



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ *PROFESSOR ALOÍSIO TEIXEIRA*
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO**

***RESPOSTA ALIMENTAR À INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE
ANOREXÍGENOS E EXPRESSÃO DE *ObRb* E *FOXO 1* EM HIPOTÁLAMO DE RATAS
SOB RESTRIÇÃO ALIMENTAR INTERMITENTE***

Carlos Marcelo Concha Vilca

Macaé
Abril 2017

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus UFRJ-Macaé *Professor Aloísio Teixeira*
Instituto de Nutrição Josué de Castro

**RESPOSTA ALIMENTAR À INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE
ANOREXÍGENOS E EXPRESSÃO DE *ObRb* E FOXO 1 EM HIPOTÁLAMO DE
RATAS SOB RESTRIÇÃO ALIMENTAR INTERMITENTE**

Carlos Marcelo Concha Vilca

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadoras

Prof^a Dr^a Kelse Tibau de Albuquerque

Prof^a Dr^a Maria das Graças Tavares do Carmo

Macaé
Abril 2017

Vilca, Carlos Marcelo Concha

Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de anorexígenos e expressão de ObRb e FOXO 1 em hipotálamo de ratas sob restrição alimentar intermitente/ Carlos Marcelo Concha Vilca.- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós Graduação em Nutrição 2017.

xix, 40 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Kelse Tibau de Albuquerque e Maria das Graças Tavares do Carmo.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, INJC, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2017.

Referências bibliográficas: f. 35-39.

1. Metabolismo. 2. Dieta redutora. 3. Depressores do apetite. 4. Transtorno da compulsão alimentar. 5. Receptores para leptina. 6. Gluconeogênese. 7. Nutrição - Tese. I. Albuquerque, Kelse Tibau. II. Carmo, Maria das Graças Tavares. III. UFRJ, INJC, Programa de Pós-graduação em Nutrição. IV. Título.

RESPOSTA ALIMENTAR À INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ANOREXÍGENOS E EXPRESSÃO DE ObRb E FOXO 1 EM HIPOTÁLAMO DE RATAS SOB RESTRIÇÃO ALIMENTAR INTERMITENTE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE **MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA**.

Examinada por:

Profª Drª Kelse Tibau de Albuquerque – UFRJ - Campus Macaé- Presidente da banca

Profª Drª Maria das Graças Tavares do Carmo – UFRJ - INJC



Profª Drª Mônica Marques Telles

Membro Externo – UNIFESP- Campus Diadema

Profª Drª Kátia Calvi Lenzi de Almeida

Membro Externo – UFRJ – Campus Macaé

Profª Drª Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha

Membro Interno e revisora– UFRJ – INJC

MACAÉ, RJ – BRASIL

ABRIL/2017

DEDICATÓRIA

A minha família, pessoas de poucas palavras, a pesar da distância, além das dificuldades nunca me abandonaram, nem me deixaram de apoiar.

A você Mãe, por me cuidar nos momentos em que a vida colocou a provas mais difíceis para mim, pelo carinho, pelo amor e preocupação.

Pai, as vezes olhamos as coisas diferentes, agora tão longe de mim, mas sempre me apoiando, no seu jeito; obrigado porque não deixaste de acreditar em mim.

Irmãs, sobrinhos, obrigado por sempre me lembrar, a pesar de tudo.

A minha outra família, que de um jeito particular, que só eles sabem, sempre me alentaram, a seguir na luta, obrigado por sua alegria.

Ao amor da minha vida, Monona, por cuidar de mim, por não me deixar perder, por ser minha fortaleza, minha amiga, minha companheira, minha cúmplice neste caminho em que a vida nos juntou e que decidimos seguir até ser muito velhos.

AGRADECIMENTOS

“O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da CAPES/CNPq - Brasil”.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar uma segunda oportunidade na vida, por todas as bênçãos, as dificuldades, os acertos e os erros, já que graças a eles eu sou o que sou.

A minha querida orientadora, a Profa. Kelse Tibau de Albuquerque, por me ajudar sem me conhecer, por me permitir mudar a minha história, por tudo o ensinado no laboratório, pela paciência para este peruano, nunca terei palavras para expressar toda minha gratidão e admiração que sinto por você.

À professora Maria das Graças Tavares do Carmo por me receber em seu nome programa de pós-graduação e contribuir para a realização do meu sono.

A meu professor e amigo, Leandro Oliveira Batista, por ser meu mestre desde que eu cheguei no primeiro dia no laboratório e com muita paciência, além de eu não entender o idioma, me ensinou todas as coisas que precisei para realizar meu projeto.

Finalmente, meu respeito por seu sacrifício a aqueles que fizeram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

VILCA, Carlos Marcelo Concha. Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de anorexígenos e expressão de ObRb e FOXO 1 em hipotálamo de ratas sob restrição alimentar intermitente. Macaé, 2017 – Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana), Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Rio de Janeiro, 2017

Objetivamos analisar a resposta alimentar à infusão de anorexígenos e a expressão do ObRb e FOXO 1 em hipotálamo de fêmeas *Wistar* não obesas em restrição alimentar intermitente (RAI). As ratas (n = 60), com 67 dias de vida, foram divididas por 6 semanas nos grupos: Controle (C, ração e água livres) e Restritos 3 (R3) e 5 (R5), mantidos com acesso à água e 2 dias a 50% do consumo de ração do grupo C, seguido de 3 ou 5 dias de ração livre respectivamente. Para as injeções de veículo (salina 0,9%) e dos anorexígenos (insulina, serotonina e leptina) os ratos receberam através de cirurgia estereotáxica, cânula-guia intracerebroventricular (i.c.v). Ambos os grupos restritos mostraram menor ingestão acumulada no período experimental *versus* C, sem diferença no consumo após cada ciclo alimentar. R3 apresentou maior consumo nos 3 dias e R5 em 2 dias subsequentes à restrição alimentar *versus* C. Observamos menor ganho de peso corporal no grupo R5. Ambos os grupos restritos não responderam à injeção icv dos anorexígenos e apresentaram redução na expressão hipotalâmica de RNAm do ObRb, porém sem alteração na expressão do RNAm de FOXO 1. Concluimos que a RAI em ratas não obesas interrompeu a resposta a importantes agentes anorexígenos, provocou hiperfagia pós-restrição e afetou passo inicial da via hipotalâmica da leptina. Sugerimos que a RAI pode determinar prejuízo na regulação anorexígena hipotalâmica e em parâmetros obesogênicos.

Palavras chave: Restrição alimentar intermitente, anorexígenos hipotalâmicos, ObRb, FOXO 1, compulsão alimentar.

ABSTRACT

VILCA, Carlos Marcelo Concha. Food response to intracerebroventricular infusion of anorexigenics and ObRb and FOXO 1 expressions in hypothalamus of female rats under intermittent food restrictions. Macaé, 2017 – Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana), Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Rio de Janeiro, 2017

We aimed to analyze the food response to anorexigenic infusion and expression of ObRb and FOXO 1 in the hypothalamus of non-obese females Wistar in intermittent food restriction (IFR). The rats (n = 60), with 67-days of life, were divided for 6 weeks in the groups: Control (C, chow and water *ad libitum*) and Restricted 3 (R3) and 5 (R5), maintained with access to water and 2 days to 50% of group C food intake, followed by 3 or 5 days of free chow respectively. For the injections of vehicle (saline 0.9%) and anorexigenic agents (insulin, serotonin and leptin) the rats were submitted to stereotaxical surgery to receive intracerebroventricular cannula (i.c.v). Both restricted groups showed lower cumulative food intake in the experimental period versus C, without difference in the intake after feeding cycle. The R3 group presented higher consumption in the 3 days and R5 in 2 days subsequent to the food restriction versus C. We observed lower body weight gain in the R5 group. Both restricted groups did not respond to icv injection of anorexigenic agents and showed lower hypothalamic expression of ObRb mRNA, but without change in FOXO 1 mRNA expression. We concluded that IFR in non-obese female Wistar interrupted the response to important anorexigenic agents, promoted post-restriction hyperphagia and affected the initial steps of the hypothalamic leptin pathway. We suggest that IFR can determine impair in hypothalamic anorexigenic regulation and obesogenic parameters.

Key words: Intermittent food restriction, hypothalamics anorexigenics, ObRb, FOXO 1, binge food.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| AgRP | Proteína relacionada ao gene <i>Agout</i> |
| AMPK | Proteína quinase ativada pelo AMP |
| ARC | Núcleo arqueado |
| CART | Transcrito regulado por cocaína e anfetamina |
| FOXO1 | <i>Forkhead box O 1</i> |
| IRS | Substratos receptores de insulina |
| JACK2 | Janus quinase 2 |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| NTS | Núcleo do trato solitário |
| ObRb | Receptor específico de leptina |
| PI3q | Fosfatidilinositol-3-quinase |
| PKA | Proteína quinase A |
| PKB/Akt | Proteína quinase B |
| POMC | Proopiomelanocortina |
| RAI | Restrição alimentar intermitente |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOCS3 | Supressor da sinalização de citocinas 3 |
| STAT3 | Transdutor do sinal ativador de transcrição 3 |

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- **Figura 1** – Protocolo de intermitência alimentar 13

Artigo

- **Figura 1** – Ingestão alimentar semanal 21
- **Figura 2** – Massa corporal 22
- **Figura 3** – Resposta alimentar de 24 h após infusão i.c.v. de anorexígenos 22
- **Figura 4** – Expressão hipotalâmica do RNAm do ObRb e FOXO 1 23

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 03 |
| 2.1 Obesidade e estratégias de perda da massa corporal | 03 |
| 2.2 Regulação central da ingestão alimentar | 07 |
| 3 HIPÓTESE | 12 |
| 4 OBJETIVOS | 12 |
| 4.1 Objetivo geral | 12 |
| 4.2 Objetivos específicos | 12 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 5.1 Ética e condições experimentais | 13 |
| 5.2 Desenho experimental | 13 |
| 5.3 Protocolo de restrição alimentar e realimentação | 13 |
| 5.4 Avaliação de parâmetros nutricionais | 14 |
| 5.5 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de agentes anorexígenos | 14 |
| 5.6 Determinação da expressão de proteínas hipotalâmicas | 15 |
| 5.7 Análise de dados | 15 |
| 6 RESULTADOS | |
| Artigo: Restrição alimentar intermitente inibe resposta à infusão de anorexígenos e reduz expressão de ObRb em hipotálamo de ratas. | 16 |
| Resumo | 16 |
| Introdução | 17 |
| Material e Métodos | 19 |
| Resultados | 21 |
| Discussão | 24 |
| Referências | 29 |
| 7 CONCLUSÃO | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |
| ANEXO | 40 |

1 INTRODUÇÃO

O incremento no mundo de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis, tem suscitado a preocupação da comunidade científica, sendo consideradas problemas de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O desenvolvimento de estas doenças tem estreita relação com a obesidade, encontrando-se 13 e 15 milhões de homens e mulheres, respectivamente, nesta situação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; LECUBE et al., 2017). Assim este cenário tem levado a estas populações na procura de estratégias para restabelecer sua saúde.

Historicamente, o jejum é utilizado por questões religiosas, como no Ramadan (FARIS et al., 2012). Sua prática pode envolver a restrição de tipos específicos de alimentos consumidos, como proteínas ou carboidratos, ou da ingestão alimentar diária total, independente de especificidades (SEIMON et al., 2015). Porém há algum tempo este recomenda-se no contexto do controle da massa corporal, melhora nos marcadores de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e melhora na expectativa de vida (MAZIDI et al., 2015; FAHRIAL SYAM et al., 2016; VAKILI; NIAZI; REZAIE, 2016).

Na atualidade se tem variantes do jejum como o “jejum intermitente” ou “restrição alimentar intermitente” (RAI). Assim revisões mostram que esta estratégia é efetiva tanto como o jejum religioso (PERSYNAKI; KARRAS; PICHARD, 2017). O hipotálamo desempenha papel central no controle da ingestão alimentar e da massa corporal (NEARY; GOLDSTONE; BLOOM, 2004; VELLOSO, 2006), porém não se tem claro se a RAI, seguida de período de realimentação pode afetar a resposta anorexígena a vários agentes fisiológicos da regulação central da homeostase energética.

Tal cenário torna relevante investigar alterações fisiológicas que podem promover perfil obesogênico, o que permite contribuir para identificar os efeitos de intervenções alimentares popularmente aplicadas à perda de peso, mas que na verdade, podem determinar modificações na recepção de sinais anorexígenos centrais na homeostase energética. Ademais, a RAI ainda tem pouca fundamentação científica, mas vem se popularizando como efetiva estratégia no tratamento da obesidade e comorbidades.

Assim, o presente estudo investigou, em fêmeas *Wistar* adultas não obesas, se as respostas alimentares a anorexígenos no hipotálamo, como insulina, leptina e serotonina, são

afetadas pela RAI e se esta estratégia determina perfil obesogênico com alterações na expressão proteica hipotalâmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade e estratégias de perda da massa corporal

A prevalência da obesidade tem aumentado no mundo e dois fatores que contribuem para o desenvolvimento desta epidemia são o aumento da ingestão de energia e a redução da atividade física (TARDIDO; FALCÃO, 2006). Este aumento, em escala epidêmica tem suscitado busca por tratamentos efetivos na recuperação de um adequado estado de nutricional e, as intervenções nutricionais têm, por vezes, sido aplicadas de diferentes formas e sem avaliações prévias de seus efeitos sobre a saúde.

Conhecido como efeito “ioiô” ou “crescimento compensatório”, que é a recuperação de massa corporal após perda de peso significativa, tem ocorrência frequente entre indivíduos com sobrepeso ou obesidade. Para acelerar o processo de emagrecimento, num curto período de tempo, fazem restrição alimentar muitas vezes severa, mas em seguida, e da mesma forma, aumentam o consumo de alimentos, em geral palatáveis (ZHANG et al., 2012a). Estes alimentos parecem estar relacionados à recuperação, observada nestes indivíduos, o que ocorre após a interrupção da restrição alimentar. Portanto, um dos grandes problemas no tratamento da obesidade não é a redução do peso, mas sim controlar a recuperação dessa perda após uma intervenção (OCHNER et al., 2013).

Ao longo do tempo surgiram várias estratégias para o tratamento da obesidade, porém a efetividade destas medidas é necessária para promover adesão e manutenção do benefício, especialmente associado ao controle da massa corporal e de marcadores metabólicos de doenças crônicas não transmissíveis. (MCKINSEY GLOBAL INSTITUTE, 2014). É consenso na literatura que a restrição e adequação energéticas são procedimentos que reúnem mais evidências de benefícios para a saúde do que prejuízos, incluindo perda de massa corporal, aumento da sensibilidade à insulina, resistência maior ao estresse, redução de outras enfermidades relacionadas à obesidade e, assim, melhor qualidade de vida (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL et al., 2011; GARGALLO FERNÁNDEZ et al., 2012; MEXICO SECRETARIA DE SALUD, 2013).

A prática do jejum intermitente para o rápido controle da massa corporal tem crescido nos últimos anos. Essa estratégia, que tem sua origem no Ramadan, consiste na ingestão alimentar em dias alternados (ANSON et al., 2003a). Tinsley e La Bounty (2015) caracterizam o jejum intermitente em humanos, em três modelos mais aplicados, quais sejam:

ingestão a 25% da necessidade energética, alternada com um dia sem restrição ou; 20 horas de restrição energética absoluta (100%), alternada com 4 horas sem restrição ou; alternância na semana entre 6 dias sem restrição seguidos de 1 dia de restrição energética absoluta.

De acordo com Harvie e Howell (2017) embora haja modelos diferentes, sendo verificada a aplicação de dois dias consecutivos de restrição energética por semana; ou dias alternados de restrição de energia (entre 60% - 70%); ou jejum total em dias alternados, todos são considerados sinônimos e descritos como “Jejum intermitente”. Acredita-se que o termo “restrição energética intermitente” compreende melhor todos estes modelos, entretanto, estes mesmos autores estabelecem o critério de dias alternados sem ingestão energética. Neste estudo, concordamos com a adequação do termo “restrição energética intermitente, contudo, utilizamos a expressão “restrição alimentar intermitente”, por entendermos que os grupos experimentais, ao serem privados do consumo de ração, foram submetidos à restrição de nutrientes, energéticos ou não.

Do ponto de vista da nutrição aplicada ao controle do sobrepeso e da obesidade, a dieta hipoenergética moderada é o tratamento mais recomendado pelas sociedades científicas, por seu caráter saudável. Portanto, há que se ressaltar que além desta, são também utilizadas como intervenção, a dieta de muito baixa energia (400-800 kcal/dia), a dieta mediterrânea, alto conteúdo de carboidratos complexos, fibras e ácidos graxos poli-insaturados, hiperproteicas e a dieta de “*shakes*” (substituição de uma ou mais refeições por preparados comerciais) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL et al., 2011; GARGALLO FERNÁNDEZ et al., 2012).

Revisões sistemáticas mostram que RAI é uma estratégia efetiva na perda de massa corporal, embora, é ainda controverso se promove, de fato, benefícios fisiológicos (SEIMON et al., 2015). Assim, não está claro se RAI, apesar de promover perda de massa corporal, é capaz de alterar mecanismos que integram o sistema de regulação central da ingestão alimentar.

Segundo Halberg (2005), de acordo com a teoria dos genes econômicos, com base na alimentação da era paleolítica, são necessários ciclos de abundância e escassez para uma ótima função metabólica. Este autor, em seu estudo, submeteu ao jejum intermitente, ao longo de 15 dias, oito homens jovens saudáveis e verificou ocorrer manutenção da massa corporal, aumento dos teores séricos de adiponectina e redução da insulina, concluindo que o jejum intermitente promove melhoria sobre parâmetros metabólicos. Investigação envolvendo

modelo animal também revelou efeitos fisiológicos benéficos, incluindo diminuição da glicemia e aumento da resistência de neurônios a dano neurodegenerativo, quando camundongos foram submetidos ao jejum intermitente. Os autores sugeriram o envolvimento desta prática na longevidade, entre outros benefícios à saúde (ANSON et al., 2003b) .

Indivíduos obesos submetidos ao jejum em dias alternados apresentaram redução da massa corporal e da circunferência da cintura, assim como nas concentrações séricas de leptina, resistina, colesterol LDL e triacilglicerol. Adicionalmente, após 8 semanas de tratamento, foi observado aumento no conteúdo circulante de adiponectina, indicando efeitos positivos do tratamento sobre estes indicadores de doenças cardiovasculares ((BHUTANI et al., 2010).

Nos últimos anos, Varady et al. (2007) e diferentes colaboradores têm estudado, tanto em animais como em humanos, as repercussões metabólicas do jejum intermitente. Em 2007, o grupo submeteu camundongos a distintos graus de restrição alimentar (25%, 50% e 100%), em dias alternados, e avaliou seus efeitos sobre o tamanho dos adipócitos, bem como sobre os teores séricos de triacilgliceróis e adiponectina. Os autores verificaram que os animais 100% restrito apresentaram maior perda de massa corporal, além de adipócitos menores, porém foram identificados menores teores de adiponectina no grupo 50% restrito ((VARADY et al., 2007)

Em outro estudo, estes investigadores submeteram mais um grupo de camundongos ao jejum intermitente, por 8 semanas e em dias alternados, utilizando diferentes graus de restrição alimentar (25%, 50% e 100%). Nesta oportunidade, os efeitos observados incluíram, maior perda de massa corporal, redução dos depósitos de gordura visceral e aumento no teor sérico de adiponectina nos animais com 100% de redução alimentar (VARADY et al., 2009). Este grupo de autores também avaliou marcadores de risco para doenças cardiovasculares, estudando indivíduos adultos obesos que realizaram restrição intermitente em dias alternados durante 8 semanas. Os resultados encontrados neste estudo foram: perda de 5,8 kg, redução dos teores circulantes de triacilgliceróis e colesterol LDL, sem alterações no conteúdo de colesterol HDL (VARADY et al., 2010).

Soeters et al. (2009) avaliaram, em humanos, se o jejum intermitente favorece a sensibilidade à insulina, incremento na recaptacao da glicose periférica, gasto energético em repouso e diminuição da proteólise ; entretanto, estes autores não verificaram mudanças na fosforilação da proteína AKT, mas sim, aumento na fosforilação da glicogênio sintetase,

diminuição do gasto energético em repouso, e diminuição na fosforilação de mTOR, sugerindo que a captação de glicose periférica e a sensibilidade da insulina hepática não são diferentes entre os grupos com jejum intermitente e dieta normal, mas sim afetando o metabolismo proteico.

Diferentes protocolos de RAI foram associados à proteção contra a diabetes mellitus tipo 2 e obesidade e as doenças cardiovasculares (HALBERG, 2005; KROEGER et al., 2012; KLEMPPEL; KROEGER; VARADY, 2013) Dorighello et al. (2014), entretanto, encontraram que o jejum intermitente induziu camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos à diabetes tipo 2 e obesidade e agravou o desenvolvimento da aterosclerose nestes animais.

Zhao et al. (2013) submeteram camundongos a períodos de 7 dias de restrição energética, seguidos de mais 7 dias de realimentação, durante 6 semanas. Ao final do tratamento os autores encontraram aumento nos depósitos de gordura, bem como ingestão energética e taxa metabólica basal mais elevada no grupo tratado, comparado aos animais controle. Não foram identificadas diferenças nos teores séricos de leptina, também avaliada. Outros achados incluíram a redução na termogênese, na atividade de citocromo oxidase e no teor da termogenina, o que leva supor alterações na regulação da ingestão por estresse alimentar, e redistribuição do tecido adiposo marrom e branco ocasionado por os períodos de inanição (DING et al., 2016).

Também já foi verificado que o intestino é capaz de elevar a taxa de absorção e transporte de nutrientes durante restrição alimentar crônica. Possivelmente este seria um dos mecanismos envolvidos na resistência à perda de massa corporal bem como na sua recuperação, visto que redução na quantidade de alimento ingerido pode resultar em aumento do apetite (ZHANG et al., 2012a).

De fato, há tempos foi descrito que animais realimentados apresentam maior ganho de gordura corporal, menor gasto e maior eficiência energética, sugerindo que o mecanismo de conservação de energia parece ser dependente do sistema nervoso simpático (DULLOO; SEYDOUX; GIRARDIER, 1995). Além de que este comportamento cíclico de perda e ganho de massa corporal parece ser devido à diminuição do gasto energético, particularmente da termogênese induzida pela dieta (LIM et al., 1996).

Estudo avaliando as consequências metabólicas relacionadas ao jejum intermitente em camundongos mostrou efeito sobre expressão de proteínas lipogênicas e inflamatórias no tecido adiposo, maior acúmulo de gordura intra-abdominal hepática e reduzida sensibilidade

periférica à insulina. Os resultados evidenciaram associação de anormalidades metabólicas e jejum intermitente (KLIOWER et al., 2015).

A homeostase energética é regulada por processos que envolvem a integração de nutrientes, neuropeptídeos e hormônios, que agem no sistema nervoso central (SNC) e orquestram as respostas de estímulo ou inibição da ingestão alimentar, levando ao ganho, perda ou manutenção da massa corporal (CINTRA; ROPELLE; PAULI, 2011).

(Lauzurica et al. (2010) estudaram o transportador de serotonina (5HT) relacionado com circuitos cerebrais envolvidos nos processos de hiperfagia após períodos de restrição energética. Para isto, submeteram fêmeas *Sprague-Dawley* a períodos de 1 ou 7 dias de jejum intermitente (22h de restrição alimentar diária) e 14 dias de alimentação *ad-Libitum*. Após 21 dias de tratamento os autores não encontraram diferenças na densidade e na expressão do transportador de 5HT, porém, sobre expressão do neuropeptídeo Y (NPY), em presença de diminuição nos teores séricos de leptina, o que sugeriu que estes resultados poderiam levar ao comportamento hiperfágico.

Gur et al. (2003), entretanto, verificaram diminuição da sensibilidade do receptor serotoninérgico 1B (5HT1B) no hipotálamo, em resposta à restrição alimentar de ratas, sugerindo possível aumento da liberação de serotonina e na transmissão serotoninérgica nestes animais. Deste modo, o aumento de secreção da 5HT configuraria mecanismo compensatório, deflagrado na restrição alimentar

Contudo, o controle do sistema que coordena as respostas alimentares é complexo e não estão claros os efeitos da RAI sobre as respostas anorexígenas efetivas que participam da homeostase energética, capazes de explicar possíveis mecanismos envolvidos na regulação da massa corporal.

2.2 Regulação central da ingestão alimentar

O SNC é alvo de investigações sobre a gênese da obesidade, porém o controle da ingestão alimentar e do gasto energético envolve eventos complexos e diferentes mensageiros no cérebro (SCHWARTZ et al., 2000). O hipotálamo é o centro de integração das informações periféricas e do SNC, a partir do qual são determinadas as respostas orexígenas (anabólicas) ou anorexígenas (catabólicas) de controle da homeostase energética (DAMIANI;

DAMIANI, 2011), existindo duas populações de neurônios nesta região que promovem estas respostas.

Dentre os neuropeptídeos orexígenos estão incluídos o, a proteína relacionada ao gene *agouti* (AgRP), o hormônio concentrador de melanina (MCH), as orexinas A e B, a galanina e a noradrenalina. Os neuropeptídeos com efeitos anorexígenos compreendem o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), a interleucina 1 beta (IL1 β), o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), a ocitocina e a monoamina serotonina (SCHWARTZ et al., 2000; LOPEZ; VIDAL-PUIG, 2008).

Os sinais periféricos, como a insulina e a leptina, atravessam a barreira hematoencefálica e alcançam várias regiões do hipotálamo, denominadas núcleos hipotalâmicos. O núcleo arqueado e o núcleo do trato solitário, no tronco encefálico, são considerados os principais locais de convergência e integração destes sinais que, juntamente com os neuropeptídeos hipotalâmicos, promovem a homeostase energética (SCHWARTZ et al., 2000; STANLEY, 2005; BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010).

A insulina é um hormônio produzido essencialmente no pâncreas e secretado na corrente sanguínea em resposta ao aumento dos teores circulantes de glicose e aminoácidos, e proporcionalmente à massa de gordura estocada no tecido adiposo. A ação deste hormônio depende de proteínas específicas, como o receptor transmembrana (IR) e os substratos dos receptores de insulina (IRS). Essas estruturas encontram-se distribuídas em várias células, localizadas em diferentes regiões, inclusive no SNC, como no núcleo arqueado do hipotálamo. A partir de uma sequência de fosforilações de proteínas da sua via de sinalização, a insulina exerce, neste tecido, seu efeito inibitório da ingestão alimentar, determinante para a perda de massa corporal (WOODS et al., 2006).

Para além da sua ação no SNC, a insulina age em vários tecidos periféricos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Entre os diferentes efeitos do hormônio, amplamente reconhecidos, incluem-se a ampliação da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, o aumento da síntese de proteínas e o bloqueio da produção hepática de glicose bem como da lipólise e da proteólise, participando ativamente na homeostase energética (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; CINTRA; ROPELLE; PAULI, 2011).

Para iniciar a sinalização intracelular e exercer seus efeitos no hipotálamo a insulina se liga ao seu receptor (IR), que possui característica heterométrica e atividade quinase intrínseca. A distribuição do IR no cérebro é bastante ampla, principalmente nas áreas hipotalâmicas envolvidas com a ingestão alimentar (GHASEMI et al., 2013). Este receptor é composto por quatro subunidades, sendo duas alfa e duas beta, e sua ativação resulta na fosforilação em resíduos de tirosina de diversos substratos, incluindo os IRS-1 e IRS-2. A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), que ativa a fosforilação da proteína quinase B ou Akt (KIM; FELDMAN, 2012).

Uma vez fosforilada a Akt leva à expulsão nuclear do fator de transcrição FoxO para o citoplasma onde o mesmo é degradado, permitindo a ação da insulina na regulação da ingestão alimentar. A Akt fosforilada pode proteger neurônios da morte celular em diferentes áreas do cérebro (HENSHALL et al., 2002). Estudos recentes mostraram que o FoxO1 é um fator transcricional e pertence à família *Forkhead* (FoxO) constituída de quatro isoformas (1-4) e regula a expressão gênica por junção do FoxO às sequências promotoras do gene objetivo, exercendo importante papel na regulação do ciclo celular, apoptose, metabolismo energético e resposta ao estresse (HUANG et al., 2009)

A leptina é um peptídeo de 16 kDa composto por 167 aminoácidos, sintetizado e secretado pelo tecido adiposo, proporcionalmente ao conteúdo de triglicerídeos, aos sinais de adequação das reservas de gordura e ao índice de massa corporal. Este hormônio atravessa a barreira hematoencefálica, por meio de transporte ativo, saturável unidirecionalmente, dependente da dose, constituindo, no SNC, sinalizador do estoque tecidual de energia, determinando a supressão da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (CINTRA; ROPELLE; PAULI, 2011; VAN SWIETEN et al., 2014; FLAK; MYERS, 2016).

O núcleo arqueado nas duas populações de neurônios, orexígenos e anorexígenos, têm expreso o receptor para leptina (ObRb) O gene ObR codifica o receptor da leptina (ObRb), que encontra-se distribuído nas duas populações de neurônios presentes no núcleo arqueado. Este receptor pertence à família de receptores de citoquinas classe I; já tendo sido identificadas seis isoformas (a - f). Adicionalmente, também foram reconhecidas isoformas curta e longa. A curta não apresenta domínio intracelular (ObRa, ObRc, ObRd e ObRe) e estas isoformas são encontradas na barreira hematoencefálica, plexo coróide, endotélio vascular e tecidos periféricos (JÚNIOR; PEDROSA; TIRAPEGUI, 2004; SWIERCZYNSKI,

2006). A isoforma longa (ObRb) contém domínio necessário para a ativação de vias de transdução de sinais (VAN SWIETEN et al., 2014).

A ligação da leptina ao seu receptor provoca a homodimerização do receptor e ativação (fosforilação) do Kinase Janus (JAK) (tanto a isoforma 1 quanto a 2), além de fosforilação da sequência proximal da membrana do receptor. O domínio intracelular fosforilado do receptor de leptina proporciona um local de ligação para o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) que por sua vez é ativado. O STAT3 ativado move-se para o núcleo e ativa a transcrição do fator inibidor chamado supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3). A ativação do SOCS3 antagoniza a formação de STAT3 e inibe diretamente a transcrição do promotor do gene NPY (SWIERCZYNSKI, 2006; CINTRA; ROPELLE; PAULI, 2011)

A serotonina é um neurotransmissor que participa na regulação da ingestão alimentar, exercendo papel relevante de mensageiro do cérebro (MEGUID et al., 2000), sua liberação apresenta-se aumentada no hipotálamo durante a alimentação para promover saciedade e está relacionada à ingestão de macronutrientes. É sintetizada no SNC, a partir do aminoácido triptofano, sendo envolvida na síntese de enzimas como a triptofano hidroxilase e a amino L-aromático-descarboxilase (ADRIANZEN; MAZZOTTI, 1996; SÁNCHEZ LOPEZ et al., 2009). Especificamente em mamíferos os neurônios serotoninérgicos se originam dentro do núcleo do rafe, mas inervam densamente quase todas as regiões do SNC (BERGER; GRAY; ROTH, 2009).

No SNC a serotonina (5-HT) é liberada na fenda sináptica, age mediada por diversos receptores distribuídos no cérebro, têm-se três famílias de receptores, a família 5-HT₁, a família 5-HT₂ e a família que inclui os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇, representam as três principais classes de receptores 5-HT que são receptores acoplados a proteínas G. Os cinco subtipos de receptores na família de receptores 5-HT₁ acoplam-se preferencialmente à inibição da adenilatociclase através da família G_i de proteínas G. Em tanto os três subtipos de receptores na família de receptores 5-HT₂ são acoplados através da família G_q de proteínas G à cascata de sinalização de fosfolipase C, que envolve a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de membrana (PIP₂) e aumentos de cálcio intracelular. O receptor 5-HT₃ está ligado a um canal iônico e é uma família separada (BRADY et al., 2012).

A estimulação dos subtipos 5-HT_{1B} e 2C comprova o seu papel fisiológico na alimentação e saciedade. A distribuição hipotalâmica de receptores 2C nos neurônios de

POMC no núcleo arqueado indica que estes, junto com a sinalização de melancortina, atuam de forma integrada na regulação da ingestão (NONOGAKI, 2012). Os diferentes tipos de receptores podem regular o tamanho da refeição e conseqüentemente, controlar a ingestão. Contrapondo-se a isso, a estimulação do autoreceptor 1A aumenta a ingestão alimentar (SIMANSKY, 1996).

Os dados na literatura não são conclusivos quanto a participação da via de sinalização da insulina e do sistema serotoninérgico no crescimento compensatório, e tampouco correlacionam estes processos com a aplicação de determinadas estratégias nutricionais para a perda de massa corporal. Deste modo, no presente estudo foi investigado o efeito da RAI sobre respostas hipotalâmicas anorexígenas capazes de induzir perfil obesogênico.

3 HIPÓTESE

Dentro desta perspectiva investigativa, formulamos a hipótese de que as ações anorexígenas da insulina, serotonina e leptina, são afetadas negativamente pela restrição alimentar intermitente, sinalizando que o sistema de regulação da ingestão alimentar pode ser comprometido, favorecendo, em mais longo prazo, o estabelecimento de perfil obesogênico.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar, em ratas, se a restrição alimentar intermitente é capaz de afetar a resposta a anorexígenos e regular proteínas da homeostase energética no hipotálamo.

4.2 Objetivos específicos:

1. Analisar o comportamento ponderal e o relativo ao consumo alimentar;
2. Medir a resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de agentes anorexígenos, insulina, serotonina e leptina;
3. Avaliar, ao final do tratamento, a expressão de RNAm de fatores envolvidos na resposta anorexígena hipotalâmica, FOXO 1 e ObRb.

5 MÉTODOS

5.1 Ética e condições experimentais

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Rio de Janeiro, Campus Macaé (ANEXO A). As ratas foram mantidas em condições controladas de luz (12h claro/escuro) e temperatura ambiente (22 ± 1 °C) e tiveram livre acesso à água. O acesso à ração comercial (Nuvilab, Brasil) obedeceu ao desenho experimental descrito a seguir.

5.2 Desenho experimental

Fêmeas Wistar (n = 60) com 67 dias de vida foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: grupo Controle (C; n = 20), o qual teve livre acesso à água e ração comercial, e dois grupos de tratamento denominados grupo Alimentado-Restrito 3:2 (R3; n = 20) e Alimentado-Restrito 5:2 (R5; n = 20). Os animais R3 e R5 foram mantidos em gaiolas individuais e submetidos à RAI a 50% do consumo do C durante 6 semanas.

5.3 Protocolo de restrição alimentar e realimentação

O grupo R3 foi alimentado *ad libitum* por três dias e o R5 por cinco dias, seguido de RAI a 50% do consumo do C durante dois dias consecutivos. O grupo C recebeu ração comercial *ad libitum* durante as seis semanas de experimento (Figura 1).

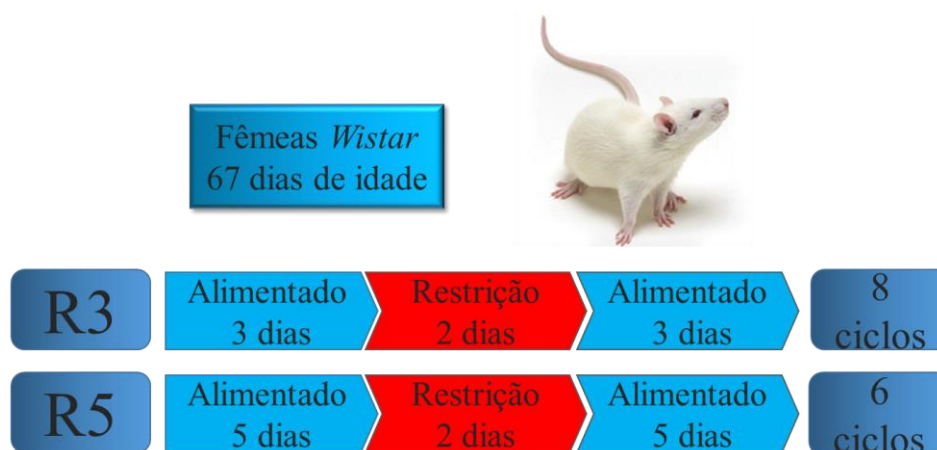


Figura 1. Protocolo de intermitência alimentar

5.4 Avaliação de parâmetros nutricionais

A ingestão alimentar e a massa corporal foram medidas diariamente durante todo o tratamento, sempre as 8h30m, utilizando as balanças analítica (BEL Engineering, Monza, Monza, Itália) e comercial (Toledo Pnix, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil), respectivamente. As avaliações relativas aos grupos restritos somente foram realizadas nos dias de alimentação *ad libitum*. Para os dias de oferta restrita de ração, apenas se procedia o registro do seu fornecimento, aos grupos restritos, à 50% da ingestão dos animais C por período de 24 horas (8h00 às 8h00). O consumo no pós-jejum foi medido em períodos de 24 horas nos três primeiros dias consecutivos de ração *ad libitum*.

5.5 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de agentes anorexígenos

Para proceder às infusões e avaliar a resposta alimentar de agentes anorexígenos hipotalâmicos foram utilizadas insulina (Humulin-R, ©Lilly, Indianapolis, Indiana, USA), serotonina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) e leptina (RayBiotech, Norcross, Georgia, USA) comerciais. Aos 85 dias de idade as ratas receberam dose intraperitoneal de anestésico ketamina/xilazina (67/13 mg/kg de massa corporal). Após teste de sensibilidade à dor, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico para implantação de cânula guia (21 G; 1,5 cm de comprimento) no ventrículo cerebral lateral esquerdo, segundo as coordenadas antero posterior (AP) - 1,3mm, lateral (L) + 2 mm e dorso ventral (DV) -3,4 mm; a partir do bregma (PAXINOS, 2009). Todas as cânulas foram obturadas para evitar a contaminação ou obstrução no ponto de infusão

Após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam dose única de anti-inflamatório (0,2 g/kg de massa corporal). No período pós-operatório as ratas permaneceram no biotério sob o mesmo protocolo alimentar e, no sétimo, após jejum de 6 horas, receberam injeção de 5µL veículo (salina 0,9%) ou insulina (10mU) ou serotonina (20 µg) ou leptina (10 µL), diluídas em veículo. Os animais receberam infusão invertida, 48 horas depois de uma dada infusão, de forma que cada rata foi seu próprio controle. As injeções i.c.v foram realizadas na última hora do ciclo-claro (17:00-18:00 horas) e, em seguida, foi oferecida ração e avaliado o consumo de 24 horas.

5.6 Determinação da expressão de proteínas hipotalâmicas

Foram avaliadas as expressões hipotalâmicas do fator de transcrição FOXO 1 e do receptor ObRb. Aos 90 dias de vida, os animais foram eutanasiados, o hipotálamo retirado e colocado em reagente Trizol para a extração do RNAm. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit comercial High-Capacity cDNA (Applied Biosystems) (10X RT Buffer, 10X RT Random, 25XdNTP Mix, MultiScribe Reverse Transcriptase e água livre de nuclease), em seguida foram pipetados 10 µL de máster mix em cada poço e 10 µL de amostra de RNAm. A placa foi selada e levada à centrifugação (4000 rpm) por 5 minutos e, posteriormente, colocada no termociclador a 25 °C, 37 °C, 85 °C e 4 °C durante 10, 120, 5 e 2 minutos, respectivamente. Para a amplificação do DNA foi colocado em cada poço 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 9 µL de cDNA e 1 µL de probe Foxo 1 ou Ob-Rb (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) para determinar o conteúdo de RNAm no hipotálamo. Foi utilizado o equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Após o preparo das reações, a placa foi selada e centrifugada a 2.500 r.p.m. por 5 minutos para eliminação de bolhas de ar e carregadas no aparelho a 50° C durante 2 minutos para a incubação, seguido de 95°C durante 10 minutos para ativação da polimerase e PCR (40 ciclos) a 95° C por 15 segundos para desnaturar e 60° C por 1 minuto para extensão. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados em $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados de expressão foram comparados com o gene 18S como gene de referência.

5.7 Análise de dados

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média e utilizamos o *software* SPSS versão 20.0 (IBM, Armonk, New York, USA) para análise estatística e o *software* GraphPad Prism versão 7.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia USA) para a editoração das figuras. Para as variáveis de comparação simples entre dois grupos foi aplicado o teste t'Student e para múltiplas comparações, empregamos análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni, com significância para $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados foram organizados de forma a constituir o manuscrito intitulado: RESTRIÇÃO ALIMENTAR INTERMITENTE INIBE RESPOSTA À INFUSÃO DE ANOREXÍGENOS E REDUZ EXPRESSÃO DE ObRb EM HIPOTÁLAMO DE RATAS.

RESUMO

Objetivamos analisar a resposta alimentar à infusão de anorexígenos e à expressão do ObRb e FOXO 1 em hipotálamo de fêmeas *Wistar* em restrição alimentar intermitente (RAI). As ratas (n = 60), com 67 dias de vida, foram aleatoriamente distribuídas nos grupos: Controle (C, ração e água livres) e Restritos 3 (R3) e 5 (R5), mantidos com livre acesso à água e 2 dias a 50% do consumo de ração do grupo C, seguido de 3 ou 5 dias de ração livre, respectivamente, durante 6 semanas. Para as injeções de veículo (salina 0,9%) e dos anorexígenos (insulina, serotonina e leptina), os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia intracerebroventricular (i.c.v). Ambos os grupos restritos mostraram menor ingestão acumulada no período experimental *versus* C, sem diferença no consumo após cada ciclo alimentar (restrito-realimentado). R3 apresentou maior consumo nos 3 dias e R5 em 2 dias subsequentes à restrição alimentar *versus* C. Observamos ganho de massa corporal mais reduzido no grupo R5. Ambos os grupos restritos não responderam à injeção i.c.v dos anorexígenos e apresentaram redução na expressão hipotalâmica de RNAm do ObRb, porém sem alteração na expressão do RNAm de FOXO 1. Concluimos que a RAI em ratas *Wistar* interrompeu a resposta a importantes agentes anorexígenos, provocou hiperfagia pós-restrição e afetou etapa inicial da via de sinalização hipotalâmica da leptina. Sugerimos que a RAI pode determinar prejuízo na regulação anorexígena hipotalâmica e gerando alteração em parâmetros obesogênicos

Palavras chave: Restrição alimentar intermitente, anorexígenos hipotalâmicos, ObRb, FOXO 1, compulsão alimentar.

INTRODUÇÃO

A restrição alimentar, praticada historicamente num contexto religioso como o Ramadan, ao resultar em perda de massa corporal, passa a ser reconhecida como uma estratégia de emagrecimento (FARIS et al., 2012; SALINAS, 2014; PERSYNAKI; KARRAS; PICHARD, 2017). Na atualidade, a restrição energética contínua e moderada é o método mais recomendado pelas sociedades de nutrição para o controle da massa corporal e melhoria das comorbidades da obesidade (GARGALLO FERNÁNDEZ et al., 2012). Entretanto, a restrição energética contínua apresenta baixa adesão, devido à significativa redução da ingestão alimentar, que determina diminuição da saciedade, aumentando a fome (DOBBS et al., 2014).

A restrição alimentar intermitente (RAI) surge na perspectiva de tratamento efetivo para a perda de massa corporal. Nesta modalidade, a restrição alimentar pode ocorrer em dias alternados, qualquer dia da semana, ou restrita a algumas horas do dia (HARVIE et al., 2011; TINSLEY; LA BOUNTY, 2015), porém traz resultados semelhantes ou melhores do que a restrição energética contínua (ANSON et al., 2003), embora ainda sejam controversos os reais benefícios à saúde.

Estudo envolvendo homens e mulheres saudáveis mostrou perda de peso e massa adiposa após a realização de RAI por 22 dias, entretanto, também foi observada redução na massa magra (HEILBRONN et al., 2005). Resultado semelhante foi verificado em obesos após 8 semanas de RAI (HODDY et al., 2015) e em indivíduos saudáveis com restrição mensal de 25% do consumo energético ao final de 3 meses de tratamento (WEI et al., 2017).

Outros autores mostraram que indivíduos saudáveis submetidos ao jejum intermitente por curtos períodos (2 semanas) não apresentaram perda de massa corporal, mesmo quando acompanhado de atividade física, no entanto, exibiram redução da taxa metabólica basal (HALBERG, 2005; SOETERS et al., 2009). Entre obesos, já foi demonstrado perda de peso corporal, diminuição da circunferência da cintura, da massa adiposa e do índice de massa corporal, sem alteração da massa magra, ao final de 8 semanas de RAI (VARADY et al., 2009; BHUTANI et al., 2010; ESHGHINIA; MOHAMMADZADEH, 2013).

O sistema nervoso central orchestra a integração de mecanismos envolvidos na homeostase energética e controle da massa corporal, que representam alvos de intensa investigação. Sinais periféricos, como a insulina e a leptina, atravessam a barreira hematoencefálica e alcançam várias regiões hipotalâmicas, as quais são núcleos de

convergência e integração destes sinais. A homeostase energética resulta da interação destes hormônios com outros compostos hipotalâmicos, como neuropeptídeos e a monoamina serotonina (SCHWARTZ et al., 2000; STANLEY et al., 2005; BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010).

Segundo Bhutani et al. (2010) e Varady et al. (2009; 2010), a RAI exerceu efeito sobre a ingestão alimentar, com menor consumo acumulado após 10 semanas com RAI a 75% em indivíduos obesos (homens e mulheres). Esse controle da ingestão alimentar foi também verificado em períodos posteriores a finalização de RAI. Resultados similares no consumo foram observados em fêmeas C57BL/6J, porém RAI a 50% ou 100% determinou comportamento compensatório da ingestão em resposta a ciclos repetidos de restrição quando comparados com o grupo ad-libitum (ZHANG et al., 2012).

Os efeitos da RAI sobre o sistema nervoso central são majoritariamente apresentados em modelo animal (KIM; FREAKE, 1996). Foi observado expressão aumentada de POMC no hipotálamo de ratos Sprague Dawley após 6 semanas de RAI, à qual foi relacionada com teores séricos aumentados de leptina. Contrariamente a este resultado, foi verificado que a expressão aumentada de neuropeptídeos orexígenos hipotalâmicos, NPY AgRP, no período de restrição, permaneceu na realimentação (CHAUSSE et al., 2014), sugerindo efeito hiperfágico da RAI.

RAI parcial ou total durante 13 dias de tratamento aumentou a expressão de NPY, contudo quando aplicada por 42 dias mostrou diminuição em fêmeas C57BL/6J. Esse resultado parece representar adaptações compensatórias das vias à RAI, entretanto não foram observadas alterações na expressão de POMC, CART, AgRP e ObRb (ZHANG et al., 2012). Restrição alimentar de 22h seguida de realimentação durante 2 horas por 1 ou 7 dias, promoveu aumento na expressão de RNAm de NPY e reduziu a de POMC, sem alterar a expressão do transportador de serotonina em fêmeas Sprague-Dawley (LAUZURICA et al., 2010).

Dada a complexidade da regulação da massa corporal e a presença de lacunas acerca dos efeitos da RAI sobre agentes anorexígenos que integram a homeostase energética central, o presente estudo investigou em ratas não obesas, se a RAI afeta a ação de diferentes anorexígenos e altera a expressão do RNAm de ObRb e FOXO 1 no hipotálamo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e desenho experimental

Fêmeas *Wistar* (n = 60; 67 dias de vida; massa corporal=181,95g) foram mantidas durante 6 semanas em gaiolas individuais sob luz (12h claro/12h escuro) e temperatura ambiente (22 ± 1 °C), aleatoriamente distribuídas em três grupos, controles (C; livre acesso à água e ração) e restritas 3 (R3) e 5 (R5). As ratas restritas receberam ração *ad libitum* por 3 (R3) ou 5 (R5) dias, seguidos de 2 dias de RAI a 50% do consumo do C. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal de Rio de Janeiro – Campus UFRJ-Macaé.

Avaliação do consumo alimentar, comportamento ponderal relativo ao consumo alimentar, e massa corporal

O consumo alimentar e a massa corporal foram monitorados diariamente durante todo o período de tratamento. O consumo no pós-jejum foi medido em períodos de 24 horas nos três primeiros dias consecutivos de ração *ad libitum*.

Infusão intracerebroventricular (i.c.v) de anorexígenos hipotalâmicos

Aos 85 dias de idade os animais foram profundamente anestesiados com dose i.p. de ketamina/xilazina (67/13 mg/kg de massa corporal) e submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula (21 G; 1,5 cm) i.c.v no ventrículo cerebral lateral esquerdo. As ratas foram posicionadas em aparelho estereotáxico Kopf segundo as coordenadas antero posterior (AP) - 1,3mm; lateral (L) + 2 mm e dorso ventral (DV) -3,4 mm a partir do bregma (PAXINOS, 2009). Após os procedimentos cirúrgicos as ratas receberam dose única de anti-inflamatório (0,2 g/kg de massa corporal) e todas as cânulas foram protegidas com obturador para evitar obstrução. No sétimo dia pós-operatório, após jejum de 6 horas, os animais receberam injeção de 5µL veículo (salina 0,9%) ou insulina (10 mU; Humulin-R, ©Lilly, Indianapolis, Indiana, USA) ou serotonina (20 µg; Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) ou leptina (10 µg; RayBiotech, Norcross, Georgia, USA), diluídas em veículo. Os animais receberam infusão invertida, 48 horas depois de uma dada infusão, de forma que cada rata foi seu próprio controle. As injeções i.c.v foram realizadas na última hora do ciclo-claro (17:00-18:00 horas) e, em seguida, foi oferecida ração e avaliado o consumo de 24 horas.

PCR em tempo real de amostras de hipotálamo

Aos 90 dias de vida, os animais foram eutanasiados, o hipotálamo de cada rata foi retirado e processado em Trizol para a extração do RNAm. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit comercial High-Capacity cDNA (Applied Biosystems) (10X RT Buffer, 10X RT Random, 25XdNTP Mix, MultiScribe Reverse Transcriptase e água livre de nuclease). A placa contendo 10 µL de máster mix e 10 µL de amostra de RNAm de cada rata foi selada e levada à centrifugação (4000 rpm) por 5 minutos e, em seguida, inserida no termociclador (StepOne Plus Applied Biosystems) a 25 °C, 37 °C, 85 °C e 4 °C, durante 10, 120, 5 e 2 minutos respectivamente. Para a amplificação do DNA foi colocado nos poços da placa 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 9 µL de cDNA e 1 µL de probe FoxO1 ou ObRb para determinar o teor de RNAm. O equipamento foi mantido a 50 °C durante 2 minutos para a incubação, seguido de 95 °C durante 10 minutos para ativação da polimerase e PCR (40 ciclos) a 95 °C por 15 segundos para desnaturar e 60 °C por 1 minuto para extensão. Utilizamos para a análise o gene de referência 18S.

Análise de dados

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média e utilizamos o *software* SPSS versão 20.0 (IBM, Armonk, New York, USA) para análise estatística e o GraphPad Prism versão 7.03 (©GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia USA) para a editoração das figuras. Para comparações de dados entre dois grupos foi aplicado o teste t'Student e para múltiplas comparações, ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* Bonferroni, considerando nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeito da RAI sobre o consumo alimentar e massa corporal

Verificamos menor consumo alimentar total no período (Figura 1) em ambos os grupos restritos comparados ao C e, embora sem diferença estatística, observa-se que o consumo após cada ciclo alimentar foi menor tanto no R3 (Figura 1A) quanto no R5 (Figura 1B). Os grupos restritos apresentaram hiperfagia no período pós-restrição, com maior consumo alimentar, comparado ao C, nos 3 dias *ad libitum* do grupo R3 e em 2 dos 5 dias *ad libitum* do grupo R5 (Figura 1C). Não houve diferença na massa corporal inicial e final entre todos os grupos, porém o ganho de peso total, ao final das 6 semanas de tratamento, foi menor no grupo R5, mas não diferiu no R3, em relação ao C (Figura 2).

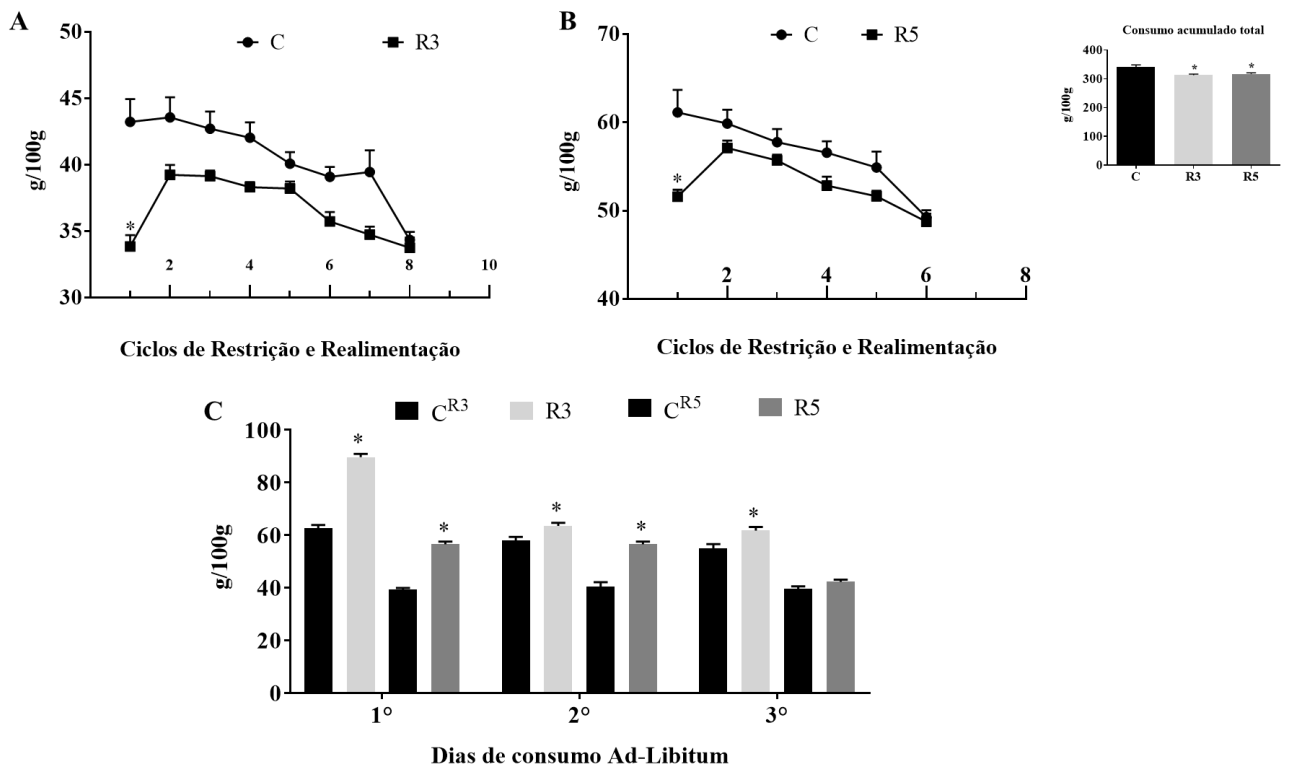


Figura 1. Ingestão alimentar semanal (A e B), total (plot) e no período *ad libitum* (C) de fêmeas *Wistar* em restrição alimentar intermitente. Dados expressos como média \pm EPM e significância para $P < 0,05$. * versus C. $n = 10$ por grupo. Coluna preta: controle, coluna cinza claro: R3 e coluna cinza escuro: R5. A ingestão dos grupos restritos foi comparada ao C no respectivo dia pós-restrição.

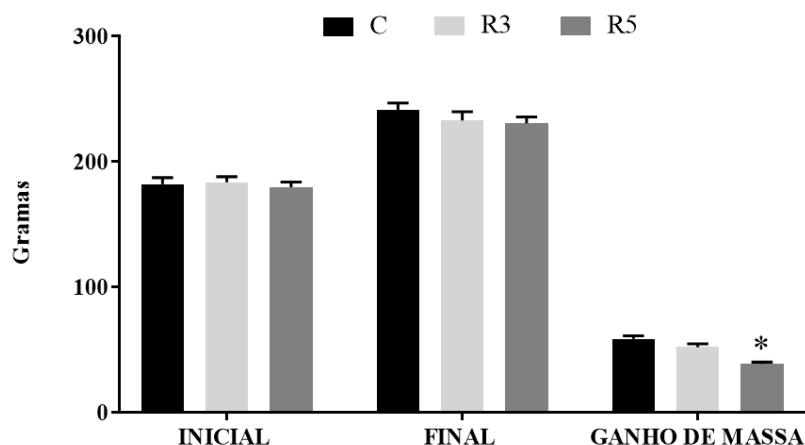


Figura 2. Massa corporal inicial e final e o ganho de peso de fêmeas *Wistar* em restrição alimentar intermitente. Dados expressos como média \pm EPM e significância para $P < 0,05$. * versus C. $n = 10$ por grupo. Coluna preta: controle (C); coluna cinza claro: R3 e coluna cinza escuro: R5

Efeito da RAI sobre a resposta alimentar à infusão i.c.v de anorexígenos

Verificamos que o grupo C respondeu à inibição da ingestão alimentar induzida pelos anorexígenos insulina, serotonina e leptina (Figura 3), entretanto, nos grupos restritos não foram observadas respostas inibitórias 24 horas após a infusão destes compostos.

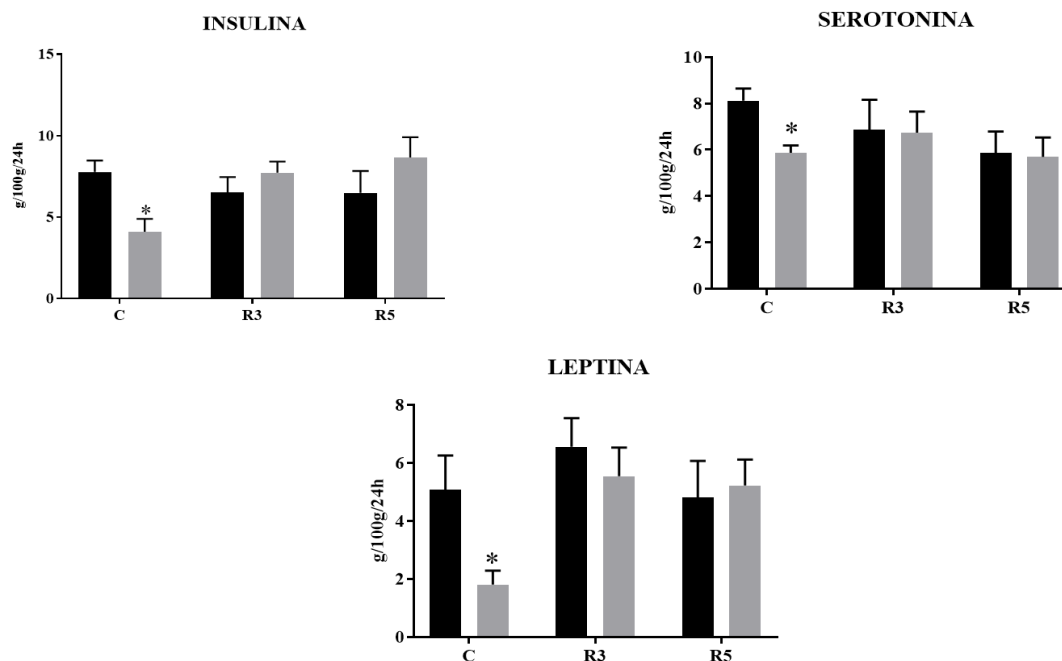


Figura 3. Resposta alimentar de 24 h após infusão intracerebroventricular de salina 0,9 % comparada à insulina (A), serotonina (B) e leptina (C) em fêmeas *Wistar* em restrição alimentar intermitente. Dados expressos como média \pm EPM e significância para $P < 0,05$. * versus salina. $n = 6$ por grupo. C, controle; R3 e R5. Coluna preta: infusão de salina e coluna cinza: infusão de anorexígeno. Doses: 10 mU de insulina, 20 μ g de serotonina e 10 μ g de leptina.

Efeito da RAI sobre a expressão do RNAm de FOXO 1 e do ObRb

Verificamos menor expressão do ObRb, comparada ao C, tanto no grupo R3 (52,5 %) quanto no grupo R5 (69,0 %) (Figura 4) no hipotálamo das ratas em restrição alimentar intermitente, porém a expressão do fator de transcrição FOXO 1 não diferiu entre os grupos (Figura 4).

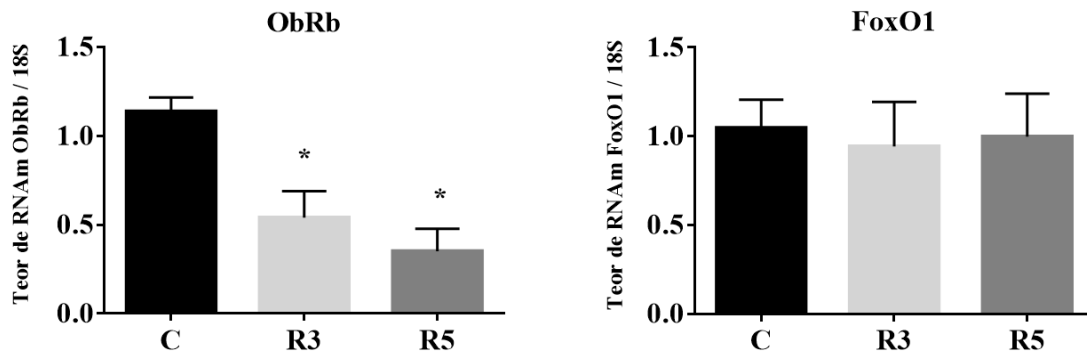


Figura 4. Expressão hipotalâmica do RNAm do receptor ObRb e do fator de transcrição FOXO 1 em fêmeas *Wistar* em restrição alimentar intermitente. Dados expressos como média \pm EPM e significância para $P < 0,05$. Gene de referência: 18S. * versus C. n = 6 por grupo. Coluna preta: controle (C), cinza claro: R3 e cinza escuro: R5.

DISCUSSÃO

Demonstramos em fêmeas *Wistar* que a RAI interfere na resposta alimentar a diferentes anorexígenos de ação hipotalâmica e na expressão do receptor de leptina ObRb. A RAI tem sido divulgada como método eficaz para a perda de massa corporal (VARADY et al., 2007, 2009; BHUTANI et al., 2010; JOSLIN; BELL; SWOAP, 2016), porém os resultados fisiológicos evidenciados ainda são controversos e quase inexistentes em animais fêmeas.

Conforme observado neste estudo, a RAI foi efetiva em promover menor ganho de massa corporal. Contudo, parece haver relação com a periodicidade do jejum, visto que R5, que foi submetido a menor frequência de restrição, teve redução no ganho de massa corporal e compulsão alimentar menos intensa, uma vez que este grupo apresentou hiperfagia somente em 2 dos 5 dias de acesso livre à ração.

Evidências científicas têm mostrado que o emprego da restrição energética contínua ou intermitente determina efeitos semelhantes sobre a perda de massa corporal (DAVIS et al., 2016). Também é apontado que animais em RAI podem ter consumo alimentar semelhante àqueles ad libitum, avaliado em mais longo prazo, em razão da hiperfagia neste período Cerqueira et al., (2011). Por outro lado, Lenglos et al. (2013) mostraram que ratas submetidas ao estresse e à restrição alimentar (60% do consumo do grupo controle), em ciclos alternados de dois dias, apresentaram maior consumo de ração nos dias de acesso ad libitum e massa corporal mais elevada. Adicionalmente, estes autores encontraram nestes animais maiores concentrações de corticosterona e maior expressão hipotalâmica do RNAm de relaxina-3

Em nosso estudo, os animais R3 apresentaram comportamento hiperfágico mais acentuado, sem alteração da massa corporal. Acreditamos que a restrição alimentar per se provoca estresse, o que pode ter levado à manutenção da massa corporal destas ratas, que foram submetidas a estresse mais intenso, por exposição frequente à restrição alimentar. De fato, o grupo R5, reduziu o comportamento hiperfágico no 3º dia ad libitum, o que favoreceu menor ganho de massa.

Comportamento hiperfágico também foi evidenciado por Zhang et al. (2012) e Zhao et al. (2013), que consideram constituir resposta compensatória à restrição.

De outro modo, Zhao et al. (2014) verificaram expressão diminuída da lipase hormônio sensível no tecido adiposo branco em hamsters submetidos a ciclos de restrição

alimentar e realimentação. É possível que estes achados contribuam para justificar a inobservância de redução da massa corporal no grupo R3, submetido a maior frequência de ciclos de restrição e realimentação em nosso estudo. De fato, dados do nosso laboratório indicaram que estes animais apresentaram maior teor de adiposidade visceral (ROSAS, 2017), sugerindo participação da enzima lipase hormônio sensível na resistência à perda de massa corporal.

A repercussão do menor consumo alimentar acumulado no período, verificado para ambos os grupos restritos, sobre o ganho de massa corporal, somente foi observada no grupo R5. Resultados similares foram encontrados por Varady et al. (2007) que aplicaram diferentes protocolos de restrição (25%, 50%, 75% e 100%) em camundongos machos C57BL/6J. Estes autores observaram redução da massa corporal nos 4 grupos tratados, após 4 semanas de RAI. Esses achados reforçam a ideia de que menor intensidade ou frequência de restrição podem levar a estresse mais atenuado e consequente redução de massa corporal.

Em ratos, ciclos repetidos de restrição alimentar produziram aumento na expressão de NPY e AgRP, diminuição na expressão de POMC, embora sem efeitos sobre o transportador de serotonina (LAUZURICA et al., 2010). Sarihi et al. (2015) mostraram que a infusão hipotalâmica de grelina levou a maior expressão de orexina. A grelina é um dos principais sinalizadores orexígenos periféricos. Tomados juntos, estes achados permitem supor que, em longo prazo, ciclos repetidos de restrição alimentar podem levar à comportamento hiperfágico por alterar o circuito orexígeno.

É possível que tenha ocorrido alterações na expressão de orexígenos e no teor de corticosterona nas ratas, contudo, os grupos restritos neste estudo não apresentaram resposta inibitória alimentar a importantes agentes anorexígenos, sugerindo alteração na sinalização hipotalâmica da homeostase energética.

Este é o primeiro trabalho que demonstra a interrupção da resposta anorexígena à infusão intracerebroventricular de insulina, serotonina e leptina em fêmeas Wistar em RAI prolongada. Nossos resultados confirmam a efetividade da ação dos anorexígenos nas ratas controles como também observado por Albuquerque et al. (2006), Sardinha et al. (2006) e Telles et al. (2013). Assim, é possível supor que ciclos intermitentes de restrição alimentar podem gerar estágios iniciais de resistência à ação destes anorexígenos, com comprometimento da sinalização das vias.

Sugere-se que a resistência central à insulina pode ser, em parte, devida ao prejuízo no acesso do hormônio ao sistema nervoso central. Já foi demonstrado que o transporte deste hormônio na barreira hematoencefálica é saturável, mesmo quando suas concentrações circulantes estão reduzidas (SARTORIUS et al., 2015), o que pode ser importante na determinação da atividade central da insulina.

Dados do nosso laboratório demonstraram utilização limitada da glicose circulante, em ambos os grupos restritos, apontando inadequada ação periférica da insulina em resposta à hiperglicemia observada (ROSAS, 2017). O transporte de insulina para o sistema nervoso central diminui proporcionalmente ao teor de receptor de insulina. Adicionalmente, elevadas concentrações periféricas de insulina também podem promover redução deste receptor (SARTORIUS et al., 2015). Essas evidências indicam que a menor sensibilidade hipotalâmica à insulina aqui identificada nas ratas restritas, pode ser consequência da redução do receptor deste hormônio, levando à diminuição da ativação da sua cascata de sinalização, tendo em vista a possível alteração periférica na concentração de insulina e a modulação central da via. Em humanos, Sartorius et al. (2015) sugerem prejuízo no transporte de insulina na barreira hematoencefálica, na presença de resistência ao hormônio.

Se por um lado, a alimentação intermitente prolongada leva à oxidação do receptor de insulina e intolerância à glicose nos tecidos adiposo e muscular (CERQUEIRA et al., 2011), por outro, o cérebro tem elevado consumo energético, portanto, um órgão muito susceptível a danos oxidativos (AMIGO; KOWALTOWSKI, 2014). Sugerimos que processos desta natureza podem decorrer de RAI prolongada, nos moldes observados por Cerqueira et al. (2011), favorecendo a oxidação, e consequente inativação, do receptor de insulina e, assim, interrompendo a via de sinalização da insulina e resposta anorexígena.

Não verificamos nas fêmeas Wistar alteração na expressão do fator de transcrição FOXO 1 hipotalâmico, consequente ao longo período de RAI. Embora a ausência de resposta anorexígena à infusão de insulina tenha sido identificada, a expressão do RNAm não permite dimensionar o teor de FOXO fosforilado, forma que representa a ativação do fator em resposta a baixa atividade da via de sinalização da insulina (SCHIBLER, 1998; BRUNET et al., 1999), portanto, isso nos leva a pensar em outro aspecto deste resultado.

Esses reguladores transcricionais promovem resistência ao estresse por aumentar a expressão de genes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (MANSER et al., 1994; WOOK OH et al., 2006). Um dos efeitos do jejum intermitente no cérebro,

relacionado à longevidade, é o aumento da resistência ao estresse (LONGO; MATTSON, 2014). Nesse sentido, a homeostase da expressão de FOXO 1 entre os grupos neste estudo parece corroborar com a relação entre aumento da expressão de FOXO 1 em neurônios em resposta à RAI e mecanismo de neuroproteção e longevidade.

A via serotoninérgica é considerada importante no circuito hipotalâmico de regulação do apetite, porém neste estudo, verificamos que as ratas em RAI não apresentaram resposta à infusão de serotonina, o que em parte explica o comportamento hiperfágico no período *ad libitum* destes animais. Contudo, Lauzurica et al. (2010) verificaram que fêmeas com acesso a alimentos por 2 h semanais por 7 dias consecutivos, não alteraram a expressão gênica e densidade do transportador desta monoamina cerebral. Entretanto, estes autores não analisaram a resposta alimentar à infusão como indicador da atividade da via.

A serotonina ativa neurônios de POMC, tendo sido verificado que animais em restrição alimentar, eutanasiados imediatamente antes do período hiperfágico, ou seja, no período de restrição, apresentaram redução na expressão deste neuropeptídeo (LAUZURICA et al., 2010). Essa resposta pode significar maior recaptção da serotonina na fenda sináptica, com prejuízo na resposta anorexígena e consequente efeito hiperfágico que foi observado em nosso estudo no período *ad libitum*. Sugerimos que este comportamento hiperfágico, em longo prazo, pode ser mantido após abandono da restrição alimentar indicando efeito obesogênico da RAI. Contrário ao entendimento de nossos resultados, fêmeas Wistar em restrição alimentar contínua por 4 semanas apresentaram redução na sensibilidade do receptor 5HT1B, o que condiz com maior secreção e atividade serotoninérgica (GUR et al., 2003), e correspondente comportamento alimentar inibitório.

Embora não tenha sido verificada neste estudo alteração na expressão hipotalâmica do RNAm de FOXO 1, observamos severa redução na expressão do ObRb nos grupos restritos, entretanto, há poucas evidências científicas relacionando a via da leptina, e especialmente a expressão do ObRb, com RAI. É conhecido que a ativação desta via está relacionada com a diminuição da expressão de NPY, AgRP e sinergia com a via da insulina, por meio da PI3K e Akt, que juntos regulam a resposta de saciedade (VELLOSO, 2006; ROS PÉREZ; MEDINA-GÓMEZ, 2011).

Além da insulina e da serotonina, os animais restritos também não responderam ao efeito anorexígeno consequente à injeção intracerebral de leptina. Foi verificado em *hamsters* que suplementação de leptina atenuou a hiperfagia no período *ad libitum*, provavelmente por

diminuir a expressão gênica de NPY e AgRP no hipotálamo (ZHAO et al., 2014). De fato, foi demonstrada menor atividade da leptina durante períodos de restrição causada pela expressão aumentada de NPY (MATSUZAKI et al., 2015). Entretanto, a suplementação de leptina foi realizada no período *ad libitum*, e neste caso, os hamsters foram mantidos em restrição por 4 a 6 semanas, seguidos por igual intervalo de realimentação, configurando período adaptativo extenso, o que possivelmente permitiu a resposta da leptina na inibição da hiperfagia.

Tomados juntos esses dados indicam que a periodicidade da restrição e realimentação no nosso estudo foi muito menor, sugerindo que o teor de leptina transportado na barreira hematoencefálica pode ser muito baixo, que mesmo somado à i.c.v, não foi capaz de reduzir marcadores orexígenos, resultando na ausência de resposta anorexígena à leptina suplementar nas ratas restritas.

Em fêmeas a restrição alimentar promoveu menor expressão hipotalâmica do RNAm do receptor ObRb, comparado aos machos, no período neonatal, porém, próximo à puberdade, essa diferença desapareceu (MATSUZAKI et al., 2015). Embora o modelo seja bem diverso do presente estudo, este resultado aponta alteração na expressão do ObRb, relacionada à restrição alimentar. Contudo, nenhum outro trabalho que permitisse elucidar o impacto da RAI sobre a atividade da leptina foi encontrado. A menor expressão do ObRb, detectada nesta pesquisa, pode refletir menor teor do receptor de leptina na membrana, sugerindo que a ausência de resposta à infusão de leptina hipotalâmica verificada pode ser consequência da menor atividade da via.

Concluimos que a RAI promoveu comportamento hiperfágico no período *ad libitum* e ao favorecer redução da resposta anorexígena à insulina, serotonina e leptina, com diminuição da expressão do RNAm do ObRb, estabelece um circuito pró-obesogênico hipotalâmico, que pode comprometer a homeostase energética em longo prazo e induzir obesidade nas fêmeas *Wistar*. Outros estudos ao nível central hipotalâmico são fundamentais para a elucidação do efeito da RAI no sistema de regulação da ingestão alimentar modulado pelos anorexígenos aqui estudados.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. T. et al. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. **Nutrition**, v. 22, n. 7–8, p. 820–829, 2006.

AMIGO, I.; KOWALTOWSKI, A. J. Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state. **Redox Biology**, v. 2, p. 296–304, 2014.

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, 2003.

BHUTANI, S. et al. Improvements in coronary heart disease risk indicators by alternate-day fasting involve adipose tissue modulations. **Obesity**, v. 18, n. 11, p. 2152–2159, 2010.

BOGUSZEWSKI, C. L.; PAZ-FILHO, G.; VELLOSO, L. A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. **Endokrynologia Polska**, v. 61, n. 2, p. 194–206, 2010

BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–868, 1999.

CERQUEIRA, F. M. et al. Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1454–1460, 2011.

CHAUSSE, B. et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014.

DAVIS, C. S. et al. Intermittent energy restriction and weight loss: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 292–299, 2016.

DOBBS, R. et al. **How the world could better fight obesity.** | McKinsey & Company, 2014. Disponível em: <<http://www.mckinsey.com/industries/healthcare-systems-and-services/our-insights/how-the-world-could-better-fight-obesity>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

ESHGHINIA, S.; MOHAMMADZADEH, F. The effects of modified alternate-day fasting diet on weight loss and CAD risk factors in overweight and obese women. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 4, 2013.

FARIS, M. A. et al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 947–955, 2012.

GARGALLO FERNÁNDEZ, M. et al. Resumen del consenso FESNAD-SEEDO: recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos. **Endocrinología y Nutrición**, v. 59, n. 7, p. 429–437, 2012.

GUR, E. et al. The differential effects of food restriction on 5-HT_{1a} and 5-HT_{1b} receptor mediated control of serotonergic transmission in the hippocampus and hypothalamus of rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 169–175, 2003.

HALBERG, N. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 6, p. 2128–2136, 2005.

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

HEILBRONN, L. K. et al. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 69–73, 2005.

HODDY, K. K. et al. Safety of alternate day fasting and effect on disordered eating behaviors. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 44, 2015.

JOSLIN, P. M.; BELL, R. K.; SWOAP, S. J. Obese mice on a high-fat alternate-day fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2016.

KIM, T. S.; FREAKE, H. C. High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 3, p. 611–617, 1996.

LAUZURICA, N. et al. Changes in NPY and POMC, but not serotonin transporter, following a restricted feeding/repletion protocol in rats. **Brain Research**, v. 1313, p. 103–112, 2010.

LENGLOS, C. et al. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats: sex difference in body weight regulation. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 4, p. 370–387, 2013.

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 181–192, 2014.

MANSER, E. et al. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. **Nature**, v. 367, n. 6458, p. 40, 1994.

MATSUZAKI, T. et al. The responses of hypothalamic NPY and OBRb mRNA expression to food deprivation develop during the neonatal-prepubertal period and exhibit gender differences in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 41, p. 63–67, 2015.

PAXINOS, G. (ED.). **Chemoarchitectonic atlas of the rat brain**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009.

PERSYNAKI, A.; KARRAS, S.; PICHARD, C. Unraveling the metabolic health benefits of fasting related to religious beliefs: a narrative review. **Nutrition**, v. 35, p. 14–20, 2017.

ROS PÉREZ, M.; MEDINA-GÓMEZ, G. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. **Endocrinología y Nutrición**, v. 58, n. 7, p. 360–369, 2011.

ROSAS, M. A. F. **Interferência da restrição alimentar intermitente na expressão dos fatores lipogênicos SREBP 1C e 2 e acetil-CoA carboxilase no hipotálamo de ratas**. 2017. Dissertação (Mestre). Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos e Biociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil:

SALINAS, P. J. El ayuno. Beneficios y perjuicios. **MedULA**, v. 23, n. 2, p. 74–76, 2014.

SARDINHA, F. L. C. et al. Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. **Nutrition**, v. 22, n. 11–12, p. 1152–1161, 2006.

SARIHI, A. et al. Effects of activation and blockade of orexin A receptors in the medial preoptic area on food intake in male rats. **Neuroscience Letters**, v. 604, p. 157–160, 2015.

SARTORIUS, T. et al. The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126804, 2015.

SCHIBLER, U. New cogwheels in the clockworks. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 620–621, 1998.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

SOETERS, M. R. et al. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid, or protein metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1244–1251, 2009.

STANLEY, S. et al. Hormonal regulation of food intake. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1131–1158, 2005.

TELLES, M. M. et al. Lateral hypothalamic serotonin is not stimulated during central leptin hypophagia. **Regulatory Peptides**, v. 184, p. 75–80, 2013.

TINSLEY, G. M.; LA BOUNTY, P. M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 10, p. 661–674, 2015.

VARADY, K. A. et al. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. **The Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 10, p. 2212–2219, 2007.

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

VARADY, K. A. et al. Improvements in body fat distribution and circulating adiponectin by alternate-day fasting versus calorie restriction. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 188–195, 2010.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 165–176, 2006.

WEI, M. et al. Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 377, p. eaai8700, 2017.

WOOK OH, S. et al. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 251–257, 2006.

ZHANG, L. N. et al. Physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL/6J mice. **Physiology and Behavior**, v. 105, n. 2, p. 376–387, 2012.

ZHAO, Z. J. et al. Body mass, energy budget and leptin of mice under stochastic food restriction and refeeding. **Zoological Research**, v. 34, n. 6, p. 574–581, 2013.

ZHAO, Z. J. et al. The role of leptin in striped hamsters subjected to food restriction and refeeding. **Zoological Research**, v. 35, n. 4, p. 262–271, 2014.

7 CONCLUSÃO

A restrição alimentar intermitente em ratas Wistar não obesas, por 6 semanas:

- Promoveu redução na massa corporal no grupo com menor frequência de jejum;
- Favoreceu comportamento hiperfágico nos dias de livre acesso ao alimento;
- Não promoveu diferença no consumo alimentar ao final do tratamento;
- Interrompeu a resposta anorexígena à infusão i.c.v de insulina, serotonina e leptina;
- Reduziu a expressão do RNAm do receptor ObRb, mas não alterou a expressão do fator de transcrição FOXO 1.

Tomadas juntas, essas alterações sugerem que a restrição alimentar intermitente em fêmeas *Wistar* não obesas, de fato, promove redução da massa corporal, porém estabelece perfil de modificações pró-obesogênicas, cujas respostas fisiológicas adaptativas podem se romper em longo prazo, conduzindo à obesidade.

REFERÊNCIAS

- ADRIANZEN, C.; MAZZOTTI, G. serotonina y trastornos de la alimentacion. **Revista de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, p. 142–154, 1996.
- 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, 2003.
- ANTONI, R. et al. The effects of intermittent energy restriction on indices of cardiometabolic health. **Research in Endocrinology**, v. 2014, p. 1–24, 2014.
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 355–366, fev. 2009.
- BHUTANI, S. et al. Improvements in coronary heart disease risk indicators by alternate-day fasting involve adipose tissue modulations. **Obesity**, v. 18, n. 11, p. 2152–2159, nov. 2010.
- BOGUSZEWSKI, C. L.; PAZ-FILHO, G.; VELLOSO, L. A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. **Endokrynologia Polska**, v. 61, n. 2, p. 194–206, 2010.
- BRADY, S. T. et al. (EDS.). Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. 8th ed ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2012.
- CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. **Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular**. São Paulo: SARVIER, 2011.
- DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 2, p. 138–145, 2011.
- DING, H. et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. **Nature Communications**, v. 7, p. 11533, 2016.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL et al. **Diretrizes AMB**. Disponível em: <http://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/terapia_nutricional_para_pacientes_com_obesidade_e_xtrema.pdf>. Acesso em: 15 maio. 2017.
- DORIGHELLO, G. G. et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 6, p. 979–986, 2014.

DULLOO, A. G.; SEYDOUX, J.; GIRARDIER, L. Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. **The American Journal of Physiology**, v. 269, n. 2 pt 2, p. R365-R369, 1995.

FAHRIAL, S. A. et al. Ramadan fasting decreases body fat but not protein mass. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 1, 2, 2016.

FARIS, M. A. et al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 947–955, 2012.

FLAK, J. N.; MYERS, M. G. Minireview: CNS mechanisms of leptin action. **Molecular Endocrinology**, v. 30, n. 1, p. 3–12, 2016.

GARGALLO FERNÁNDEZ, M. et al. Resumen del consenso FESNAD-SEEDO: recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos. **Endocrinología y Nutrición**, v. 59, n. 7, p. 429–437, 2012.

GHASEMI, R. et al. Insulin in the brain: sources, localization and functions. **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 1, p. 145–171, 2013.

GUR, E. et al. The differential effects of food restriction on 5-HT1A and 5-HT1B receptor mediated control of serotonergic transmission in the hippocampus and hypothalamus of rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 169–175, 2003.

HALBERG, N. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 6, p. 2128–2136, 1, 2005.

HARVIE, M.; HOWELL, A. potential benefits and harms of intermittent energy restriction and intermittent fasting amongst obese, overweight and normal weight subjects—a narrative review of human and animal evidence. **Behavioral Sciences**, v. 7, n. 1, p. 4, 2017.

HENSHALL, D. C. et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8458–8465, 2002.

HUANG, L.-C. et al. **The role foxo1 in the regulation of systemic nutrient and energy homeostasis**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Ching_Ling_Lin/publication/303565246_The_Role_FoxO1_in_the_Regulation_of_Systemic_Nutrient_and_Energy_Homeostasis/links/574877f108ae5f7899b9d605.pdf>. Acesso em: 14 maio. 2017.

JÚNIOR, J. D.; PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

KIM, B.; FELDMAN, E. L. Insulin resistance in the nervous system. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 133–141, mar. 2012.

KLEMPPEL, M. C.; KROEGER, C. M.; VARADY, K. A. Alternate day fasting increases LDL particle size independently of dietary fat content in obese humans. **European journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 7, p. 783–785, 2013.

KLIEWER, K. L. et al. Short-term food restriction followed by controlled refeeding promotes gorging behavior, enhances fat deposition, and diminishes insulin sensitivity in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 721–728, 2015.

KROEGER, C. M. et al. Improvement in coronary heart disease risk factors during an intermittent fasting/calorie restriction regimen: Relationship to adipokine modulations. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 98, 2012.

LAUZURICA, N. et al. Changes in NPY and POMC, but not serotonin transporter, following a restricted feeding/repletion protocol in rats. **Brain Research**, v. 1313, p. 103–112, 2010.

LECUBE, A. et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, v. 64, Supplement 1, p. 15–22, 2017.

LIM, K. et al. Effects of intermittent food restriction and refeeding on energy efficiency and body fat deposition in sedentary and exercised rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 42, n. 5, p. 449–468, 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPEZ, M.; VIDAL-PUIG, A. Brain lipogenesis and regulation of energy metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, n. 4, p. 483–490, 2008.

MAZIDI, M. et al. The effect of Ramadan Fasting on Cardiovascular Risk Factors and Anthropometrics Parameters: A Systematic Review. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 5, 2015.

MCKINSEY GLOBAL INSTITUTE. **Overcoming obesity: An initial economic analysis** McKinsey & Company, , nov. 2014. Disponível em: <www.mckinsey.com/mgi>. Acesso em: 1 ago. 2016

MEGUID, M. M. et al. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 843–857, 2000.

MEXICO SECRETARIA DE SALUD. **intervencion dietetica paciente con obesidad**. Centro Nacional de Excelencia Tecnologica en Salud, 2013. Disponível em: <www.centec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroGPC.html>. Acesso em: 1 out. 2016

NEARY, N. M.; GOLDSTONE, A. P.; BLOOM, S. R. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. **Clinical Endocrinology**, v. 60, n. 2, p. 153–160, 2004.

NONOGAKI, K. Serotonin conflict in sleep-Feeding. In: LITWACK, G. (Ed.). **Sleep Hormones**. First ed. United States of America: Academic Press, 2012.

OCHNER, C. N. et al. Biological mechanisms that promote weight regain following weight loss in obese humans. **Physiology & Behavior**, v. 120, p. 106–113, 2013.

PAXINOS, G. (ED.). **Chemoarchitectonic atlas of the rat brain**. 2. ed ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009.

PERSYNAKI, A.; KARRAS, S.; PICHARD, C. Unraveling the metabolic health benefits of fasting related to religious beliefs: A narrative review. **Nutrition**, v. 35, p. 14–20, 2017.

SÁNCHEZ LOPEZ, A. et al. receptores de la serotonina que inhiben el tono simpatico vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada.pdf. **Archivos de Cardiologia de México**, v. 2, p. 83–94, 29, 2009.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

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

SIMANSKY, K. J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 37–42, 1996.

SOETERS, M. R. et al. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid, or protein metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1244– 1251, 2009.

STANLEY, S. Hormonal Regulation of Food Intake. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1131–1158, 2005.

SWIERCZYNSKI, J. Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 57, 2006.

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.

TINSLEY, G. M.; LA BOUNTY, P. M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 10, p. 661–674, 2015.

VAKILI, R.; NIAZI, Z.; REZAIE, P. Type 1 diabetes and Ramadan fasting: A narrative review. **Journal of Fasting and Health**, n. 1, 2016.

VAN SWIETEN, M. M. H. et al. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61–62, p. 207–220, 2014.

VARADY, K. A. et al. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. **The Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 10, p. 2212–2219, 2007.

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

VARADY, K. A. et al. Improvements in body fat distribution and circulating adiponectin by alternate-day fasting versus calorie restriction. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 188–195, 2010.

VELLOSO, L. A. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 165–176, 2006.

WOODS, S. C. et al. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1219–1235, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Noncommunicable diseases country profiles 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128038/1/9789241507509_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 maio. 2017.

ZHANG, J. G. et al. Food restriction alters villi morphology in obese rats: gut mechanism for weight regain? **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 237, n. 9, p. 993–999, 2012a.

ZHANG, L.-N. et al. Physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 2, p. 376–387, 2012b.

ZHAO, Z.-J. et al. Body mass, energy budget and leptin of mice under stochastic food restriction and refeeding. **Dong Wu Xue Yan Jiu: Zoological Research**, v. 34, n. 6, p. 574–581, 2013.

ANEXO A

Aprovação do comitê de ética e uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



Macaé, 17 de Dezembro de 2015

Prezado

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado **“Efeito de nutrientes, plantas, algas e atividade física sobre a lipogênese, regulação da ingestão alimentar, programação metabólica e marcadores de síndrome metabólica.”**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência MAC030 possuindo validade de 4 (quatro) anos.

Atenciosamente,

Prof. Andre Gustavo Calvano Bonavita
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
SIAPE: 2738212
Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira
Rua Aluizio da Silva Gomes, 50 - Granja dos Cavaleiros, Macaé - RJ - CEP: 27930-560
Tel. (22) ??? E-mail: ceua@macae.ufri.br