência torácica; (B) circunferência abdominal; (C) comprimento corporal; (D) índice de massa corporal. Grupos: GC = Grupo Controle (barra cinza claro); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (barra cinza médio); GO = Grupo Ocidentalizada (barra cinza escuro); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (barra preta). ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni * vs GC; # vs GRC ($p < 0,05$).

Ao final do período experimental (aos 180 dias de vida) as medidas murinométricas foram reavaliadas, e os resultados reforçam maiores dimensões dos grupos alimentados com ração ocidentalizada em medidas de circunferência torácica (figura 3A), circunferência abdominal (figura 3B) e no índice de massa corporal (figura 3D) tanto em relação ao controle (GC) quanto ao grupo submetido a dieta restritiva (GRC), mas sem diferenças no comprimento corporal (figura 3C).

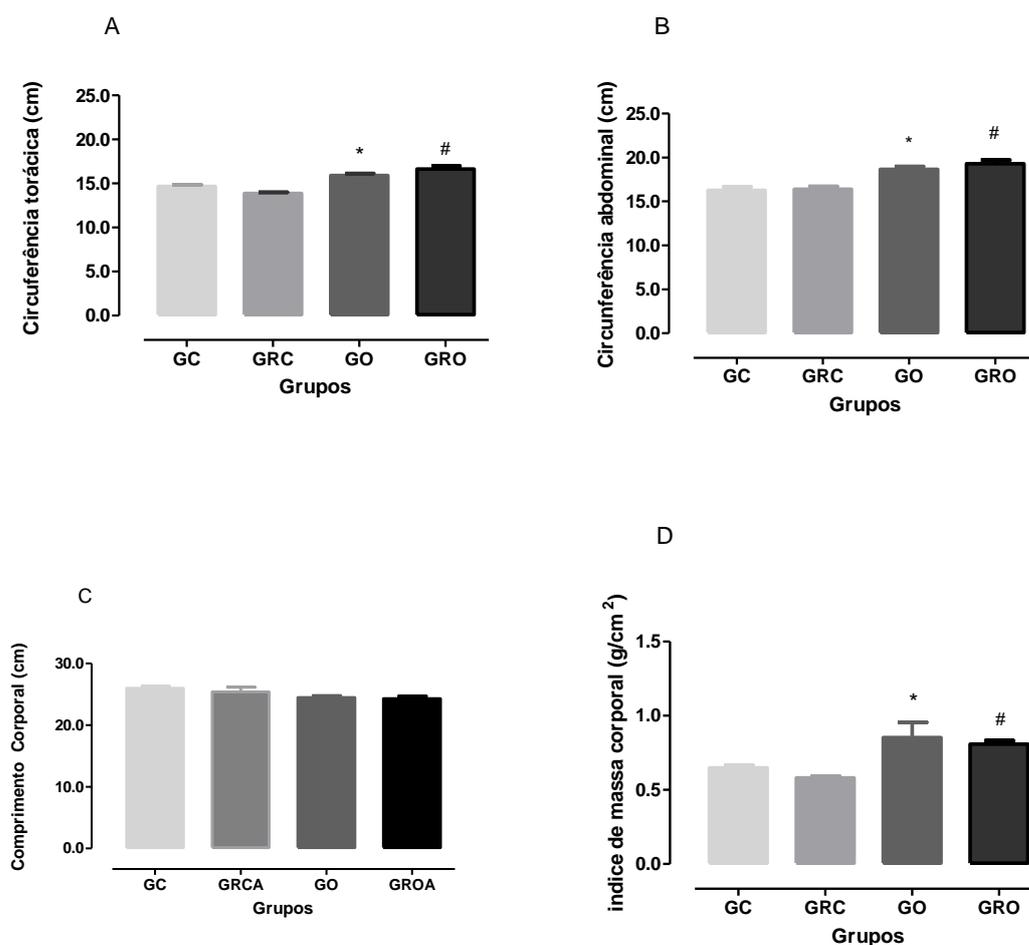


Figura 3- Medidas murinométricas intergrupos aos 180 dias de vida. (A) circunferência torácica; (B) circunferência abdominal; (C) comprimento corporal, (D) índice de massa corporal. Grupos: GC = Grupo Controle (barra cinza claro); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (barra cinza médio); GO = Grupo Ocidentalizada (barra cinza escuro); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (barra preta). ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni. * vs GC; # vs GRC ($p < 0,05$).

Na figura 4A, pode-se destacar que o ritmo da alimentação segue um padrão regular ao longo dos dias, nos grupos com dieta *ad libitum* (comercial e ocidentalizada). Também foi verificado um pico de ingestão nas primeiras 4 horas da fase escura (ZT12) em ambos os grupos. Já nos grupos restritos, este pico foi observado nas últimas 4 horas da fase escura (ZT20), momento que os grupos têm o alimento disponibilizado.

A figura 4B mostrou a média de consumo alimentar (g/100g de peso corporal) durante os 3 dias de observação em ambas as fases do ciclo comparando o GRC com o GC. Como esperado há uma diferença nos momentos de ZT12 e ZT16, pois o

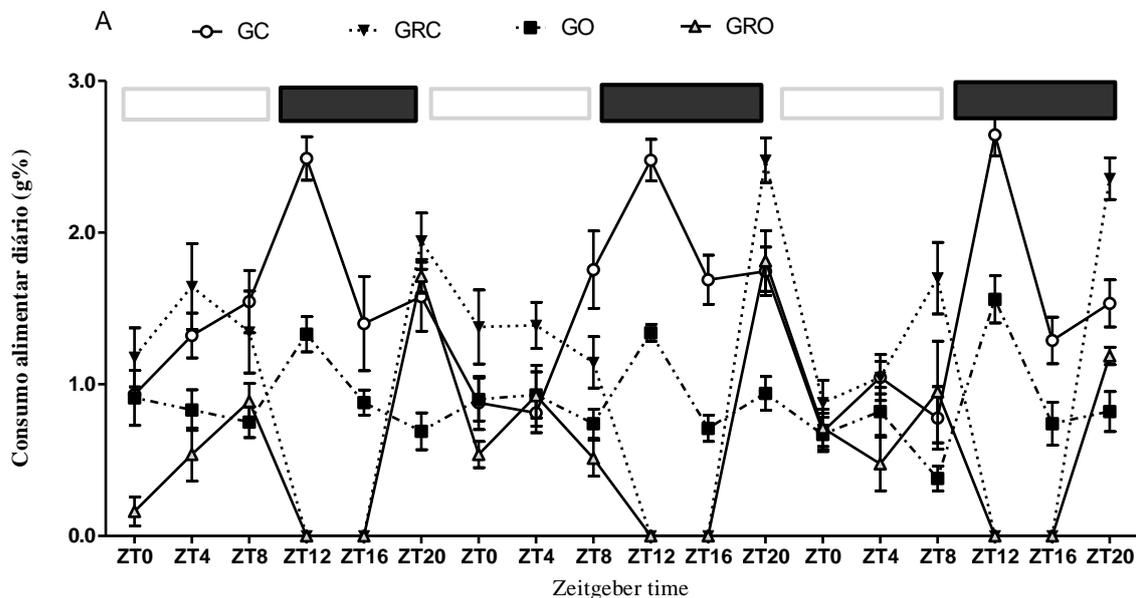
GRC não dispõe de alimento e em ZT4 e ZT20, onde o GRC ingere mais que o GC em ambos os momentos totalizando uma ingestão superior em torno de 40%.

Na figura 4C, também foi expressa a diferença de consumo entre os grupos, neste caso GRO e GO. Igualmente, o GRO mostra diferença em ZT12 e ZT16 por não dispor de alimento, mas, menor em ZT0 (40% menor) e maior em ZT20 que seu correspondente, GO (96% maior).

Na figura 4D, essas ingestões foram expressas em kcal/100g de peso corporal devido à diferença calórica de 13% entre as dietas. Neste caso, foi verificado que o GRO difere do GRC em ZT0, ZT4, ZT8 e ZT20, sempre ingerindo menos. O GRO difere de GO em ZT12, ZT16 (menos caloria, pois está sem alimento) e ZT20 (mais caloria). Em ZT12 e ZT16 ele assemelha-se ao GRC, mas nos demais intervalos ele ingere menos caloria que o GRC.

Entre os grupos *ad libitum* a ingestão energética difere entre GO e GC em ZT8, ZT12, ZT16 e ZT20, sempre em menor quantidade.

Em termos de calorias, o GRC também difere do GC em ZT4, ZT12, ZT16 e ZT20.



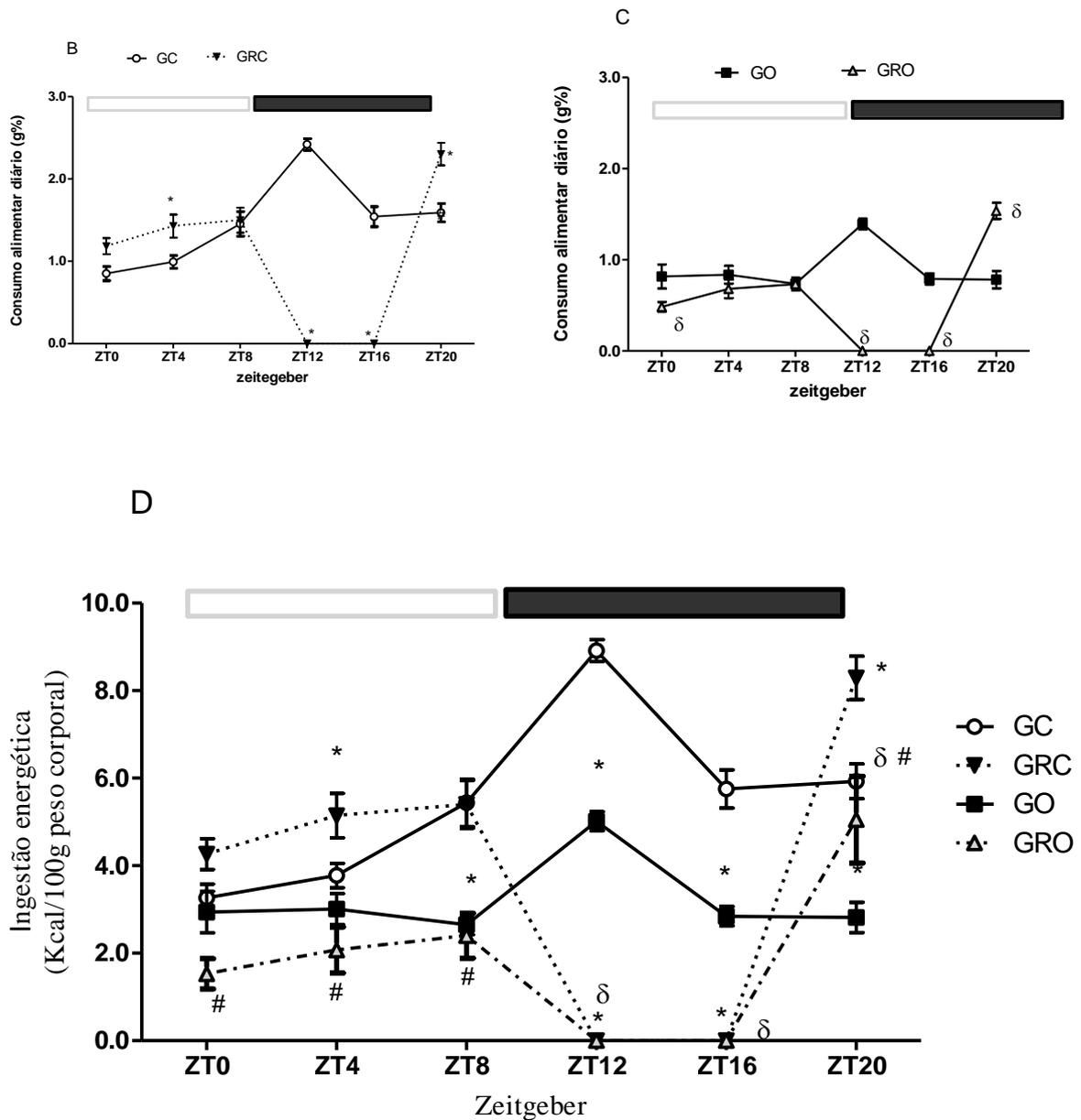


Figura 4- (A) Ritmo circadiano da alimentação (g%); (B e C) consumo alimentar relativo médio (g%); (D) ingestão energética relativa média a cada 4 horas ao longo de 3 dias segundo dieta e alteração da disponibilidade de alimento. Grupos: GC = Grupo Controle (círculo aberto); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (triângulo invertido fechado); GO = Grupo Ocidentalizada (quadrado fechado); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (triângulo aberto). ZT0= 1ª hora do claro (20-24h); ZT4= 2ª hora do claro (24-04h); ZT8= 3ª hora do claro (04-08h); ZT12= 1ª hora do escuro (8-12h); ZT16= 2ª hora do escuro (12-16h); ZT20= 3ª hora do escuro (16-20h). (A) Valores representados em média erro padrão da média; (B, C e D) ANOVA *two way* medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni * vs GC; # GRO vs GRC; ^δ GRO vs GO ($p < 0,05$).

Na comparação intragrupo segundo as fases clara e escura, observa-se que o grupo GC ingere maior quantidade de alimento na fase escura comparada com a

clara. Mas, no GRC estes valores se invertem, ou seja, é na fase clara que ocorre a maior ingestão do grupo controle restrito (figura 5A). Quanto aos grupos com dieta ocidentalizada, nem o GO e nem o GRO foi observado nenhuma diferença quanto ao padrão de ingestão alimentar (figura 5A).

Na figura 5B, ao se comparar a ingestão intergrupos na fase clara, foi observado que o grupo GRC consome mais comparado ao GC, e que o grupo GO ingere menos que o controle, e, o grupo GRO consome menos que o GRC.

A figura 5C mostra que na fase escura o grupo GRC consumiu menos que o grupo GC, e, que o grupo GRO consumiu menos que os grupos GRC e GO.

Nas figuras 5D, 5E, 5F, as mesmas análises foram realizadas referentes a ingestão energética. Nas figuras 5D e 5E, os mesmos resultados foram encontrados entre os grupos analisados. Na figura 5F apenas o grupo GRO mostra divergência energética em relação aos resultados do consumo alimentar, pois não difere de GRC.

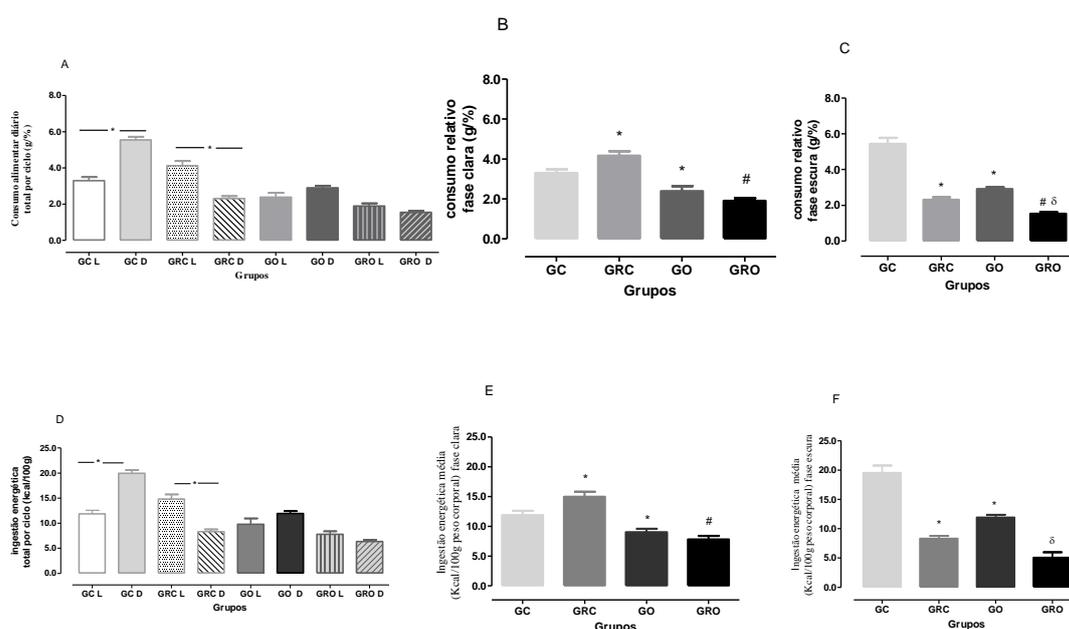


Figura 5- Ingestão relativa (g/100g e kcal/100g) intra e intergrupos segundo as fases de claro e de escuro durante 3 dias. (A) Comparação intragrupo do consumo alimentar total por cada fase do ciclo; (B) consumo relativo intergrupos na fase de claro; (C) consumo relativo intergrupos na fase de escuro; (D, E e F) mesmas avaliações foram realizadas em relação a ingestão energética, respectivamente. (A e D) Grupos: GC L = Grupo Controle claro; GC D= Grupo Controle escuro; GRC L = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade claro; GRC D = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade escuro; GO L = Grupo Ocidentalizada claro; GO D = Grupo Ocidentalizada escuro; GRO L = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade claro; GRO D = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade escuro. (B, C, E e F) Grupos: GC = Grupo Controle; GRC = Grupo

Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; GO = Grupo Ocidentalizada; GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade. (A e D), Teste *t de student* pareado; (B, C, E e F), teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni. (A e D) * vs GC D/ GRC D. (B, C, E e F) * vs GC; # GRO vs GRC; ° GRO vs GO ($p < 0,05$).

A obtenção da curva glicêmica de um ciclo de 24h (figura 6) nos permitiu observar que os grupos com dieta *ad libitum* (comercial e ocidentalizada) diferem em todo o ciclo claro e ao final da fase escura (ZT20), com a glicemia do grupo ocidentalizada apresentando-se mais alta nos pontos divergentes do ciclo. Nos grupos restritos observou-se que o grupo GRO demonstrou uma menor glicemia em relação ao GO nos dois últimos intervalos da fase clara (ZT4 e ZT8). Ao longo da fase escura manteve-se constante nos primeiros intervalos e mostrou uma redução ao final da fase escura (ZT20) quando comparado ao GO. Apesar de observada a redução da glicemia no grupo GRO comparado ao GO este permaneceu maior que seu correspondente restrito, o GRC em diversos pontos do intervalo.

Após as primeiras 4 horas da fase escura a glicemia do grupo GRC apresentou uma redução nos dois momentos (ZT16 e ZT20) dessa fase comparada ao GC.

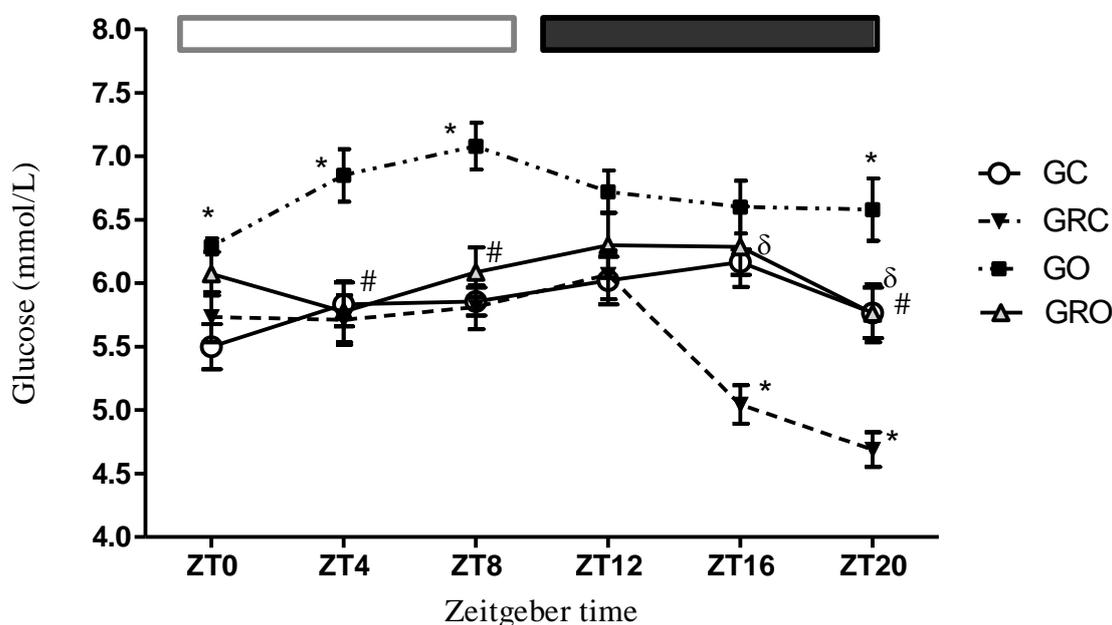


Figura 6- Curva glicêmica de um ciclo de 24 horas intergrupos. Grupos: GC = Grupo Controle (círculo aberto); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (triângulo invertido fechado); GO = Grupo Ocidentalizada (quadrado fechado); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (triângulo aberto). ZT0= 1ª hora do claro (20-24h); ZT4= 2ª hora do claro (24-04h); ZT8= 3ª hora do claro (04-08h); ZT12= 1ª hora do escuro (8-12h);

ZT16= 2ª hora do escuro (12-16h); ZT20= 3ª hora do escuro (16-20h). ANOVA *two way* medidas repetidas e seguido do pós-teste de Bonferroni. * vs GC ; ^δ vs GRC; # vs GO ($p < 0,05$).

A curva glicêmica também foi avaliada intragrupo segundo as fases clara e escura do ciclo de 24hs. Na figura 7A foi verificada que em ambas as fases, ocorreram uma variação glicêmica, mas que não há diferenças entre as fases do fotoperíodo. Na figura 7B, dados do grupo GRC, demonstraram significante diferença entre dois pontos da curva na fase clara comparada a fase escura, produzindo praticamente uma curva sem oscilação. Nas figuras 7C e 7D nenhuma diferença foi detectada nos grupos entre as fases clara e escura.

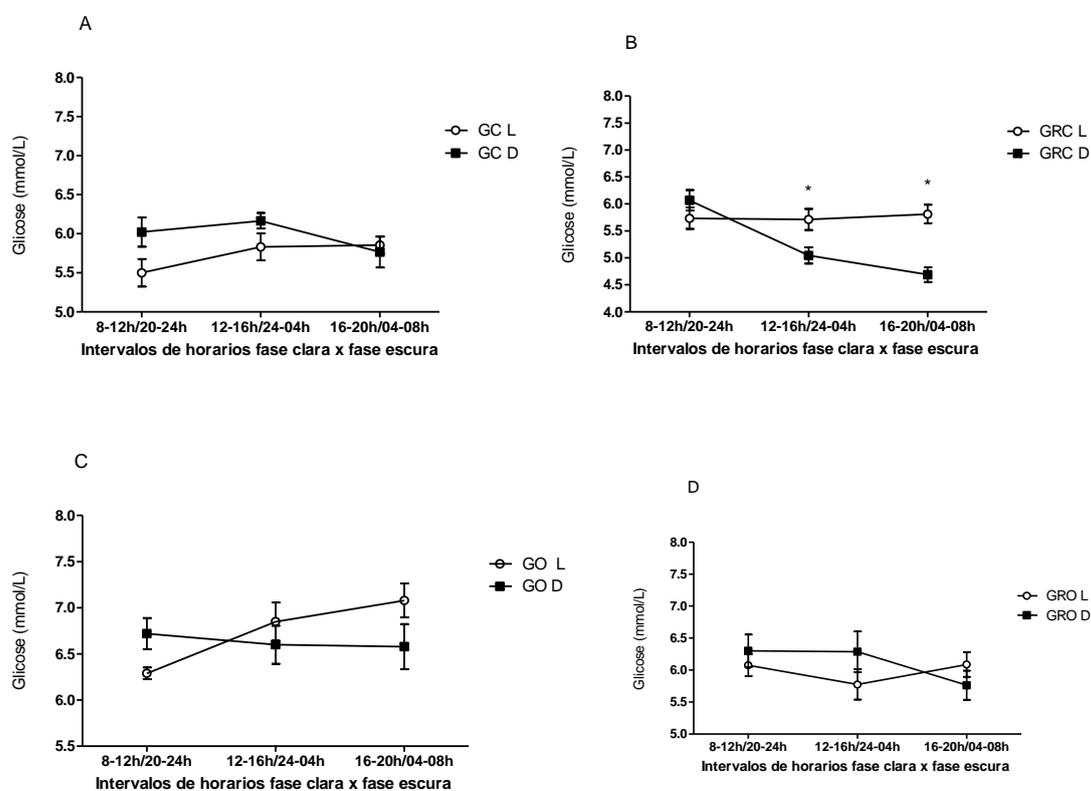
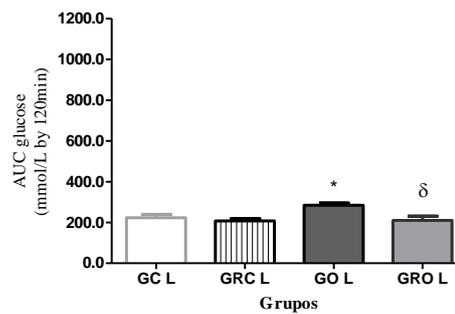
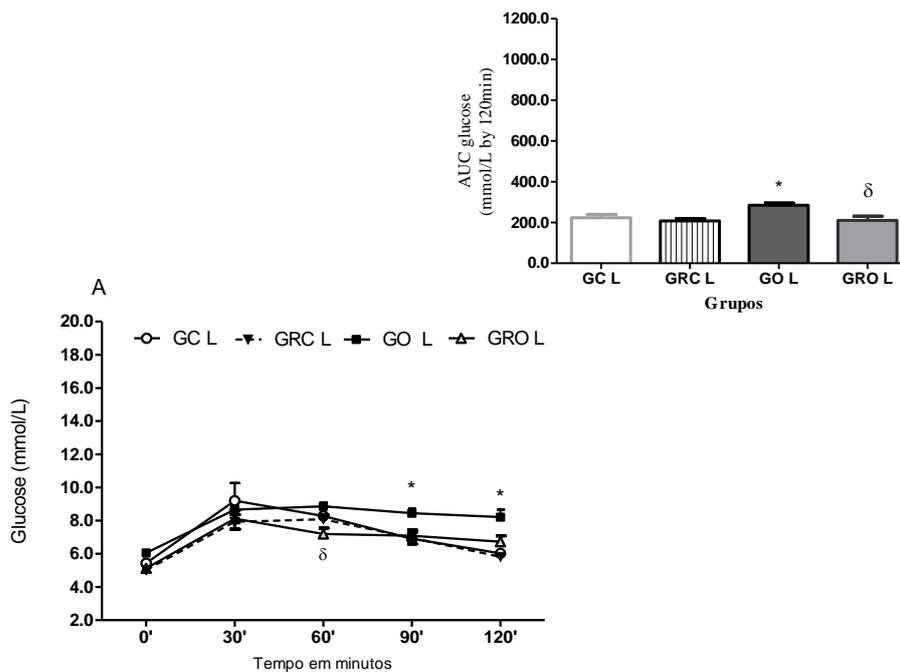


Figura 7- Curva glicêmica por fase intragrupos: (A) Grupo Controle; (B) Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; (C) Grupo Ocidentalizada; (D) Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade. (A) Grupos: GC L = Grupo Controle claro (círculo aberto); GC D= Grupo Controle escuro (quadrado fechado). (B) Grupos: GRC L = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade claro (círculo aberto); GRC D = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade escuro (quadrado fechado). (C) Grupos: GO L = Grupo Ocidentalizada claro (círculo aberto); GO D = Grupo Ocidentalizada escuro. (D) Grupos: GRO L = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade claro (círculo aberto); GRO D = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade escuro (quadrado fechado). ANOVA *two way* de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. (B) * vs GRC D ($p < 0,05$).

A partir do teste oral de tolerância à glicose realizado na fase clara e na escura foi possível observar que existe uma diferença de resposta em função da fase ao compararmos os grupos *ad libitum* (GO X GC). Na fase clara (figura 8A) o grupo GO mostrou uma glicemia constante e mais alta do que o grupo GC aos 90 e 120 minutos do teste e também uma maior área sob a curva. Na fase escura, o GO não diferiu do GC em nenhum ponto da curva (figura 8B).

Nenhuma diferença foi observada entre o GRC e GC em nenhuma das fases. Já entre o GRO foi detectado diferença aos 60 minutos em relação ao GO refletindo também significância na área sob a curva, na fase clara (figura 8A).

Na fase escura também foram encontradas diferenças do GRO comparado ao GRC e GO em diversos pontos da curva refletindo também significância na área sob a curva (figura 8B).



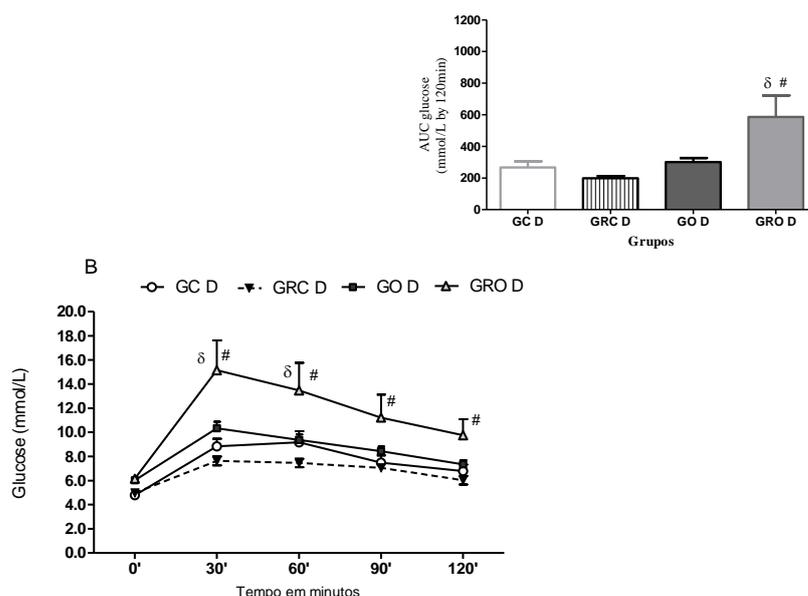


Figura 8- Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e área sob a curva de glicose inergupos segundo a fase de claro (A) e de escuro (B). (A) Grupos: GC L = Grupo Controle claro (círculo aberto); GRC L = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade claro (triângulo invertido fechado); GO L = Grupo Ocidentalizada claro (quadrado fechado); GRO L = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade claro (triângulo aberto). (B) Grupos: GC D= Grupo Controle escuro (círculo aberto); GRC D = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade escuro (triângulo invertido fechado); GO D = Grupo Ocidentalizada escuro (quadrado fechado); GRO D = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade escuro (triângulo cinza). ANOVA *two way* medidas repetidas para TTOG e ANOVA *one way* para área sob a curva seguido do pós-teste de Bonferroni. (A) * vs GC L; ^δGRO L vs GO L; (B) [#] vs GRC D; ^δGRO D vs GO D ($p < 0,05$).

A análise estatística dos pesos relativos dos órgãos demonstrou que o peso do fígado do grupo GRO foi menor do que GRC, e, o peso do estômago do grupo GRC foi maior do que o grupo GC. Devido a este aumento no peso do estômago do GRC, o grupo GRO diferiu do GRC mostrando um peso menor (tabela 1).

A gordura abdominal mostrou-se mais elevada nos grupos ocidentalizados; tanto no GO quanto no GRO quando comparados aos pares GC e GRC, respectivamente. O mesmo repete na comparação da gordura retroperitoneal (tabela 1). Na gonadal, apenas o GO mostrou significância.

Tabela 1. Peso relativo de órgãos e gordura visceral de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade de ração.

Órgãos/gordura (g/100g peso)	GC	GRC	GO	GRO
Coração	0,32(±0,03)	0,33(±0,02)	0,34(±0,06)	0,33(±0,05)
Fígado	2,83(±0,11)	2,98(±0,12)	2,66(±0,33)	2,52(±0,29)[#]
Estômago	0,46(±0,07)	0,57(±0,03)[*]	0,35(±0,10)	0,33(±0,09)[#]
Rins				
Direito	0,35(±0,03)	0,35(±0,01)	0,33(±0,04)	0,32(±0,02)
Esquerdo	0,35(±0,03)	0,34(±0,01)	0,31(±0,03)	0,32(±0,03)
Gordura abdominal	3,22(±1,01)	3,24(±0,72)	5,65(±1,68)[*]	5,86(±1,64)[#]
Gordura gonadal	1,45(±0,28)	1,41(±0,23)	2,45(±0,97)[*]	1,95(±0,77)
Gordura retroperitoneal	1,76(±0,84)	1,83(±0,61)	3,19(±1,00)[*]	3,91(±1,15)[#]

Grupos: GC = Grupo Controle; GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; GO = Grupo Ocidentalizada; GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade. ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni. * vs GC ; [#] vs GRC (p<0,05). Valores expressos em média ± EPM.

No teste de preferência alimentar, o grupo GRC demonstrou maior preferência por dieta hiperglicídica em relação ao GC. O grupo GRO menor preferência pela dieta glicídica comparada ao GRC (figura 9A). O consumo de dieta com predominância de proteína foi semelhante em todos os grupos (figura 9B). O grupo GRC apresentou menor consumo de dieta hiperlipídica comparada ao GC e o grupo GRO maior preferência em relação à GRC (figura 9C).

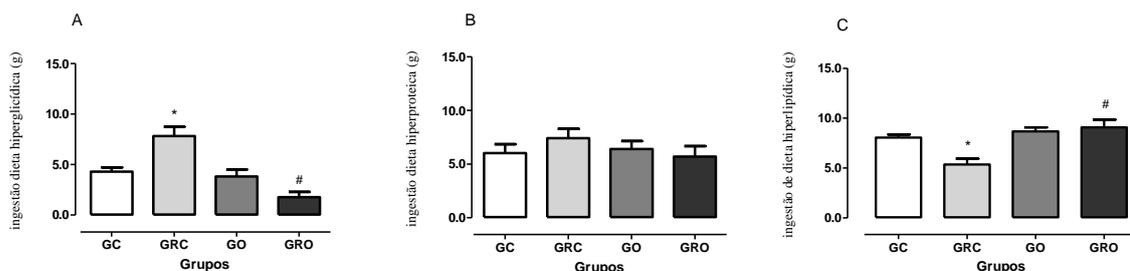


Figura 9- Teste de preferência alimentar intragrupos ao final do experimento segundo dietas com predominância de macronutrientes: (A) carboidrato; (B) proteína; (C) lipídio. Grupos: GC = Grupo Controle (barra branca); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (barra cinza claro); GO = Grupo Ocidentalizada (barra cinza médio); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (barra cinza escuro). ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni. *vs GC; [#] vs GRC (p<0,05).

A análise comportamental da sequência de saciedade mostra que em todos os grupos experimentais analisados houve a conservação da estrutura padrão da sequência de saciedade caracterizada por transição entre período de alimentação e descanso intermediados por comportamentos de limpeza e exploração (figura 10). As manipulações utilizadas no estudo não interromperam a sequência. Observamos que a modificação da composição nutricional da dieta e a alteração da disponibilidade temporal de alimento provocaram mudanças no tempo gasto nas atividades de descanso e alimentação.

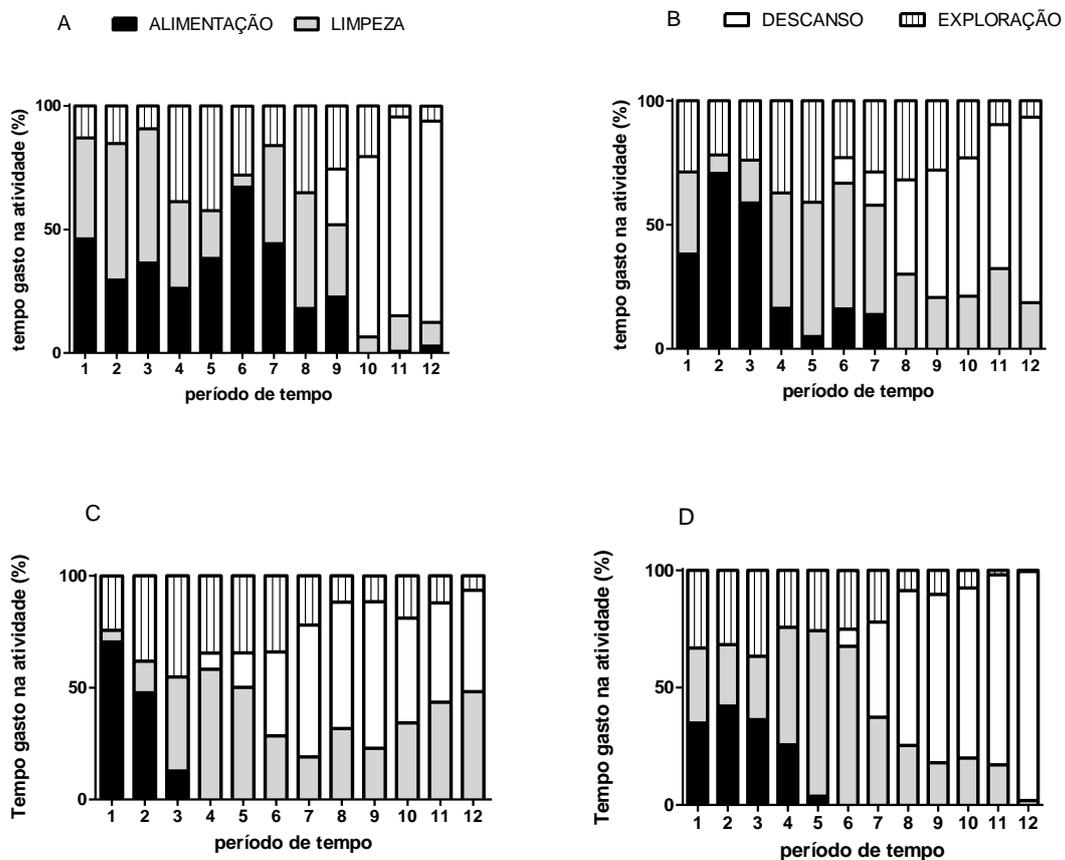


Figura 10- Sequência comportamental de saciedade de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração. Os períodos correspondem aos 12 intervalos de tempo de 5 minutos que compõem o teste. As colunas representam a proporção do número total de observações para cada comportamento por cada intervalo de tempo. (A) Grupo Controle; (B) Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; (C) Grupo Ocidentalizada; (D) Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade.

A saciedade comportamental (ponto de transição entre comportamento de alimentação para descanso) foi adiantado nos grupos GRC (figura 11B) e GO (figura 11C) em relação ao grupo controle (figura 11A). Esses resultados estão correlacionados com a menor duração de alimentação do GRC e GO comparados ao GC (tabela 2). No grupo GRO (figura 11D) houve atraso no disparo da saciedade comparado ao GO (figura 11C). Porém, não houve diferenças no tamanho da refeição e na velocidade de seu consumo entre os dois grupos (tabela 2).

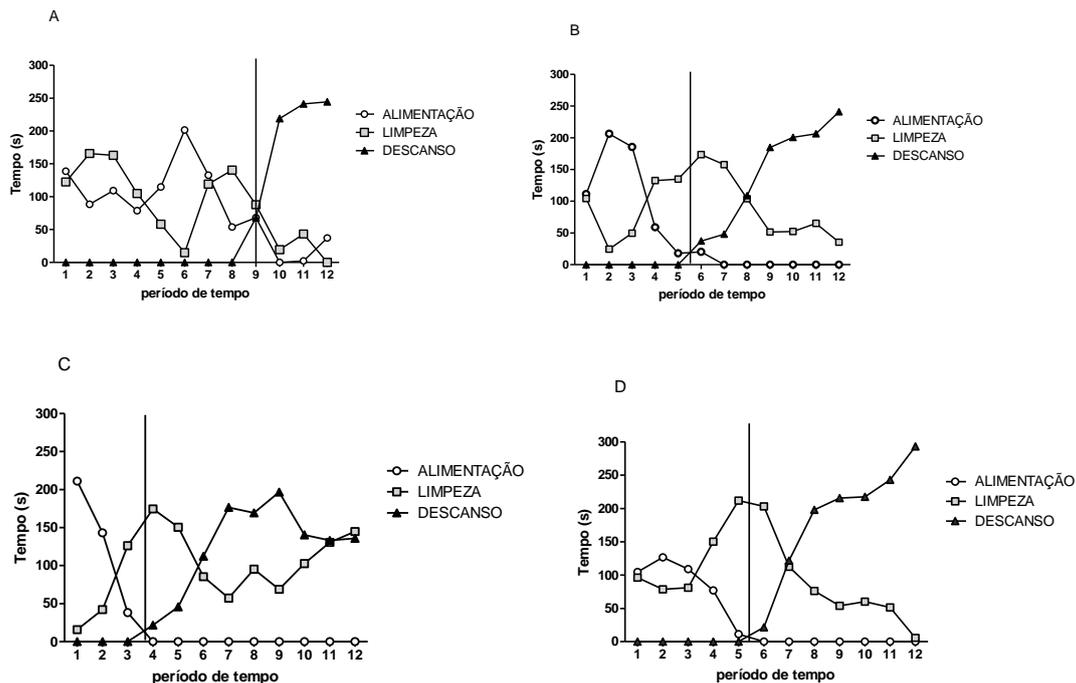


Figura 11- Sequência comportamental de saciedade de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração. As linhas correspondem a duração (s) dos comportamentos (alimentação, limpeza, descanso) em cada 12 x 5 min intervalos do teste. A linha vertical representa o ponto de transição entre o comportamento de alimentação e o de descanso. (A) Grupo Controle; (B) Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade; (C) Grupo Ocidentalizada; (D) Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade.

O tamanho da refeição em kcal ou em gramas foi menor nos grupos GRC e GO quando comparado ao GC (tabela 2). A taxa de alimentação foi alterada apenas em animais com manipulação da qualidade da dieta. Assim, observamos maior taxa de alimentação no grupo GO comparado ao GC, bem como no GRO comparado do GRC (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros da microestrutura da refeição de ratos submetidos à modificação da composição dietética e/ou alteração da disponibilidade temporal de ração.

		GC	GRC	GO	GRO
Tamanho refeição	(kcal/kg de peso)	72,33 (±17,47)	37,15 (±10,86)*	37,18 (±14,31)*	37,58 (±8,53)
	(g/kg de peso)	20,09 (±4,85)	10,32 (±3,01)*	10,26 (±3,28)*	9,36 (±2,17)
Duração refeição	(min)	17,88 (±4,67)	9,28 (±3,17)*	7,08 (±2,40)*	7,15 (±1,43)
Taxa de alimentação	(kcal/min)	1,52 (±0,55)	1,34 (±0,50)	2,87 (±0,88)*	2,19 (±0,56)
	(g/min)	0,38 (±0,04)	0,37 (±0,14)	0,67 (±0,12)*	0,59 (±0,15) [#]

Grupos: GC = Grupo Controle (n=5); GRC = Grupo Ração Comercial Alteração da Disponibilidade (n=6); GO = Grupo Ocidentalizada (n=10); GRO = Grupo Ração Ocidentalizada Alteração da Disponibilidade (n=7). ANOVA *one way* para tamanho da refeição e duração da refeição seguido do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis para taxa de alimentação seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). * vs GC; [#] vs GRC. Valores expressos em média ± DP.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de detectar mudanças no estado nutricional e comportamento alimentar provocados tanto pela dieta quanto pela alteração de horário com disponibilidade de alimento ou restrição alimentar. Houve mudanças no padrão alimentar em função da restrição alimentar, um menor consumo de alimentos em função da composição dietética, curva glicêmica elevada em animais que consumiram dieta ocidentalizada *ad libitum*, e, diferentes seleções de preferência dietética em função da restrição alimentar.

O estado nutricional dos animais diferiu de acordo com a composição dietética e regime alimentar ao qual foram expostos ao longo da pesquisa. Animais dos grupos alimentados com dieta ocidentalizada após desmame, mostram elevado peso corporal a partir dos 90 dias de vida. Resultados semelhantes foram encontrados por Bhandari et al (2010), os quais observaram maior ganho de peso entre animais alimentados com dieta hiperlipídica (42% de gordura) durante 4 semanas. É conhecido que a alimentação prolongada com dieta rica em gordura induz aumento de peso em ratos em torno de 10 a 20% comparado a animais alimentados com dieta padrão, sendo essa indução da obesidade com dieta mais efetiva quando iniciada em ratos jovens e continuada por várias semanas (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). Neste estudo a diferença de peso encontrada em animais com dieta ocidentalizada foi em torno de 16% para o grupo GO e de 25% para o grupo GRO comparado com seus pares, o que corrobora achados da literatura.

Além disso, a dieta hiperlipídica interrompe o ciclo circadiano normal (KOHSAKA et al, 2007), provocando gênese em larga escala de transcritos oscilantes *de novo*, resultando na reorganização das oscilações coordenadas entre transcrições coerentes e metabólitos. Os mecanismos subjacentes a esta reprogramação envolvem o oscilador tanto no recrutamento na cromatina do gene *BMAL1* como na ativação cíclica acentuada de vias de substituição através do regulador transcripcional PPAR γ . Estas evidências demonstram que é especificamente dieta rica em gordura, e não o desenvolvimento da obesidade, que

provoca a reprogramação do sistema de temporização e que os efeitos da dieta nesse sistema são supostamente reversíveis (ECKEL-MAHAN et al, 2012).

A restrição alimentar durante as primeiras 8 horas na fase escura gerou um peso menor no grupo com dieta padrão comparado ao grupo referência. Neste estudo, o grupo com dieta ocidentalizada restrita apresentou maior peso corporal que seu correspondente controle restrito mesmo ingerindo menor quantidade de alimento e caloria. A existência de um período diário definido de alimentação e jejum é um determinante dominante dos ritmos diurnos nas vias metabólicas reverberado na expressão de genes do metabolismo energético (CHAIX et al, 2014).

Estudo prévio com desenho metodológico semelhante ao usado neste estudo revelou que a restrição alimentar pode ser benéfica em condições alimentares desequilibradas e que estes parecem ser proporcionais a duração do jejum (CHAIX et al, 2014).

O início precoce da restrição demonstrou resultados que favoreceram a redução de peso e mudanças na composição corporal tanto em animais alimentados com dieta adequada quanto com dieta desequilibrada na proporção de macronutrientes (ocidentalizada). Contudo, os resultados foram mais expressivos no grupo com dieta ocidentalizada. A restrição alimentar conseguiu reverter o processo de obesidade e alterações metabólicas. Contudo, para ser utilizada como uma terapia adicional contra a obesidade faz-se necessário investigar diversos outros fatores adicionais como as consequências em longo prazo e quais respostas fisiológicas e metabólicas podem ocorrer em função do retorno aos horários normais de alimentação.

A divisão do percentual de ganho de peso em dois períodos deveu-se as distintas fases de crescimento do rato. Como esperado, o período de maior ganho de peso nos grupos *ad libitum* ocorre quando o animal é mais jovem e a redução aparece proporcional ao avanço da idade. Em função da restrição, diferentes ganhos foram observados nos grupos restritos onde nos animais de dieta controle ocorreu na primeira fase e nos animais de dieta ocidentalizada ocorreu no segundo período de observação. De acordo com Novelli et al (2007), o peso e as medidas corporais (circunferência abdominal e IMC) aumentam proporcionalmente com a idade, mas, após 90 dias de vida essas medidas corporais permanecem constante.

Neste estudo, as medidas murinométricas (circunferência torácica, circunferência abdominal e IMC) mostraram-se maiores nos grupos alimentados com dieta ocidentalizada (*ad libitum* e restrito). Esta diferença foi observada tanto aos 90 dias quanto ao final do período da pesquisa, o que vem de encontro ao advogado por Novelli et al (2007). Estes autores observaram mudanças no peso corporal, ganho de massa corporal e IMC mais alto em ratos alimentados com uma dieta inadequada na composição de macronutrientes quando comparados aos ratos alimentados com dieta padrão de biotério.

Sinitskaya et al (2007) estudaram o efeito em longo prazo (10 semanas) de três dietas hiperlipídicas com diferentes proporções de gordura e carboidrato em ratos *Sprague-Dawley*. Das dietas utilizadas por estes autores, a que mais se aproximou da utilizada no presente estudo continha lipídio/carboidrato/proteína na proporção de 53:30:17 com 4,7kcal/g. Animais alimentados com esse tipo de dieta exibiram significativo aumento de IMC (13%), gordura abdominal (70%), assim como alto nível de leptina plasmática (130%) e menores níveis de adiponectina plasmática, além de tolerância a glicose prejudicada e resistência à insulina em relação ao grupo controle. O estudo de Angélico et al (2012) também detectou positiva associação entre gordura dietética (dieta com 50% de gordura), aumento de medidas murinométricas (IMC, índice de Lee e circunferência abdominal). Neste estudo os animais alimentados com dieta ocidentalizada revelaram 75% a mais de gordura abdominal, 30% de aumento do IMC, e entre 17-20% nas demais medidas murinométricas, circunferência abdominal e torácica respectivamente. Estes achados indicam que a dieta ocidentalizada foi tão ou mais eficaz em promover aumento de peso, de gordura e de dimensões corporais. Vale ressaltar que nenhuma diferença foi detectada quanto ao tamanho corporal dos animais. Ou seja, a dieta causou aumento de peso e alteração da composição corporal sem modificar o comprimento dos ratos.

O padrão de ingestão alimentar nos grupos *ad libitum* (dieta comercial e ocidentalizada) foi semelhante, mostrando um padrão regular com pico de ingestão nas primeiras 4 horas da fase escura do ciclo. O padrão e ritmo endógeno da alimentação foi estabelecido em estudos com animais (NASCIMENTO et al, 2013) e com humanos (SCHEER; MORRIS; SHEA, 2013). Em animais, o pico de ingestão

alimentar ocorre nas primeiras horas da fase escura, período ativo do rato; e, em humanos equivale ao pico da fome às 8:00hs do período ativo e também ao final do período ativo, às 20:00hs (SCHEER; MORRIS; SHEA, 2013). Nos grupos restritos (dieta comercial e ocidentalizada), inicialmente, o padrão de ingestão foi estabelecido em função da alteração da disponibilidade de alimento. Portanto, o animal era restrito de alimento durante as primeiras 8 horas da fase escura, momento de maior atividade e de ingestão alimentar, para animais de hábitos noturnos como os roedores (LAPOSKY et al, 2008). Esta restrição condicionou esses animais ao pico de ingestão nas últimas horas da fase escura, expondo os grupos restritos a apenas a um intervalo do período ativo do rato. Foi observado também que os grupos restritos com dieta padrão ingeriram mais ração em determinados momentos do ciclo que seu par correspondente. Contudo, este comportamento não foi observado no grupo GRO no primeiro intervalo da fase clara. Este consumiu menos que seu par controle. Essa redução no consumo alimentar pode ser justificada pelo efeito diferencial dos macronutrientes na saciedade provocado pela densidade energética (GERSTEIN et al, 2004). Essa metodologia mimetiza as condições que melhor assemelham ao estilo de vida ocidental em humanos, em termos de horário de consumo alimentar.

Independente de um período ou de horas de restrição, Kohsaka et al (2007) encontraram que o consumo de dieta hiperlipídica altera a função do relógio circadiano em mamíferos. A exposição a uma dieta rica em gordura provocou um maior consumo percentual de ingestão diária de alimentos durante o período de descanso (luz) e uma redução na fase escura.

Curiosamente, a alteração no ritmo de alimentação em animais alimentados com dieta rica em gordura ocorreu bem antes do início do ganho de peso significativo (KOHSAKA et al, 2007). Neste estudo, não se observou maior ingestão do grupo ocidentalizado na fase clara, mas sim, um aumento em torno de 40% na quantidade ingerida de alimento ao final da fase escura do grupo GO comparado ao GC. Provavelmente as diferenças de consumo entre este estudo e o Kohsaka et al (2007) deve-se ao distinto desenho metodológico. Evidenciamos, portanto, menor consumo alimentar quantitativo (g/100g de peso) e calórico (kcal/100g de peso). Em outro estudo (FARLEY et al, 2003) com dieta hiperlipídica, foram encontrados

resultados semelhantes em relação a quantidade consumida, mas, diferente em relação ao consumo energético. A divergência da ingestão energética entre o estudo de Farley e este, pode ser devido à densidade energética e/ou da composição ou proporção dos diferentes tipos de ácidos graxos das dietas. Além da quantidade total de gordura, a composição de ácidos graxos pode interferir nos desfechos fisiometabólicos.

Poucos estudos apresentam desenho metodológico semelhante ao do presente estudo tanto em função da dieta quanto do período de restrição, o que pode dificultar ou restringir a comparação dos resultados. A restrição alimentar em animais alimentados com dieta ocidentalizada não provocou uma maior ingestão alimentar durante o ciclo claro como observado no grupo com dieta comercial. O fato de que os alimentos ricos em gordura são mais densos em energia, têm maior palatabilidade e têm baixo poder de saciação e alto valor de saciedade, ajuda a explicar por que os indivíduos tendem a consumir excessivamente alimentos ricos em gordura, um processo denominado superconsumo passivo (GERSTEIN et al, 2004). Este fato pode ter acontecido no último intervalo da fase escura. Porém em função da maior quantidade de ácidos graxos de cadeia longa na luz intestinal, estes animais reduziram a ingestão alimentar (RITTER, 2004) na refeição subsequente (primeiro intervalo da fase clara).

Além disso, a modificação somente do horário da alimentação pode afetar hormônios relacionados com os períodos de saciedade (ARBLE et al, 2009). Uma dieta rica em gordura gera uma profunda reorganização de vias metabólicas específicas, levando à remodelação generalizada dos osciladores do fígado (ECKEL-MAHAN et al, 2012). Embora os mecanismos moleculares pelos quais uma dieta rica em gordura afeta o sistema circadiano não sejam conhecidos, sabe-se que perturbações metabólicas, como a restrição da ingestão energética a uma fase que se opõe à fase de alimentação tradicional, podem restabelecer quase todos os osciladores periféricos, alterando o balanço energético. Isso porque a ritmicidade circadiana hepática, em particular, é altamente responsiva ao consumo energético cíclico.

De forma curiosa, a curva glicêmica traçada nos animais parece ser dissociada do período de alimentação, ou seja, é sabido que o controle glicêmico é

regido pelas células localizadas no núcleo supraquiasmático (NSQ) independente do período de alimentação (LAFLEUR et al, 2001).

Ao longo das 24 horas a glicemia dos animais com dieta ocidentalizada *ad libitum* apresentou-se mais alta comparada ao grupo controle ao final da fase escura e principalmente durante toda a fase clara. O grupo ocidentalizada restrito manteve-se com glicemia menor do que o *ad libitum* diferindo nos mesmos pontos, exceto no início da fase clara. Apesar deste grupo apresentar glicemia menor que o seu controle de dieta, o grupo ocidentalizado restrito manteve uma glicemia significativamente mais alta em relação ao grupo comercial restrito nos dois últimos intervalos da fase escura. Aqui ressaltamos que tanto o grupo GO quanto o GRO demonstraram menor ingestão alimentar e energética comparados aos seus pares, condizentes com a dissociação do controle glicêmico pelo alimento. Entre os grupos com dieta comercial (*ad libitum* e restrito) foi observada glicemia significativamente menor no grupo restrito nos mesmos momentos da fase escura (dois últimos intervalos). Essa independência do controle glicêmico em relação à alimentação pode ser ressaltada com o resultado descrito acima, já que ao final da fase escura o alimento já tinha sido oferecido há 4 horas e apesar do alto consumo alimentar nesse período houve uma resposta inversa da glicemia no grupo comercial restrito.

Foi encontrado benefício na restrição alimentar sobre a glicemia, de forma mais expressiva no grupo com dieta comercial restrito. Resultado semelhante foi encontrado por Anson *et al* (2006) apesar do regime de restrição alimentar ser diferente da metodologia empregada na presente pesquisa. Em dietas com inadequada proporção de macronutrientes obtivemos uma redução da glicemia, demonstrando um efeito favorável da restrição mesmo em dietas ricas em gorduras (CHAIX *et al*, 2014). Entretanto, os efeitos negativos ocasionados por uma dieta desequilibrada (BUETTNER *et al*, 2006; BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; BHANDARI *et al*, 2010) se sobrepõem a um efeito positivo de forma isolada. Isso porque uma dieta rica em gordura por si só altera a função do oscilador circadiano em mamíferos (KOHSAKA et al, 2007) com negativas repercussões em longo prazo.

A realização da curva glicêmica entre as fases clara e escura dos grupos foi realizada em função das alterações já reveladas em estudos prévios que existe uma

oscilação cíclica na secreção insulínica entre os momentos de escuro e claro ao longo do dia ou em torno de 24hs (LAFLEUR et al, 2001). Neste teste foi observado que o grupo GRC mostrou diferenças nos dois intervalos finais da fase clara, demonstrando praticamente uma ausência de oscilação da concentração de glicose sanguínea. Reforçando que estímulos exógenos como a modificação do horário de oferta do alimento interferem na sincronização de ritmos fisiológicos a partir da expressão de um oscilador arrastado pelo alimento, FEO (DÍAZ-MUÑOZ et al, 2010).

O relógio biológico prepara o indivíduo para o próximo período de atividade por dois mecanismos distintos: aumento das concentrações de glicose no plasma e tornar o tecido mais tolerante à glicose. O possível mecanismo que explicaria esses resultados foram apresentados por Lafleur et al (2001) ao investigarem se o NSQ também era responsável pelas flutuações diárias na captação de glicose e examinar como estas flutuações se relacionavam com o ritmo da glicose plasmática em ratos com NSQ intactos e ratos com NSQ lesionados. Para isso foram injetados *bolus* (dose) intravenosos de glicose em diferentes momentos ao longo do dia. Como resultado, os pesquisadores encontraram um aumento na captação de glicose no início do período de atividade seguido por uma redução gradual na captação de glicose no final do mesmo período. A variação diária na tolerância à glicose não pareceu ser causada por flutuações nas respostas de insulina do pâncreas, mas por uma variação diária na sensibilidade à insulina. Isso porque em ratos com NSQ lesionados houve um desaparecimento da flutuação diária na captação de glicose e na sensibilidade à insulina. Contudo, ratos com NSQ intactos apresentaram um aumento da tolerância à glicose que não podia ser explicado por respostas de insulina mais elevadas ou sensibilidade à insulina aumentada. Portanto, estes achados sugerem que o NSQ influencia na absorção de glicose independente de insulina.

A dieta e a restrição também mostrou interferência sobre o teste de tolerância oral a glicose (TTOG) em ambas as fases. A glicemia elevada no grupo GO e a menor glicemia no GRO comparados respectivamente com o GC e o GO na fase clara, assim como a glicemia maior no GRO comparada aos grupos GRC e GO na fase escura confirmam-se na glicemia obtida sob a área da curva glicêmica.

Apesar de divergências entre metodologias em tempo de jejum prévio ao teste, via de administração de glicose (oral ou intraperitoneal) para a realização do teste e/ou fase do ciclo de 24 horas no qual foi realizado o TTOG, alguns resultados foram comparados. Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos que realizaram TTOG em ambas as fases do ciclo CE ou somente na fase escura.

A metodologia empregada na presente pesquisa, 6 horas de jejum prévio ao teste de tolerância a glicose via oral, assim como a quantidade de glicose administrada como são consideradas as melhores condições para avaliar a tolerância à glicose em ratos (ANDRIKOPOULOS et al, 2008). Andrikopoulos et al (2008) encontraram que animais alimentados com dieta hiperlipídica (60% de gordura) por 8 semanas apresentaram maiores níveis de intolerância à glicose comparados a animais alimentados com dieta padrão. Resultado esse semelhante ao nosso, podendo ser justificado tanto pelo momento ao qual o teste é realizado, fase clara momento esse em que o organismo do modelo animal utilizado está preparado para o descanso, portanto há uma reduzida sensibilidade a insulina.

Chaix et al (2014) após manipulação dietética e/ou restrição alimentar por semanas induziu um jejum de 16 horas nesses animais para realização do teste de tolerância à glicose intraperitoneal. Entre grupos com dieta hiperlipídica (60% de gordura) a restrição reduziu a intolerância à glicose bem como melhorou a tolerância entre grupos que mantiveram a restrição. Outro achado no estudo de Chaix et al (2014) com o desse estudo foi a redução da tolerância à glicose provocada pela dieta hiperlipídica. Os resultados do teste de tolerância confirmaram-se a partir dos resultados obtidos pela área sob a curva.

A dieta ocidentalizada, semelhante a outros estudos que utilizam dieta elevada em gordura, (DUARTE et al, 2006; NOVELLI et al, 2007; SINITSKAYA et al, 2007; ANGÉLOCO et al, 2012) propiciou um aumento da gordura visceral que pode ou não vir acompanhada de aumento de peso corporal geral.

A composição corporal de animais que consomem dieta rica em gordura apresenta-se semelhante mesmo quando expostos a regime alimentar diferentes. No estudo de Novelli et al (2007) o percentual de gordura corporal estimado através da gordura visceral (gonadal e retroperitoneal), da circunferência abdominal e da

gordura da carcaça do animal foi maior em animais que consumiram dietas hiperlipídicas.

Quanto ao peso dos órgãos, a restrição em dieta comercial revelou um aumento do peso relativo do fígado e estômago, entretanto em dieta ocidentalizada resultado inverso foi encontrado.

Dentre as hipóteses que podem explicar o maior peso do estômago entre os animais do grupo GRC, estaria a dilatação do órgão devido a maior quantidade consumida em um curto espaço de tempo, observado em dois momentos do ciclo. O estômago é um órgão que apresenta elevada complacência, e quanto maior for esta complacência, maior a capacidade de acomodar conteúdo sem elevar a pressão intragástrica. A complacência gástrica é ajustada por alterações momento a momento no tônus do estômago proximal. Caracterizada como a relação entre o volume e a pressão visceral, a complacência do estômago proximal está relacionada com a saciedade (TACK *et al*, 2003).

Duarte *et al* (2006) após expor animais a uma dieta hiperlipídica pós desmame e mantê-la por 15 semanas não encontrou alteração de peso relativo do fígado comparado a animais alimentados com ração controle, embora tivessem menor peso.

Ao realizar o teste de preferência alimentar observa-se que a dieta com maior quantidade de glícídios foi a dieta preferida pelo GRC e a com maior quantidade de lipídios foi a preferida pelo grupo GRO comparado ao GRC. O GRC demonstra ainda uma preferência à dieta lipídica comparada ao GC. Essas seleções podem retratar alterações no sistema energético intracelular, expressão de peptídeos cerebrais, osciladores circadianos (KYRKOULI; STRUBBE; SCHEURINK, 2006) e outros a exemplo do estresse causado pela ausência de alimento.

A privação alimentar pode ser considerada um modelo de estresse crônico variável. Animais expostos a esse modelo de estresse apresentam menor consumo de alimento doce comparado a animais não estressados (GAMARO *et al*, 2003). Igualmente, Barnes, Primeaux e Bray (2008) encontraram que animais expostos à privação alimentar preferiam dieta hiperlipídica. Os resultados apresentados por autores anteriores divergem dos achados deste estudo visto que apenas os animais

restritos submetidos à dieta ocidentalizada exibiram a preferência por lipídios comparados aos restritos com dieta padrão.

Assim como a restrição alimentar, o consumo de dietas consideradas palatáveis está associado ao estresse. Em contraste, há evidências na literatura que indivíduos submetidos a situações de estresse relatam ingerir alimentos considerados “*comfort foods*” (chocolate, doces e bolachas) (GIBSON, 2006). A explicação para os achados são complexas e envolvem desde o teste de preferência até a alteração neuroendócrina.

Portanto, os protocolos de preferência variam desde a seleção de dietas alteradas em macronutrientes a aqueles realizados por seleção do macronutriente por si só, ou seja, a oferta apenas de gordura, de proteína ou de carboidrato, ou ainda, a partir do índice de preferência alimentar utilizado por Beck, Musse e Stricker-Kongrad (2002). Esses autores encontraram uma relação entre grelina e preferência alimentar, onde animais com reduzidas concentrações de grelina preferiram dieta rica em gordura e que esta também estaria inversamente associada aos níveis glicêmicos. Portanto, maiores níveis glicêmicos, menor concentração de grelina. Não mensuramos os níveis de grelina neste estudo, mas, podemos observar maiores valores glicêmicos nos grupos deste estudo alimentados com dieta ocidentalizada.

O estudo da preferência alimentar em trabalhos prévios tem enfatizado também o padrão de seleção por períodos do ciclo 24hs. Assim, foi observado que animais que recebiam injeção de galanina no núcleo paraventricular apresentavam uma preferência alimentar diferente entre o início e o final da fase escura, com maior preferência por gordura no início da fase e por carboidrato no final da mesma fase (TEMPEL; LEIBOWITZ, 1990; ADAMS et al, 2008). Adams et al (2008) confirmou a hipótese que a galanina regula a ingestão, especificamente de gorduras. Em outro estudo, foi observado que na fase escura ocorria preferência por carboidratos em detrimento de gordura e, que, a própria expressão do peptídeo pode ser influenciada pela predominância do macronutriente na alimentação (BECK; MUSSE; STRICKER-KONGRAD, 2002). Diante desses achados, nosso grupo tem a perspectiva de realizar medidas relacionadas à quantificação dos níveis de neuropeptídeos envolvidos na seleção e comportamento alimentar.

Existem alguns trabalhos mostrando os efeitos da manipulação nutricional e farmacológica na sequência comportamental de saciedade. Desenhos metodológicos semelhantes ao desse estudo não foram encontrados na literatura consultada. No entanto, estudos prévios documentam tanto em nível de manipulação dietética, quanto farmacológica, alterações sobre o comportamento alimentar animal, geralmente estudadas com base no monitoramento da sequência comportamental de saciedade.

Dentre as principais estratégias experimentais que podem ser adaptadas para investigar o mecanismo de ação de agentes anorexígenos, a mais comum é o efeito do uso de drogas anoréxicas agindo sobre o sistema neuroquímico do cérebro. Outra estratégia que tem sido amplamente negligenciada em pesquisa com drogas anoréxicas enfatiza análises precisas e sensíveis do comportamento como uma ferramenta para elucidar como drogas inibem o consumo de alimento e o caminho de como drogas podem ajustar os padrões de alimentação (BLUNDELL et al, 1980).

As hipóteses iniciais de que a SCS seria influenciada tanto pela inadequada proporção de macronutrientes quanto pela alteração da disponibilidade de alimento ao longo das 24hs, foram apoiadas pelos resultados encontrados. As manipulações realizadas não interromperam a sequência comportamental de saciedade. Entretanto, provocaram mudanças no tempo gasto nas atividades de descanso e alimentação.

Foi demonstrado que a saciedade foi alcançada tanto na manipulação dietética quanto na alteração da disponibilidade de alimento, assim como na associação dessas manipulações. Esta afirmação se comprova ao final da refeição quando os ratos param de se alimentar e se engajam no comportamento de limpeza e exploração por um curto período de tempo, e, em seguida, descansam ou dormem (ANTIN et al, 1975). São essas as características específicas da sequência comportamental de saciedade demonstrada pela primeira vez em 1922, que quando presentes caracterizam o disparo da saciedade em ratos.

A ingestão prolongada de uma dieta rica em gordura está associada ao consumo excessivo e à obesidade, mas os mecanismos subjacentes ainda não estão tão claros (SAVASTANO; COVASA, 2005). A forma característica de um padrão alimentar (tamanho das refeições, lanches) é determinada pelos efeitos

coordenados da saciação e da saciedade que controlam o tamanho e a frequência dos episódios de comer. Apesar do baixo efeito da gordura na saciação, este pode ser alterado devido à presença da proteína (BLUNDELL; MACZNARMD, 1997). Uma das possíveis explicações para que animais alimentados com dieta ocidentalizada *ad libitum* tenham atingido a saciação mais rapidamente, e, prolongado mais a saciedade, seja a proporção de proteína na dieta experimental. Além disso, existe a possibilidade que os mecanismos de saciedade induzidos pela gordura possam ser alterados em resposta à ingestão crônica de gordura, de modo que a sua sensibilidade ou eficácia seja diminuída (SAVASTANO; COVASA, 2005).

A saciedade, o processo fisiológico de terminar uma refeição, é mediada predominantemente por sinais de realimentação provenientes do trato gastrointestinal. Os déficits nos sinais de saciedade são fortemente suspeitos de acompanhar a obesidade, contribuindo para a sua patogênese tanto em seres humanos como em ratos. Um desses sinais de saciedade é a colecistoquinina (CCK), cujos efeitos sobre a ingestão de alimentos estão diminuídos em ratos adaptados a uma dieta rica em gordura (SAVASTANO; COVASA, 2005).

A composição da dieta pode levar a alterações nos neuropeptídeos dos núcleos cerebrais que regulam o metabolismo energético. Igualmente, manipulações que influenciam o comportamento alimentar também podem afetar o gasto energético (LEVINE; KOTZ; GOSNELL, 2003).

Kohsaka *et al* (2007) encontraram que o consumo de dieta hiperlipídica altera a função do “oscilador circadiano” em mamíferos. A exposição a uma dieta rica em gordura durante 4 semanas provocou um ritmo diurno global na alimentação e atenuação no ritmo noturno deste comportamento. Paralelamente às alterações no comportamento alimentar, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um ritmo diurno menor de atividade locomotora em comparação com os animais alimentados com dieta controle. Neste mesmo estudo, a investigação da expressão de “genes osciladores” tanto no tecido adiposo como hepático, mostrou alterados padrões de expressão.

A dieta também alterou o sistema metabólico do Sistema Nervoso Central (SNC), os níveis globais de transcritos que codificam neuropeptídeo Agouti (AGRP) e neuropeptídeo Y (NPY) foram reduzidos enquanto que os RNAs que codificam

peptídio pro-opiomelanocortina (POMC) e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART) foram aumentados. Além disso, foi observada uma redução no ritmo diurno da expressão do gene *Orx* em animais alimentados com dieta hiperlipídica devido à diminuição dos níveis de *Orx* no final do período de luz em antecipação ao início da atividade (KOHSAKA et al, 2007).

Visando detectar as mudanças detalhadas no comportamento alimentar como ocorre após um período de privação alimentar, uma técnica observacional microanalítica tem sido empregada para revelar como os elementos estruturais da alimentação são organizados dentro de uma sequência alimentar completa (BLUNDELL et al, 1980).

Estudos anteriores com consumo *ad libitum* de uma dieta com alto teor de gordura indicam que a ingestão de gordura atenua os efeitos produtores de saciedade da leptina (LIN et al, 2001), bem como a responsividade às ações dos peptídeos intestinais que normalmente inibem a alimentação e retardam o esvaziamento gástrico (COVASA; GRAHN; RITTER, 2000; SAVASTANO; COVASA, 2005). Apesar desses dados da literatura, os grupos que consumiram dieta ocidentalizada (*ad libitum* e restrito) o grupo *ad libitum* demonstrou os melhores parâmetros da microestrutura da refeição comparado ao controle, a nível comportamental.

O controle alimentar é um mecanismo complexo que envolve apetite, motivação e demandas energéticas do organismo. Estes aspectos podem ser modificados por diferentes fatores como a disponibilidade de alimento e o estresse (ELY et al, 1997).

Dentre os trabalhos publicados utilizando a SCS não foi investigado o impacto da restrição alimentar/alteração da disponibilidade alimentar sobre a sequência. Os resultados do presente trabalho mostram que a restrição acelerou o disparo da saciedade em dieta com adequada proporção de macronutrientes. Porém, quando se utiliza uma dieta hiperlipídica este disparo da saciedade foi retardado quando comparado ao seu controle. Esses achados são reforçados pelos parâmetros da microestrutura da refeição, no qual o grupo comercial restrito apresenta menor duração e tamanho da refeição comparado ao controle.

Simple modificação do horário da alimentação pode afetar hormônios relacionados com a saciedade (ARBLE et al, 2009). Os resultados parecem ser positivos, pois houve uma aceleração da saciedade quando a restrição esteve associada a uma dieta adequada em proporção de macronutrientes. Porém, quais hormônios especificamente estejam elevados ou reduzidos nesse regime de restrição alimentar ou quando associado a uma dieta inadequada na proporção de macronutrientes, ainda são desconhecidos.

Com base nesses resultados, podemos concluir que alteração do horário da alimentação e/ou composição dietética, ou seja, um maior consumo alimentar ao final fase escura do ciclo (momento em que, fisiologicamente o organismo do rato está se preparando para o descanso) associada ou não a uma dieta desequilibrada em macronutrientes, causam alterações metabólicas e no comportamento alimentar. E, apesar do estudo não mensurar a atividade locomotora, os genes envolvidos no controle do “relógio biológico” ou os neuropeptídios e hormônios responsáveis pelo comportamento alimentar, podem promover alterações metabólicas que podem contribuir para instalação de obesidade e morbidades correlatas como o diabetes e ser característica de uma alteração na fisiologia circadiana. Em adição, essas manipulações dietéticas podem gerar uma desorganização na secreção hormonal e expressão de neuropeptídios envolvidos no controle do comportamento alimentar exacerbando algumas desordens metabólicas.

9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que alteração do horário da alimentação e/ou composição dietética, ou seja, restrição seguida de um maior consumo alimentar ao final fase ativa, (período em que, fisiologicamente, o organismo está se preparando para descansar associada ou não a uma dieta desequilibrada em macronutrientes) provoca alterações no metabolismo e no comportamento alimentar, gerando um adiantamento ou um atraso na saciedade com prováveis repercussões na saúde do organismo.

Como limitações do estudo, não foi realizada nenhuma investigação no aspecto molecular como a expressão de genes osciladores em tecidos periféricos relacionados ao metabolismo energético e nem dosagens hormonais ou de neuropeptídeos envolvidos no controle do comportamento alimentar.

Contudo, este é o primeiro estudo a explorar a influência no comportamento alimentar ocasionado pela alteração do horário da alimentação e/ou composição dietética e a relação da alimentação com os ritmos biológicos e distúrbios metabólicos dentro dessa perspectiva. Por isso, estudos adicionais serão necessários para melhor explicar os mecanismos subjacentes aos resultados encontrados no trabalho.

Referências

ACKROFF, K.; SCLAFANI A. Rats integrate meal cost and post-oral changes in caloric density. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 3, p. 927-932, 1996.

ADAMS, A. C. et al. Feeding Behaviour in Galanin Knockout Mice Supports a Role of Galanin in Fat Intake and Preference. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 199–206, 2008.

ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 295, p. 1323-1332, 2008.

ANGÉLOCO, L. R. N. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 331-339, maio/jun., 2012.

ANSON, R. M. 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, mai. 2003.

ANTIN, J. et al. Cholecystokinin Elicits the Complete Behavioral Sequence of Satiety in Rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 89, n. 7, p. 784-790, 1975.

ARBLE, D. M. et al. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. **Obesity**, v.17, p. 2100-2102, 2009.

BARCLAY, J. L. et al. Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. **PLoS ONE**, v.7, p. 1-11, 2012.

BARNES, M. J.; PRIMEAUX, S. D.; BRAY, G. A. Food deprivation increases the mRNA expression of μ -opioid receptors in the ventral medial hypothalamus and arcuate nucleus. **American journal of physiology- Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, p. 1385–1390, set. 2008.

BARON, K. G. et al. Role of sleep timing in caloric intake and BMI. **Obesity**, v. 19, p. 1374-1381, 2011.

BARTON, C.; YORK, D. A.; BRAY, G. A. Opioid receptor subtype control of galanin-induced feeding. **Peptides**, v. 17, n. 2, p. 237-240, 1996.

BECK, B.; MUSSE, N.; STRICKER-KRONGRAD, A. Ghrelin, Macronutrient Intake and Dietary Preferences in Long-Evans Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 292, p.1031–1035, 2002.

BELISIO, A. S. et al. Métodos cronobiológicos aplicados à neurociência clínica e experimental. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. S. **Métodos em neurociência**. São Paulo: Manole, 2012. p. 114-127.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revised: ingestive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 2, p. 189-287, 1996.

BHANDARI, U. et al. The effect of high-fat diet-induced obesity on cardiovascular toxicity in wistar albino rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1313–1321, 2010.

BLUNDELL, J. E et al. BEHAVIOURAL ANALYSIS OF FEEDING: IMPLICATIONS FOR THE PHARMACOLOGICAL MANIPULATION OF FOOD INTAKE IN ANIMALS AND MAN. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 4, p. 319-326, 1980.

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, Suppl 1, S29–S34, 2001.

BLUNDELL, J. E.; MACZNARMD, J. I. Fat as a risk factor for overconsumption: Satiety, satiety e patterns of eating. **JOURNAL OF THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION**, p. S63-S69, 1997.

BOULOS, Z. et al. Photic entrainment in hamsters: effects of simulated twilights and nest box availability. **Journal of Biological Rhythms**, v. 11, n. 3, p. 216-233, 1996.

BOULOS, Z.; TERMAN, M. Food availability and daily biological rhythms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 4, p. 119-131, 1980.

BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.36, p. 485–501, 2006.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. **OBESITY**, v. 15, n. 4, p.798-808, abr. 2007.

BURTON-FREEMAN, B.; GIETZEN, D. W., SCHNEEMAN, B. O. Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. **American Journal of Physiology**, v. 273, n. 6 pt2, p. R1916-1922, 1997.

CARNEIRO, B. T. S.; ARAUJO, J. F. Food entrainment: major and recent findings. **Frontiers in BEHAVIORAL NEUROSCIENCE**, v. 6, n. 83, p. 1-6, 2012.

CAVALCANTE, J. C. Com gosto de FEO: a procura pelo oscilador circadiano sincronizado pelo alimento. **Neurociências**, v. 4, n. 2, 2008.

CAVALCANTE, T. C. F. et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157-1168, nov. 2013.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, 2006.

CHAIX, A. et al. Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. **Cell Metabolism**, v. 20, p. 991–1005, dez. 2014.

CHIARA, V. L.; SICHIERI, R.; CARVALHO, T. D. S. F. D. Teores de ácidos graxos trans de alguns alimentos consumidos no Rio de Janeiro. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 227-233, 2003.

CHOU, T. C. et al. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. **THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE**, v. 23, p.10691-10702, 2003.

COMPERATORE, C.A.; STEPHAN, F.K. Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. **Physiology & Behavior**, v. 47, p. 671-678, 1990.

COVASA, M.; GRAHN, J.; RITTER, R. C. High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK. **Regulatory Peptides**, v. 86, n. 1-3, p. 83-88, jan. 2000.

DAVIDSON, A.J.; STEPHAN, F.K. Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats. **Journal of Biological Rhythms**, v. 13, p. 422-429, 1998.

DÍAZ-MUÑOZ, M. et al. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. **Comparative hepatology**, v. 9, n. 1, p. 5, jan. 2010.

DUARTE, A. C. G. O. et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-348, maio/jun. 2006.

ECKEL-MAHAN, K. L. et al. Reprogramming of the Circadian Clock by Nutritional Challenge. **Cell**, v. 155, p. 1464–1478, dez. 2013.

EDMONDS, S.C. Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 18, p. 915-919, 1977.

EGECIOGLU, E. et al. Hedonic and incentive signals for body weight control. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.12, n. 3, p.141–151, 2011.

ELY, D. R. et al. Effect of restraint stress and feeding behavior of rats. **Physiology & Behavior**, v. 61, p. 395-398, 1997.

ESTRELA, D. C. et al. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 252–263, 2015.

FARLEY, C. et al. Meal Pattern Analysis of Diet-Induced Obesity in Susceptible and Resistant Rats. **OBESITY RESEARCH**, v. 11, n. 7, p. 845-85, jul. 2003.

FEILLET, C. A.; ALBRECHT, U.; CHALLET, E. Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. **Current biology**, v. 16, n. 20, p. 2016–22, out. 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistics Database. 2004. <http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID5368> (acesso em 6 de julho de 2015).

GAMARO, G. D. et al. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain strutures. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 107-114, 2003.

GERSTEIN, D. E. et al. Clarifying Concepts about Macronutrients' Effects on Satiation and Satiety. **Journal of THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION**, v. 104, n. 7, p. 1151-1153, jul. 2004.

GIBSON, E. L. Emotional on food choice: sensory, physiological and psychological and psychological pathways. **Physiology & Behavior**, v. 89, n.1, p.53-61, 2006.

GIGANTE, D. P. et al. Prevalência de obesidade em adultos e seus fatores de risco. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 236-246, 1997.

GREENWOOD, C. E. Effects of dietary fatty acid composition on macronutrient selection and synaptosomal fatty acid composition in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1561-1568, 1989.

HALFORD, J.C.; WANNINAYAKE, S.C.; BLUNDELL, J.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, out. 1998.

HERMINGHUYSEN, D.; PLAISANCE, K.; PACE, R.; PRASAD, C. Prolonged stimulation of corticosterone secretion by corticotropin-releasing hormone in rats exhibiting high preference for dietary fat. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 251-254, 1998.

HIDALGO, M. S. et al. Revisão sobre cronobiologia e aspectos cognitivo-comportamentais relacionados à cronotipos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, p. 174-181, 2003.

HOLDER, M. D. Role of prefeedings, plasma amino acid ratios and brain serotonin levels in carbohydrate and protein selection. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 1, p. 113-119, 1990.

ISHIIA, Y. et al. Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 79, p. 227–238, 2003.

KENNY, P.J. Reward mechanisms in obesity: New insights and future directions. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 664–679, 2011.

KNUTSSON, A. Health disorders of shift workers. **Occupational Medicine**, v. 53, n. 2, p. 103-108, 2003.

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

KRIEGER, D. T.; HAUSER, H.; KREY, L.C. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. **Science**, v. 197, p. 398-399, 1977.

KUROSE, Y.; TERASHIMA, Y. Histamine regulates food intake through modulating noradrenaline release in the para-ventricular nucleus. **Brain Research**, v. 828, p. 115-118, 1999.

KYRKOULI ., S.E.; STRUBBE, J. H.; SCHEURINK, A. J.W. Galanin in the PVN increases nutrient intake and changes peripheral hormone levels in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 89, p. 103–109, 2006.

LA FLEUR, S. E. et al. A daily rhythm in glucose tolerance. **Diabetes**, v. 50, p. 1237-1243, 2001.

LAPOSKY, A. D. et al. Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. **FEBS Letters**, v. 582, p. 142–151, 2008.

LE FLOCH, J. P.; ESCUYER, P.; BAUDIN, E.; BAUDON, D.; PERLEMUTER, L. Blood glucose area under the curve: Methodological aspects. **Diabetes Care**, v.13, n. 2, p. 172-175, 1990.

LEIBOWITZ, S. F. Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 12, p. 491-497, 1992.

LEVINE, A. S.; KOTZ, C. M.; GOSNELL, B. A. Sugars and Fats: The Neurobiology of Preference. **American Society for Nutritional Sciences**, S831-S834, 2003.

LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MONTEIRO, C. A. Sugar and total energy content of household food purchases in Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 12, p. 2084–2091, 2009.

LIN, L. et al. Acute changes in the response to peripheral leptina with alteration in the diet composition. **American journal of physiology - Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, p. R504–R509, 2001.

LU, J. et al. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. **THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE**, v. 21, p. 4864-4874, 2001.

LUTTER, M.; NESTLER, E.J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 3, p. 629–632, 2009.

MACHT, M. Effects of noise-induced arousal on chewing to sweet food and the subjective motivation to eat. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 213-222, 1998.

MASEK, J.; FABRY, P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. **Experientia**, v. 15, p. 444-445, nov. 1959.

MEGUID, M. M.; GLEASON, J.R.; YANG, Z. J. Olfactory bulbectomy in rats modulates feeding pattern but not total food intake. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 3, p. 471-475, 1993.

MELHORN, S. J. et al. Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 1, p. 33–39, jan, 2010.

MELO, P.R. et al. A fase fértil da fêmea sincroniza o perfil diário da marcação de cheiro em saguis (*Callithrix jacchus*) machos? **Publica**, p. 86-97, 2006.

MENDONÇA, C.P.; ANJOS, L.A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Caderno de Saúde Pública** [online], v.20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MIÑANA-SOLIS, M. C. et al.. Differential Effects of a restricted Feeding Schedule on Clock- Gene Expression in the Hypothalamus of the Rat. **Journal Chronobiology International**, v. 6, p. 808-820, 2010.

MORIMOTO, T.; YAMAMOTO, Y.; YAMATODANI, A. Brain histamine and feeding behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 124, p. 145-150, 2001.

MORLEY, J. E. Neuropeptide regulation of appetite and weight. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 256-287, 1987.

MROSOVSKY, N. Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 71, p. 343-372, 1996.

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

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

OIKE, H; OISHI, K.; KOBORI, M. Nutrients, Clock Genes, and Chrononutrition. **Current Nutrition Reports**, v. 3, p. 204-212, 2014.

OISHI, K.; ITOH, N. Disrupted daily light-dark cycle induces the expression of hepatic gluconeogenic regulatory genes and hyperglycemia with glucose intolerance in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, p. 111-115, 2013.

OLIVEIRA, L. S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, v. 86, p. 119–124, 2011.

OLIVEIRA, L. S.; SOUZA, S. L.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Behavioral satiety sequence: an experimental model for studying feeding behavior. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 4, p. 619-628, jul./ago. 2011.

OOSTERMAN, J. E. et al. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. **American journal of physiology - Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, p. R337–R350, 2015.

OROZCO-SÓLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology & Behavior**, v. 96, p. 481–492, 2009.

PIMENTA, A.M. et al. Trabalho noturno e risco cardiovascular em funcionários de universidade pública. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p.168-177, 2012.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 871S-873S, mar. 2001.

REFINETTI, R. Daily activity pattern of a nocturnal and a diurnal rodent in a seminatural environment. **Physiology & Behavior**, v. 82, p. 285-294, 2004.

RITTER, R. C. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 249–273, 2004.

RODGERS, R.J.; HOLCH, P.; TALLETT, A. J. Behavioural satiety sequence (BSS): Separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 3-14, 2010.

SAHAR, S.; SASSONE-CORSI, P. Regulation of Metabolism: The Circadian Clock dictates the Time. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 1–8, jan. 2012.

SANTOS, A. C. A. et al. ESTUDO BIOMÉTRICO DE RATOS ALIMENTADOS COM DOIS TIPOS DE DIETA. **Colloquium Vitae**, v. 2, n. 2, p. 01-05, jul/dez. 2010.

SAVASTANO, D. M.; COVASA, M. Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1953-1959, ago. 2005.

SCHEER, F. A. J. L; MORRIS, C. J.; SHEA, S. A. The Internal Circadian Clock Increases Hunger and Appetite in the Evening Independent of Food Intake and Other Behaviors. **Obesity**, v. 21, p. 421-423, 2013.

SCHMIDT, M. I. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **Saúde no Brasil 4** [online], mai, 2011.

SHOR-POSNER, G. et al. Meal patterns of macronutrient intake in rats with particular dietary preferences. **American journal of physiology - Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 226, n. 35, p. R1395-R1402, 1994.

SINITSKAYA, N. et al. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. **Clinical Science**, v. 113, p. 417–425, 2007.

STEPHAN, F. K.; SWANN, J. M.; SISK, C.L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. **Behavioral and Neural Biology**, v. 25, p. 545-554, 1979.

STEPHAN, F.K. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. **Physiology & Behavior**, v. 62, p. 995-1002, 1997.

STEPHAN, F.K. Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access. **Physiology & Behavior**, v. 32, p. 663-671, 1984.

STEPHAN, F.K. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, p. 284-292, 2002.

STEPHAN, F.K.; DAVIDSON, A. J. Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock. **Physiology & Behavior**, v. 65, p. 277-288, 1998.

STETTER, K. R.; MCCANN, L. I.; LEAFGREN, M. A.; SEGAR, M. T. Diet preference in rats (*Rattus norvegicus*) as a function of odor exposure, odor concentration, and conspecific presence. **Journal of Comparative Psychology**, v. 109, n. 4, p. 384-389, 1995.

STORLIEN L. H. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipids. **Diabetes**, v. 40, p. 280– 289, 1991.

STORLIEN, L. H. et al. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v. 39, n. 6, p. 621-631, jun. 1996.

SWIERGIEL, A. H.; CABANAC, M. Lack of caloric regulation in rats during short-term feeding. **American Physiological Society**, v. 256, p. 518-522, 1989.

TACK, J. et al. Assessment of meal induced gastric accommodation by a satiety drinking test in health and in severe functional dyspepsia. **Gut**, v.52, p. 1271–1277, 2003.

TALLETT, A.J.; BLUNDELL, J.E.; RODGERS, R.J. Night and day: Diurnal differences in the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 125–130, 2009.

TARDIDO, A.P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v. 21, n. 2, p. 117-124, 2006.

TEMPEL, D. L.; LEIBOWITZ, S. F. Galanin inhibits insulin and corticosterone release after injection into the PVN. **Brain Research**, v. 536, p. 353–357, 1990.

US Department of Agriculture ARS, Beltsville Human Nutrition Research Center, Food Surveys Research Group & US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. What We Eat in America, NHANES 2009-2010. www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrg, 2012. Acesso em: 22 outubro 2015.

VAN ESSEVELDT, K. E.; LEHMAN, M. N.; BOER, G. J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. **Brain Research**, v. 33, n. 1, p. 34-77, ago. 2000.

VIANA, V. Psicologia, saúde e nutrição: Contributo para o estudo do comportamento alimentar. **Análise Psicológica**, n. 4, p. 611-624, 2002.

VIANA, V.; SINDE, S. Estilo alimentar: Adaptação e validação do Questionário Holandês do Comportamento Alimentar (artigo enviado para publicação na revista **Psicologia: Teoria, Investigação e Prática**). 2002.

VIEIRA, E. et al. The Clock Gene Rev-erb_β Regulates Pancreatic β -Cell Function: Modulation by Leptin and High-Fat Diet. **Endocrinology**, v. 153, p. 592–601, 2012.

WHITE, B. D.; DEAN, R. G.; MARTIN, R. J. Association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increased food intake. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 173-182, 1998.

WHO. 2008–2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. 2008. <http://www.who.int/nmh/Actionplan-PC-NCD-2008.pdf> (acesso em: 15 de junho de 2015).

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

YOUNG, S. N. Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: basic and clinical aspects. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 2, p. 313-323, 1996.

Apêndice

APÊNDICE A – Sequência Comportamental de Siedade

SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE

ANIMAL/GRUPO:

PESO RAÇÃO INÍCIO:

DATA EXPERIMENTO:

TRATAMENTO:

PESO RAÇÃO FINAL:

PESO ANIMAL:

ALIMENTAÇÃO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
1=	2=	3=	4=	5=	6=	7=	8=	9=	10=	11=	12=

LIMPEZA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
1=	2=	3=	4=	5=	6=	7=	8=	9=	10=	11=	12=

DESCANSO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
1=	2=	3=	4=	5=	6=	7=	8=	9=	10=	11=	12=

Anexo

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Recife, 11 de dezembro de 2014.

Ofício nº 84/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**
 Departamento de Anatomia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.019767/2014-38

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Aspectos do comportamento alimentar e de parâmetros metabólicos como alvo de investigação decorrentes da alteração do ritmo alimentar e/ou da composição dietética."**

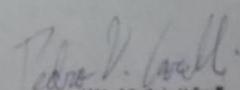
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Atenciosamente,

Origem dos animais: Biotério de Criação do Departamento de Nutrição - CCS/UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Idade: 90-120 dias; Peso: 250±20 e 350±20g; Número de animais previstos no protocolo: 155.


 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCS - UFPE
 SAPE 1801384

CCB: Integrar para desenvolver