

EFEITO DO HORÁRIO DE ALIMENTAÇÃO NO METABOLISMO E ATIVIDADE HIPOTALÂMICA EM RATOS WISTAR

Paula Chiamenti¹, Letícia Ramalho², Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo³.

1. Acadêmica de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
2. Nutricionista, doutora do PPG em Ciências Médicas: Psiquiatria / UFRGS
3. Professora do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da FAMED UFRGS

Resumo:

Diversas doenças metabólicas são prevalentes no trabalhador noturno e podem ser ocasionadas por sua dieta hiperlipídica e por seu comportamento alimentar noturno. O trabalho tem como objetivo investigar os efeitos do horário de alimentação no metabolismo e na atividade neuronal hipotalâmica de ratos Wistar. Seis animais receberam alimentação durante a fase de repouso (FR) e outros seis animais receberam alimentação durante a fase de atividade (FA). Ganho de peso, consumo energético, glicose, HDL-colesterol, triglicerídeos (TG), leptina e insulina séricos, TG hepáticos, quantidade de gordura visceral (GV) e atividade do hipotálamo foram aferidos. O grupo FA apresentou maior ganho de peso que o grupo FR. Não houve diferenças na leptina e insulina, tampouco na atividade do hipotálamo. Logo, essa modificação do comportamento alimentar influi diretamente no controle central e periférico do metabolismo e, conseqüentemente, na regulação do peso.

Autorização legal: CEUA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), projeto: 12-0198.

Palavras-chave: comportamento alimentar; trabalhador de turno; metabolismo.

Apoio financeiro: FIPE/HCPA, CAPES, IBRO

Introdução:

Diversas doenças metabólicas são prevalentes no trabalhador noturno e podem estar associadas a uma alteração na atividade neuronal, especialmente, nas áreas hipotalâmicas envolvidas na regulação do balanço energético. Essas patologias podem ser ocasionadas pela dieta hiperlipídica, típica desses trabalhadores, e por uma alteração do comportamento alimentar, característica desse grupo, o qual costuma alimentar-se durante o período noturno.

Os mamíferos têm um oscilador biológico central que regula o ritmo circadiano, o núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo. Tal núcleo é regulado pelo ciclo claro/escuro, transmitindo sinais de ritmicidade a áreas do hipotálamo e controlando, via sinais humorais, a sinalização dos ritmos biológicos para órgãos periféricos. Quando essa oscilação rítmica é desfeita, há uma cronodisrupção, dessincronização entre ritmos circadianos, relacionada a alterações no ciclo sono vigília e no ritmo de alimentação (1). Por tal razão, os trabalhadores de turno estão mais suscetíveis a doenças crônicas como obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (2,3,4).

Sabe-se que esse grupo de trabalhadores prefere lanches a refeições quentes. Esses lanches são ricos em gordura, principalmente a saturada, o que configura uma dieta hiperlipídica para essa população. Estudos experimentais comprovaram que, quando a dieta hiperlipídica é aplicada juntamente à restrição de horário em animais, maiores aumentos no peso ponderal ocorrem durante a fase de atividade. Isso demonstra que o horário de alimentação é importante para a regulação do peso (5).

O hipotálamo, principalmente seu núcleo arqueado (Arc) e sua porção lateral (HL), recebe sinais da periferia para fazer a regulação do metabolismo. A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos, que

sinaliza via sangue ao Arc sobre a quantidade de tecido adiposo disponível (6). A insulina, liberada pelo pâncreas, tem função secundária, respondendo à ingestão de alimentos (7). No HL, os neurônios que contêm melanin-concentrating-hormone (MCH) e orexina também estão envolvidos na regulação da fome e vigília(8). Estudos mostram que há alterações do nível de leptina em animais que se alimentam na fase de repouso (9).

Neste estudo, exploramos os efeitos de dieta hiperlipídica fornecidos durante a fase de repouso dos animais ou durante a sua fase de atividade. Assim, procurou-se investigar o efeito do horário de alimentação no metabolismo e na atividade neuronal do hipotálamo em ratos Wistar.

Metodologia:

Doze ratos wistar que receberam dieta hiperlipídica por 14 semanas foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo (n=6) recebia a alimentação durante a fase de repouso (FR) (8h às 20horas). O segundo grupo (n=6) recebia alimentação durante a fase de atividade (FA) (20h às 8 horas).

O experimento foi realizado na Unidade Experimental Animal do HCPA. Foram mantidos 3 animais por caixa, mantidos a uma temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob um ciclo claro/escuro de 12:12 horas.

Todos animais receberam dieta hiperlipídica, que era composta de 45,5% de ração padrão, 22,7% de banha, 22,7% de gordura vegetal e 9% de sacarose. A todos os ratos permitiu-se 12 horas de acesso à dieta e acesso *ad libitum* à água. Foram coletadas amostras de sangue para estabelecer os valores de baseline de glicose, TG e HDL-colesterol. A ingestão dos alimentos e de água foi medida diariamente e o peso ponderal semanalmente.

Ao final de 14 semanas, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina. Uma amostra de sangue foi colhido por punção cardíaca para aferição de HDL e TG. Os animais foram eutanaziados por perfusão transcardíaca com solução salina (250ml) seguida de solução de paraformaldeído a 4% (250ml). Ao final da perfusão, os encéfalos, a gordura visceral e os fígados foram removidos. Os encéfalos foram crioprotetidos em solução de sacarose a 30% durante 7 dias. Posteriormente, foram congelados e imediatamente cortados em fatias e mergulhados em solução de PBS. Foi realizada imunohistoquímica para verificação de atividade neuronal do NSQ, área perifornical, hipotálamo lateral e núcleo

arqueado com anticorpo c-Fos (1:2500). Após, as secções foram montadas em lâminas próprias e desidratadas em álcool e Xilol.

As regiões cerebrais seleccionadas para análise foram identificadas com o atlas de Paxinos e Watson. Usando um microscópio de luz e uma ampliação de 20X, 3 imagens por área foram obtidas bilateralmente. O número de células positivas c-Fos foi contado utilizando o software Image J. As condições de intensidade luminosa e limiar foram mantidas idênticas para todas as seções. Os pesquisadores foram cegos para diferentes grupos.

A leptina e a insulina foram analisadas pelo método Luminex e a glicose foi analisada pelo glicosímetro. TG séricos foram analisados através de radioimunoensaio. Para visualizar o depósito de lipídios no fígado, as amostras de tecido hepático foram fixadas e crioprotetidas em solução de sacarose a 30% e depois foram congeladas e seccionadas em criostato. As secções foram com coradas com vermelho e, então, foram contrastadas com hematoxilina & eosina. Microfotografias foram capturadas. Foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas para analisar ganho de peso e consumo energético e teste t de student para amostras independentes: peso ponderal, glicose, HDL-colesterol e TG séricos. P-valor menor que 0,05 foi considerado estaticamente significante. Todas análises foram realizadas com o software SPSS 18.0.

Resultados e Discussão:

Este experimento comparou dois grupos (FR e FA) após 14 semanas. No baseline, não houve diferenças entre os grupos quanto aglicose ($p=0,03$), colesterol ($p=0,01$) e TG séricos. O grupo FA apresentou maior ganho de peso ($p=0,03$) e maior consumo energético ($p<0,001$) do que FR.

Em relação ao órgãos e tecidos, o peso do fígado foi maior no grupo FA ($p=0,03$). Não foram observadas diferenças no peso da gordura visceral ($p=0,32$) após após 14 semanas.

Não houve diferenças na leptina ($p=0,31$) e insulina ($p=0,83$), tampouco na atividade neuronal nas áreas hipotalâmicas NSQ ($p=0,78$), área perifornical ($p=0,49$), hipotálamo lateral ($p=0,73$) e núcleo arqueado ($p=0,57$).

Conclusões:

Nesse modelo de restrição de alimentação, as áreas hipotalâmicas não mostraram o padrão de ativação neuronal

esperado, bem como o NSQ que não mostrou associação com o ciclo claro/escuro. Portanto, esse modelo de alimentação pode promover a perda do padrão temporal de atividade no hipotálamo, causando uma disrupção no controle do balanço energético. Em resumo, o horário de alimentação influi diretamente no controle central e periférico do metabolismo e, conseqüentemente, na regulação do peso.

Referências bibliográficas

- 1) Buijs, R.M., van Eden, C.G., Goncharuk, V.D. & Kalsbeek, A. (2003) The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J. Endocrinol.*, 177, 17–26.
- 2) Jang, H., Lee, G., Kong, J., Choi, G., Park, Y.J. & Kim, J.B. (2012) Feeding period restriction alters the expression of peripheral circadian rhythm genes without changing body weight in mice. *PLoS One*, 7, e49993.
- 3) Yoon, J.A., Han, D.H., Noh, J.Y., Kim, M.H., Son, G.H., Kim, K., Kim, C.J., Pak, Y.K. et al. (2012) Meal time shift disturbs circadian rhythmicity along with metabolic and behavioral alterations in mice. *PLoS One*, 7, e44053.
- 4) Bray, M.S., Ratcliffe, W.F., Grenett, M.H., Brewer, R.A., Gamble, K.L. & Young, M.E. (2013) Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *Int. J. Obes.*, 37, 843–852.
- 5) Waterhouse J, Buckley P, Edwards B, Reilly T. Measurement of, and Some Reasons for, Differences in Eating Habits Between Night and Day Workers. *Chronobiol Int.* 2003 Nov;20(6):1075-92.
- 6) Hallas JL, Gajiwala KS, Maffei M et al. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269(5223):543-6.
- 7) Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gilette J, Schubert M, Orban PC et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; 289(5487):2122-5.
- 8) Gao XB, Horvath TL. Feeding behavior: Hypocretin/orexin neurons act between food seeking and eating. *Curr Biol* 2016; 26(18):R845-7.
- 9) Opperhuizen AL, Wang D, Foppen E, Jansen R, Boudzovitch-Surovtseva O, de Vries J, Fliers E, Kalsbeek A. Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats. *Eur J Neurosci.* 2016 Nov;44(10):2795-2806. doi: 10.1111/ejn.13377. Epub 2016 Sep 14.
- 10) Arble DM, Ramsey KM, Bass J et al. Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24(5):785-800
- 11) Cisse YM, Peng J, Nelson RJ. Dim light at night prior to adolescence increases adult anxiety-like behaviors. *Chronobiol Int* 2016; 33(10):1473-1480.
- 12) Froy O, Chapnik N, Miskin R. Effect of intermittent fasting on circadian rhythms in mice depends on feeding time. *Mech Ageing Dev.* 2009; 130(3):154-60.
- 13) Sherman H, Genzer Y, Cohen R et al. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB J.* 2012; 26(8):3493-502.
- 14) Chaix A, Zarrinpar A, Miu Petal. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab.* 2014; 20(6):991-1005.
- 15) Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A et al. Time restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed with a high fat diet. *Cell Metab* 2012; 15(6):848-860.
- 16) Buijs RM, Escobar C, Swaab DF. The circadian system and the balance of the autonomic nervous system.

HandbClinNeurol 2013; **117**:173-
191