



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE METABÓLICA EM RATOS *Wistar* SUBMETIDOS À  
DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA FORÇADA E ALIMENTAÇÃO  
EM TEMPO RESTRITO**

**ISIS GABRIELLI BARBIERI DE OLIVEIRA**

**GOIÂNIA-GO**

**2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Isis Gabrielli Barbieri de Oliveira

#### 3. Título do trabalho

ANÁLISE METABÓLICA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA FORÇADA E ALIMENTAÇÃO EM TEMPO RESTRITO

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
  - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isis Gabrielli Barbieri De Oliveira, Discente**, em 01/03/2023, às 20:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3492455** e o código CRC **9A4839B1**.

**ISIS GABRIELLI BARBIERI DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE METABÓLICA EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À  
DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA FORÇADA E ALIMENTAÇÃO  
EM TEMPO RESTRITO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa

**GOIÂNIA-GO  
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Isis Gabrielli Barbieri de  
ANÁLISE METABÓLICA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À  
DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA FORÇADA E ALIMENTAÇÃO EM  
TEMPO RESTRITO [manuscrito] / Isis Gabrielli Barbieri de Oliveira. -  
2023.

17, 37 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de  
figuras, lista de tabelas.

1. Desalinhamento circadiano. 2. Alimentação em tempo restrito. 3.  
Metabolismo. 4. Cronobiologia. 5. Sistema antioxidante. I. Rosa,  
Daniel Alves, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

#### ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 112 da sessão de Defesa de Tese de do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a Isis Gabrielli Barbieri de Oliveira o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e seis dias do mês de janeiro de 2023, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "ANÁLISE METABÓLICA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA FORÇADA E ALIMENTAÇÃO EM TEMPO RESTRITO". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Daniel Alves Rosa (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor John Fontenele Araújo (UFRN), membro titular externo; Professor Doutor Horacio De La Iglesia (University of Washington), membro titular externo; Professor Doutor Marcio Alberto Torsoni (UNICAMP), membro titular externo; Professora Doutora Aline Priscila Pansani (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Daniel Alves Rosa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e seis dias do mês de janeiro de 2023.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior, em 26/01/2023, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Aline Priscila Pansani, Professora do Magistério Superior, em 26/01/2023, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcio Alberto Torsoni, Usuário Externo, em 27/01/2023, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por John Fontenele Araujo, Usuário Externo, em 27/01/2023, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Henrique De Castro, Coordenador de Pós-graduação, em 27/01/2023, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3475884 e o código CRC D70EADCF.

## Dedicatória

*À Deus, meus pais Ivanildo e Maria Luisa,  
minha irmã Ana Caroline,  
minhas fiéis companheiras caninas Ana Clara e Flor de Lótus e  
toda sociedade brasileira.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço à Deus pela saúde física e mental para concluir essa jornada árdua. Aos meus pais, Maria Luisa e Ivanildo que me proporcionaram condições físicas, emocionais, psíquicas e financeiras durante todo processo, especialmente a minha mãe que me acompanhou em todas madrugadas do período experimental deste estudo, mesmo que cansada garantindo minha segurança. À minha irmã Ana Caroline por ser meu exemplo de responsabilidade, foco e ética profissional.

Às minhas companheiras e amigas caninas: Ana Clara e Flor, que sem dúvidas me proporcionaram ânimo e paz mesmo em meio a pressão e caos do processo de doutoramento.

Ao meu orientador Dr. Daniel Alves Rosa pelo convite inicial em ingressar como aluna orientada por ele, grata à oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos que meus colegas do Centro de Pesquisa em Neurociências e Fisiologia Cardiovascular da UFG e ao Laboratório de Distúrbios do Metabolismo da UNICAMP que me acompanharam até o fim, e não me abandonaram, minha imensa gratidão.

Meus singelos agradecimentos à sociedade brasileira que mesmo indiretamente contribui financeiramente para minha formação através de uma bolsa de estudos que me auxiliou em alguns gastos durante o processo de doutoramento.

A toda comunidade científica que me auxiliou através das publicações anteriores na qual me deram embasamento teórico, bem como palestras em congressos, conselhos presenciais e a toda banca examinadora de qualificação e defesa que contribui para a qualidade deste documento final.

## Epígrafe

“E disse Deus: Haja luminares na expansão dos céus, para haver separação entre o dia e a noite; e sejam eles para sinais e para tempos determinados e para dias e anos.”

Bíblia Sagrada

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
RESUMO.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Animais .....	24
3.2 Protocolo de dessincronização circadiana.....	24
3.3 Massa corporal, ingestão alimentar e hídrica.....	25
3.4 Teste de tolerância à glicose (oGTT) e à insulina (ipITT).....	25
3.5 Coleta de tecidos.....	26
3.6 Extração de proteínas e Western Blotting.....	27
3.7 Extração de RNA e RT- qPCR.....	28
3.8 Peroxidação lipídica .....	29
3.9 Proteína carbonilada.....	29
3.10 Atividade da superóxido dismutase e catalase.....	29
3.11 Análises bioquímicas .....	30
3.12 Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS .....	32
4.1 Atividade locomotora.....	32
4.2 Ingestão alimentar e massa corporal.....	34
4.3 Homeostase da glicose.....	35
4.4 Expressão gênica no fígado e no hipotálamo.....	36
4.5 Expressão de proteínas no fígado.....	38
4.6 Estresse oxidativo no fígado .....	39
4.7 Análises bioquímicas plasmáticas e massa dos órgãos.....	39
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto representativa da disposição dos animais no contêiner específico para o protocolo de dessincronização circadiana para todos os grupos.....	24
Figura 2. Dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito na atividade locomotora.....	32
Figura 3. Efeitos da dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito sob a atividade locomotora.....	33
Figura 4. Variação do ritmo sincronizado com o ciclo claro-escuro e alimentação em tempo restrito.....	33
Figura 5. Variância do ritmo sincronizado com o ciclo claro-escuro dos grupos separadamente.....	34
Figura 6. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na ingestão alimentar e na massa corporal durante oito semanas.....	35
Figura 7. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na homeostase da glicose <i>in vivo</i> em dias de alinhamento (coincidência).....	36
Figura 8. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica de genes envolvidos na homeostase glicêmica no fígado em dias de alinhamento (coincidência).....	37
Figura 9. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica de NPY, CART <sub>pt</sub> e CRH no hipotálamo em dias de alinhamento (coincidência).....	37
Figura 10. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica dos genes relógios no hipotálamo em dias de alinhamento (coincidência).....	38
Figura 11. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão de proteínas envolvidas na homeostase glicêmica em dias de alinhamento (coincidência).....	38
Figura 12. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob enzimas e biomarcadores envolvidos no sistema antioxidante no fígado em dias de alinhamento (coincidência).....	39
Figura 13. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob a massa dos órgãos.....	40
Figura 14. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob o tecido adiposo branco.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conjunto de primers para genes relógios no tecido hipotalâmico de ratos.....	28
Tabela 2. Análises bioquímicas plasmática de ratos <i>Wistar</i> em jejum (12h) em dias de alinhamento (coincidência), após oito semanas de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % V – porcentagem da variância
- ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
- AgRP – proteína relacionado com agouti
- AKT – proteína quinase B
- AL – *ad libitum*
- ALT – alanina aminotransferase
- ARC – núcleo arqueado
- ASC – área sob a curva
- AST – aspartato aminotransferase
- BCA – Bicinconinic Acid Protein
- BMAL1 – gene Arnt-like cerebral e muscular 1
- CARTpt – gene prépropeptídeo transcrito regulado por cocaína e anfetamina
- CAT – catalase
- cDNA – DNA complementar
- CE – Ciclo claro/escuro
- CE22 – Ciclo claro-escuro artificialmente curto de 22h
- CE24 – Ciclo claro-escuro artificialmente de 24h
- CLOCK –gene Ciclos de Saída do Locomotor Circadiano Proteína Kaput
- cm- centímetros
- CRH –Hormônio liberador de Corticotrofina
- CTR AL – grupo controle com alimentação ad libitum
- CTR RF – grupo controle com alimentação restrita à fase escura
- D – delta / variação
- dmSCN – região dorsomedial do núcleo supraquiasmático
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DRG – dieta rica em gorgura, ou, dieta hiperlipídica
- DSC – dessincronização circadiana forçada
- DSC AL – grupo dessincronizado com alimentação ad libitum

DSC RF – grupo dessincronizado com alimentação restrita à fase escura

f-AKT – proteína quinase B fosforilada

FOXO – proteína forkhead box

FOXO-1 – fator de transcrição forkhead box 1

g – grama(s)

G6Pase – glicose 6-fosfatase

G6pc – gene da glicose-6-fosfatase, subunidade catalítica

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

h – hora(s)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HDL – lipoproteína de alta densidade

HPA – eixo hipotálamo hipófise adrenal

i.p – via intraperitoneal

icv – intracerebroventricular

ipITT – Teste de tolerância à insulina por via intraperitoneal

IRS-1 – Subunidade do receptor de insulina

kg – kilograma(s)

Kitt – taxa de decaimento da glicose sanguínea

LDL – lipoproteína de baixa densidade

m- metro

MAD – malondialdeído

mg – miligrama

min – minuto(s)

mL – mililitro(s)

mM- milimolar

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – ortovanadato de sódio

NaCl – cloreto de Sódio

nm – nanômetro

nmol – nanomole

NPY – neuropeptídeo Y

oGTT – Teste de tolerância à glicose por via oral

PBS – salina tamponada com fosfato

PC – proteína carbonilada

PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PER1 – gene Período 1

PER2 – gene Período 2

pH – potencial de hidrogênio

PI3K – fosfoinosítídeo 3-quinase

PI3Kca – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase catalítica subunidade alfa

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

POMC – pró-opiomelanocortina

Ppck – gene da fosfoenolpiruvato carboxilase quinase

PTEN – gene da fosfatase homóloga à tensina

PtPN1 – gene da proteína tirosina fosfatase não-receptor tipo 1

PVN – núcleo paraventricular

RNA – ácido ribonucleico

rpm – repetição por minuto

RT – qPCR – técnica da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa

s – segundo(s)

SAP – software de acionamento programado

SCN – núcleo supraquiasmático

SOD-1 – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRF – alimentação em tempo restrito (correspondente em inglês)

TRH – trato retinohipotalâmico

u.a – unidade arbitrária

UI – unidades internacionais

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

vLSCN – região ventrolateral do núcleo supraquiasmático

ZT – Zeitgeber

$\Delta\Delta$  Ct – método CT comparativo

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

## RESUMO

O núcleo supraquiasmático (SCN) faz parte do sistema de temporização multioscilar em mamíferos, regulando vários ritmos fisiológicos e sob modulação de sincronizadores internos ou ambientais, dentre eles: o ciclo claro-escuro (CE), o maior sincronizador fótico desse sistema. No entanto, sincronizadores não-fóticos, como a disponibilidade de alimentos, permanecem mais obscuras. Aqui usamos ratos *Wistar* (250-300g) distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle CTR AL sob um ciclo simétrico de 12:12h CE e disponibilidade de alimentos *ad libitum* ou CTR RF com alimentação em tempo restrito (TRF); DSC AL submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana forçada sob um ciclo simétrico de 11:11h CE (DSC) com disponibilidade de alimentos *ad libitum* e DSC RF com TRF, durante oito semanas para avaliar o impacto da DSC e do TRF na atividade locomotora, metabolismo hepático e no sistema antioxidante. Durante a oitava semana, todos os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina e glicose – ipITT e oGTT. Após 48h de recuperação, foram eutanasiados e amostras de sangue, fígado e hipotálamo foram removidas e armazenadas para análises bioquímicas, Western blotting e RT-qPCR.

**Resultados:** Como esperado, todos os animais DSC apresentaram dissociação do ritmo de atividade locomotora. O TRF aumentou a taxa de dessincronia no grupo DSC RF indicando dominância do componente arrastado pela luz (LEC). A DSC ou o TRF separadamente não alterou a ingestão total ou a massa corporal, mas a associação de ambos reduziu a ingestão alimentar total, refletindo na evolução da massa corporal. No entanto, a análise separada da ingestão nas fases do CE demonstra que na fase clara a ingestão é maior no grupo DSC quando comparado ao CTR AL. O TRF promove aumento simultâneo de NPY e CART apenas em animais sob ciclo CE 12:12h. A DSC aumentou a expressão gênica de PTEN, PTPN1 e G6Pase, da proteína PI3K, a atividade das enzimas SOD-1 e catalase e os biomarcadores de estresse oxidativos TBARS e proteína carbonilada no fígado, porém o TRF atenuou apenas os efeitos na G6Pase e na PI3K. **Conclusão:** Em síntese, esses achados mostram que a DSC estabelece estresse oxidativo e promove alterações na sinalização da insulina no fígado, que não foi atenuada pela associação com o TRF.

**Palavras-Chave:** desalinhamento circadiano, alimentação em tempo restrito; metabolismo; cronobiologia; sistema antioxidante.

## ABSTRACT

The suprachiasmatic nucleus is part of a multi-oscillatory timing system in mammals, regulating various physiological rhythms and under modulation by internal or environmental synchronizers, among them: the light-dark cycle (LD), the most important photic synchronizer of this system. However, non-photoc synchronizers such as food availability remain more unclear. Here, we use *Wistar* rats (250-300g) randomly distributed into four groups: control CTR AL under a symmetrical cycle of 12:12h LD and *ad libitum* food availability or CTR RF with time-restricted feeding (TRF); DSC AL submitted to the forced circadian desynchronization protocol under a symmetrical cycle of 11:11h LD with *ad libitum* food availability and DSC RF with TRF, during eight weeks to evaluate the impact of DSC and TRF on locomotor activity, hepatic metabolism and on the antioxidant system. During the eighth week, all animals were submitted to the insulin and glucose tolerance test – ipITT and oGTT. After 48h of recovery, they were euthanized. Plasma, liver and hypothalamus samples were removed and stored for biochemical analyses, Western blotting and RT-qPCR. Results: As expected, all DSC animals showed dissociation of the locomotor activity rhythm. TRF increased the rate of dyssynchrony in the DSC RF group, indicating dominance of the light-entrained component (LEC). DSC or TRF separately did not alter total food intake or body mass, but the association of both included total food intake, reflecting on the evolution of body mass. However, the separate analysis of food intake in the LD phases demonstrates that in the light phase intake is higher in the DSC group when compared to the CTR AL. TRF promotes simultaneous increase of NPY and CART only in animals under LD cycle 12:12h. DSC increased the gene expression of PTEN, PTPN1 and G6Pase, the PI3K protein, the activity of SOD-1 and catalase enzymes and the oxidative stress biomarkers TBARS and protein carbonyl in the liver, but TRF attenuated only the effects on G6Pase and PI3K. Conclusion: In summary, these findings show that forced desynchronization increases considerable oxidative stress and promotes changes in insulin signaling in liver, which was not attenuated by the association with TRF.

**Keywords:** circadian misalignment; time restricted feeding; metabolism; chronobiology; antioxidant system.

## IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Na atualidade, a exposição aos ciclos ambientais naturais de claro e escuro são perturbados pela iluminação artificial. Além disso, as novas demandas sociais e alterações nos horários das refeições contribuem para a uma cronodisrupção, ou seja, perturbação dos ritmos circadianos, resultando em resultados adversos à saúde (1–4).

O trabalho em turnos, surge como consequência do crescimento industrial e populacional, promovendo a necessidade de jornadas de trabalho originados pela atual demanda da “sociedade 24horas”, tais como: telecomunicações, atendimento de urgência em hospitais, farmácias, vigilância noturna, indústrias, dentre outros. Os trabalhadores em turnos são “forçados”, ainda que voluntariamente, a ficarem ativos quando seu ritmo biológico natural se prepara para estar em repouso, ocasionando assim uma ruptura dos ritmos biológicos, ou seja, a dissociação entre os sinais temporais do relógio biológico e o horário de sono/atividade e/ou alimentação/jejum.

Esse desalinhamento circadiano pode explicar parcialmente o aumento de incidências patológicas observadas em trabalhadores noturnos, como por exemplo, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, inflamação, câncer, disfunções reprodutivas e outras doenças (2,5–11).

Em nosso estudo anterior (12) com modelo animal de dessincronização circadiana (13), observamos efeitos hepáticos deletérios relacionados à via de sinalização da insulina e enzimas envolvidas no sistema antioxidante. No entanto, não investigamos a relação com a ingestão alimentar, caracterizada como um sincronizador não-fótico. Alguns estudos já demonstraram mudanças nos padrões de alimentação em trabalhadores em turnos (14–16).

No entanto, não está esclarecido os efeitos entre sincronizadores fóticos e não fóticos, como o arrastamento do ciclo claro-escuro e o ciclo alimentação/jejum, sob a expressão de genes e proteínas hepáticas e hipotalâmicas envolvidas na via da sinalização da insulina e da gliconeogênese.

Torna-se essencial esclarecer os prejuízos e prováveis mecanismos envolvidos nesse processo, para informação, elaboração e promoção de intervenções que visam educar e melhorar a qualidade de vida de trabalhadores em turnos.

## 1. INTRODUÇÃO

No planeta Terra, os organismos vivos são submetidos à flutuações ambientais ao longo dos anos, meses e dias, portanto desenvolveram um sistema de temporização interno intimamente ligado ao ambiente e suas mudanças, através de interações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais mútuas culminando em ritmos biológicos. (17,18).

O sistema de temporização em mamíferos, consiste principalmente de um oscilador autônomo central, estruturas hipotalâmicas e bilaterais denominadas de núcleo supraquiasmático (SCN) e os osciladores periféricos, distribuídos amplamente por todos os tecidos(19–21). Esses osciladores são mecanismos caracterizados por flutuações repetidas em um intervalo temporal regular. Em condições fisiológicas esse sistema multioscilaratório está interconectado e sincronizado entre si (18,22).

A descoberta endógena do oscilador central foi possível através de lesões seletivas de áreas hipotalâmicas nos estudos de Stephan et al (23,24). Lesões no SCN em ratos albinos abole permanentemente os ritmos noturnos e circadianos na ingestão hídrica e na atividade locomotora, concluindo que essa estrutura era responsável pela geração de tais ritmos.

Um clássico experimento aplicando técnicas de transplante neural, através de pequenos enxertos de neurônios do SCN íntegro em animais arrítmicos após lesão eletrolítica, promoveu restauração da ritmicidade circadiana. No entanto, os ritmos restaurados demonstravam sempre o mesmo período do genótipo do doador, determinando a endogenicidade e a individualidade genética desse núcleo (25).

Descobertas recentes, demonstram que os osciladores centrais são gerados e controlados por um loop de feedback autorregulatório transcricional composto pelos ativadores transcricionais, Clock e Bmal1, e seus genes-alvo, Per1, Per2, Cry1 e Cry2, cujos produtos se acumulam ritmicamente e formam um complexo repressor que interage com CLOCK-BMAL1 inibindo sua própria transcrição. Essa recente descoberta permitiu a percepção da expressão gênica dos genes relógio pelos diversos tecidos do corpo: osciladores periféricos (19,26,27)

O SCN está sujeito à modulação a partir de outros sincronizadores internos ou ambientais, dentre eles: o ciclo claro-escuro (CE). Esse sincronizador é caracterizado como fótico, pois está relacionado ao fotoperíodo. A luz incide na retina

transmitindo informações visuais através de projeções dos tratos ópticos (trato retinohipotalâmico - TRH) para o SCN, sincronizando diversos ritmos biológicos através de flutuações gênicas, bioquímicas e fisiológicas em ciclos de aproximadamente 24h, denominados ritmos circadianos, originados do latim *cerca de um dia* (28–30).

Esse processo de fotossincronização nos mamíferos se inicia nas células ganglionares da retina que possuem fotorreceptores e terminam nos ramos dendríticos menores dos neurônios do núcleo supraquiasmático (28,31), sendo assim a luz, além de ser o estímulo para a visão, também controla processos que são completamente independentes da formação de imagem, como ajustes dos ritmos circadianos do organismo através do CE. Os estímulos capazes de sincronizar as oscilações autossustentadas do SCN foram denominados de *Zeitgebers* - ZT (“doadores de tempo”) pelo alemão Aschoff (32), o ciclo claro-escuro é o *zeitgeber* mais esclarecido e considerado uma “pista externa” (33).

Nos experimentos de Campuzano *et al* (13,34) ratos e ratas foram mantidos sob períodos de CE compreendidos entre 21- 23,5h, demonstrando que o padrão da atividade locomotora pode ser dissociado em dois componentes, porém depende quantitativamente do período (T), indicando que existe um limite de arrastamento circadiano.

Iglesia *et al* (35) submeteram ratos ao CE artificialmente curto de 22 horas (CE22), consolidando-o como método não-invasivo de dissociação do SCN *in vivo* que expressa dois ritmos circadianos com comprimentos de períodos diferentes na atividade locomotora: um componente arrastado pela luz (LEC) e outro não-arrastado pela luz (NLEC). Além disso, a expressão gênica nas subdivisões do SCN: ventrolateral (vlSCN) e dorsomedial (dmSCN) diferiram entre si. Isso ocorre pois no SCN de alguns roedores como ratos, os neurônios ventrolaterais recebem entrada direta na retina e, por sua vez, projetam-se para os neurônios dorsomediais ipsilaterais, dentre eles o núcleo paraventricular (PVN), envolvido em diversas funções, incluindo na síntese de glicocorticoides (21,31,36–38).

Outro modelo animal foi proposto por Salgado-Delgado *et al* (3), no qual através de uma roda de atividade os animais são forçados a estar ativos durante oito horas na fase clara, ou seja, na fase de sono do ciclo vigília-sono. Este estudo evidenciou que a atividade forçada durante essa fase altera tanto ao padrão de

atividade locomotora, como a ingestão alimentar, resultando na perda de ritmicidade da glicose e inversão do ritmo de triacilgliceróis.

Embora o ciclo claro-escuro seja o principal *Zeitgeber* do oscilador central, a disponibilidade de alimentos ou jejum recentemente foram reconhecidos como outro potente sincronizador dos osciladores periféricos, promovendo arrastamento de fase. Estes são caracterizados como não-fóticos, ou seja, que não dependem da luz e possuem importante papel nas alterações da expressão gênica do oscilador no fígado (38,39). Essas alterações poderiam ocasionar mudanças no metabolismo e equilíbrio energético, mas não estão plenamente esclarecidos (40–43).

O oscilador do fígado gera ritmos transcricionais diários, porém a regulação dos genes circadianos e sua interação com o CE não é plenamente esclarecida nesse tecido(44). No entanto, sugerimos que essa regulação poderia ocorrer através de eventos catabólicos e anabólicos com base nas entradas e demandas energéticas do corpo controlada por outros ritmos, como por exemplo, o ciclo alimentação/jejum (45–47).

Por exemplo, o desencadeamento do pico de insulina através da ingestão de alimentos ativa a expressão de enzimas metabólicas no fígado ocasionando eventos anabólicos, como glicogênese e lipogênese (46–48). Contudo, a composição da dieta interfere no processo de lipogênese, pois após alimentação crônica com dieta rica em gordura (DRG), os níveis de lipogênese no fígado permanecem alta mesmo durante o jejum, quando a secreção de insulina é inibida (49–51).

O desalinhamento circadiano aumenta a ocorrência de disfunções metabólicas, incluindo doença hepática gordurosa, obesidade e diabetes (7,8,43,52–55), uma das causas poderia ser a alteração na transcrição rítmica dos genes relógios no fígado (56).

Com a crescente industrialização mundial, a existência do trabalho em turnos, como por exemplo, atendimento de urgência em hospitais, farmácias, vigilância noturna, indústrias, se tornaram necessários pela demanda da atual “sociedade 24horas”. Esses funcionários com jornadas de trabalho em turnos noturnos ou com carga horária em turnos alternados que incluem um período noturno são incluídos no termo designado como “trabalho em turnos”. Simultaneamente, a exposição de luz artificial à noite aumentou para execução dessa jornada noturna, permitindo maior segurança na realização das atividades sociais e profissionais. Portanto, nos centros urbanos, os ciclos ambientais naturais são interrompidos pela

iluminação artificial, padrão alimentar e/ou pela demanda social do trabalho em turnos, promovendo cronodisrupção, ou seja, perturbação dos ritmos circadianos internos (5,7–10,57,58).

Sabe-se que o ser humano possui hábitos predominantemente diurnos, portanto, trabalhadores em turnos são “forçados”, ainda que voluntariamente, a ficarem ativos quando deveriam estar em repouso. Desta forma, ocorre uma ruptura da “sincronização interna” dos ritmos, frequentemente associada à prevalência de insônia, obesidade, diabetes, esterilidade, câncer, distúrbios cardiovasculares, transtornos do humor, depressão e ansiedade (1–3,8,54,55,59,60).

Gaspar *et al* (61) demonstraram que o desempenho cognitivo em trabalhadores em turnos também sofre consequências ocasionados pelo desalinhamento circadiano, os relatos são acompanhados por queixas de alteração no humor, fadiga (aguda ou crônica), sonolência e aumento de acidentes de trabalho.

Além disso, o trabalho em turnos promove mudanças nos padrões de alimentação, seja na janela alimentar, no aumento da ingestão alimentar ou no tipo de nutrientes ingerido (14–16). Portanto, sugerimos que distúrbios prevalentes neste grupo de trabalhadores extrapolam os efeitos relacionados ao CE, e são somados às alterações na ingestão alimentar em horários atípicos (62,63).

Nossos estudos anteriores(12) apresentaram efeitos hepáticos deletérios relacionados à sinalização da insulina via PI3K/AKT e aumento de enzimas envolvidas no equilíbrio do sistema antioxidante em roedores submetidos à dessincronização circadiana forçada. No entanto, anteriormente não mensuramos o consumo alimentar separadamente em cada fase do CE, e propomos avaliar essa lacuna neste novo estudo.

Tomando em conjunto os dados da literatura atual e nossos resultados anteriores, formulamos a hipótese que a alimentação em tempo restrito na fase escura atenua os prejuízos sob o metabolismo e o sistema antioxidante de animais submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana forçada (DSC), com objetivo de identificar os efeitos isolados e associados do regime de iluminação e do regime de alimentação, verificando se os efeitos na sinalização da insulina e no sistema redox são por alteração na ingestão alimentar neste protocolo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da dessincronização circadiana forçada do ritmo atividade/repouso e da alimentação em tempo restrito em ratos *Wistar* sob os parâmetros metabólicos e o sistema antioxidante.

### 2.2. Objetivos Específicos

- I. Analisar o perfil atividade-repouso dos animais submetidos ao ciclo claro-escuro simétrico de 22h durante o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;
- II. Avaliar o consumo alimentar separadamente nas fases do ciclo claro/escuro durante o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;
- III. Acompanhar e avaliar a massa corporal semanalmente durante o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;
- IV. Verificar a sensibilidade à insulina através do teste de tolerância à insulina (ipITT) e a tolerância à glicose (oGTT);
- V. Analisar os parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídios;
- VI. Analisar a função hepática através dos parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), amilase, fosfatase, desidrogenase, lipase, albumina, proteínas totais, bilirrubina direta e total;
- VII. Mensurar a atividade de superóxido dismutase (SOD-1) e catalase (CAT) e os biomarcadores envolvidos na defesa antioxidante: peroxidação lipídica e proteína carbonilada no fígado após o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;
- VIII. Analisar a expressão proteica de proteínas/enzimas envolvidas na via de sinalização da insulina via PI3K/Akt no fígado: IRS, PI3K e AKT e da via da gliconeogênese: PEPCK e G6Pase após o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;

- IX. Analisar a expressão gênica dos genes envolvidos na via da insulina: IRS-1, PI3Kca, Akt e da gliconeogênese: PTEN, Ppck, G6pc, PtPN1 no fígado após o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito;
- X. Avaliar a expressão gênica hipotalâmica do neuropeptídeo Y (NPY), CARTpt e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e dos principais genes relógios: CLOCK, BMAL e PER2 após o protocolo de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Vinte Ratos *Wistar* (250-300g) foram obtidos no Animal Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e foram alojados individualmente em gaiolas padrão (30x20x13 cm<sup>3</sup>), pois o alojamento em grupo interfere no registro do ritmo da atividade locomotora individualmente. O acesso a água e ração padrão (Presence®, São Paulo, SP, Brasil) foi fornecido conforme previamente estabelecido para cada grupo experimental. As gaiolas foram colocadas com temperatura controlada (21 ± 2°C). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil (protocolo n °: 001/19).



Figura 1. Foto representativa da disposição dos animais no contêiner específico para o protocolo de dessincronização circadiana forçada.

#### 3.2. Protocolo de dessincronização circadiana forçada

Inicialmente, no período de adaptação, todos os animais foram mantidos invertidos em um ciclo claro-escuro simétrico de 24h (12h claro:12h escuro) - luzes acesas às 18h - por quatro semanas antes do início dos experimentos.

Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente dentro de quatro condições experimentais durante oito semanas. Os grupos experimentais consistiam em:

CTR – AL (n=4): grupo controle submetido ao ciclo claro/escuro simétrico com período de 24h (12h claro: 12h escuro – CE24) com disponibilidade de alimento *ad libitum*;

CTR – RF (n=5): grupo controle submetido ao ciclo claro/escuro simétrico com período de 24h (12h claro: 12h escuro – CE24) com alimentação em tempo restrito, ou seja, com disponibilidade durante a fase escura do CE;

DSC – AL (n=5): grupo experimental submetido ao ciclo claro/escuro simétrico de 22h (11h claro: 11h escuro – CE22) com disponibilidade de alimento *ad libitum*;

DSC – RF (n=6): grupo experimental submetido ao ciclo claro/escuro simétrico de 22h (11h claro: 11h escuro – CE22) com alimentação em tempo restrito, ou seja, com disponibilidade na fase escura do CE (DSC – RF).

O protocolo de dessincronização interna forçada (DSC) utilizado nesse estudo foi realizada conforme relatado anteriormente (13,35). O tempo de Zeitgeber (ZT) 0 se refere ao início da fase clara (luz acesa), ZT 12 se refere ao início da fase escura (luz apagada) para os grupos CTR e ZT11 se refere à luz apagada para os grupos DSC. Em todos os casos, a intensidade da luz consistia em  $100\pm 10$  lux durante a fase clara.

### 3.3. Massa corporal, ingestão alimentar e hídrica

Durante todo o protocolo a ingestão alimentar foi medida diariamente em ambas fases do ciclo: claro ou escuro, através de manipulação manual no início da fase escura e da fase clara. A ingestão relativa foi calculada através de correção com o peso semanal de cada animal. A massa corporal foi mensurada semanalmente para calcular a evolução do peso corporal através da comparação com o peso inicial de cada animal.

### 3.4. Teste de tolerância à insulina (ipITT) e à glicose (oGTT)

No início da oitava semana do protocolo experimental os animais foram submetidos ao teste de ipITT (1,5U/Kg de peso corporal, administrada via i.p.), com insulina recombinante humana (Eli Lilly®, São Paulo, Brasil) em concentração 2% (v/v) diluída em solução fisiológica isotônica (NaCl 0,9%), os animais tiveram comida retida

por 2 horas antes da injeção de insulina, durante a fase escura do ciclo claro/escuro, aproximadamente entre os ZT 16 e 17.

Amostras de sangue foram coletadas através de uma pequena punção na extremidade da cauda e a glicemia medida por glicosímetro comercial com fitas descartáveis (ACCU-CHECK® Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) em um momento anterior à injeção de insulina (basal), e 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de insulina (Trevenzoli, Rodrigues, et al., 2010).

A taxa de decaimento da glicose sanguínea (Kitt) foi calculada através da fórmula  $Kitt = Slope \times 100$ , calculado a partir da análise do ângulo de inclinação da reta das concentrações de glicose plasmática durante a fase linear de declínio da glicemia (Calegari et al, 2011).

Os animais submetidos ao ipITT, após 24h foram submetidos a jejum prévio (12 horas), seguido do teste oral de tolerância à glicose (oGTT). Portanto, foi administrada por gavagem uma solução contendo glicose (2mg/g de peso corporal) a 50% (1g/1mL) diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%), amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0 min (antes da injeção de glicose), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção da forma supracitada, durante a fase escura do ciclo claro/escuro, aproximadamente entre os ZT 12 e 14 em dias de alinhamento (coincidência).

### 3.5. Coleta de tecidos

Após o final do período de oito semanas, todos os animais foram colocados em jejum por 12 horas. Em seguida foram eutanasiados após administração de tiopental sódico (45 mg/kg) para coleta de sangue, hipotálamo, pâncreas, adrenal, tecido adiposo branco e fígado. As amostras de sangue foram centrifugadas em centrífuga refrigerada à 4°C e 4000 rpm, durante 15 minutos para coleta do plasma e logo após armazenado no freezer -80°C para posterior análise bioquímica. O pâncreas, a adrenal esquerda e o fígado foram pesados. Após a pesagem, apenas o fígado e o hipotálamo foram armazenados em freezer -80°C para posteriormente submetidos à técnica de Western Blotting e reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), os demais órgãos foram descartados.

Como dito anteriormente por Iglesia et al.(35), este protocolo experimental apresenta dois componentes do ritmo de atividade locomotora que são expressos simultaneamente nos animais (T22 e T24), portanto esses ritmos acabam coincidindo

em alguns dias e em outros não, provocando uma alternância constante. Iglesias et al separou o comportamento de um mesmo animal em quatro momentos distintos, porém em nosso estudo nos focamos as análises no momento de alinhamento ou também denominado como coincidência de atividade, que ocorre quando a atividade locomotora do animal está alta em ambos componentes rítmicos, ou seja, a predominância de sua atividade está na fase escura (fase de atividade).

Com base nessa definição, os dias para coleta de tecidos foram selecionados através da visualização individual dos actogramas e periodograma de cada animal. Nos dias selecionados os tecidos foram coletados 1h após a última transição da fase clara para a fase escura, entre os ZT 13 e 14 para CTR e ZT 12 e 13 para DSC, nos grupos CTR e DSC respectivamente.

### 3.6. Extração de proteína e Western Blotting

A análise de expressão de proteínas da via de sinalização de insulina no fígado foi realizada usando a técnica de Western Blotting. As amostras de fígado foram homogeneizadas posteriormente em tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil e 0,1mg ml<sup>-1</sup> aprotinina) a 4°C com três beads no Bead Ruptor 12 Homogeneizer OMNI (Omni International, Kennesaw, GA, EUA) operado em velocidade máxima por 30s. Os lisados foram centrifugados Eppendorf 5804R (Hamburgo, Alemanha) a 10500 rpm, a 4°C durante 15 min para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi usado para o ensaio.

O teor total de proteína foi determinado via biureto através do EPOCH, logo após o tampão Laemmli contendo 100 mM de ditiotreitol foi adicionado ao sobrenadante e as amostras foram aquecidas por 5 a 10 min (Laemmli, 1970). Em seguida, amostras com quantidades iguais de proteínas (70µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite em pó a 5% em temperatura ambiente por 1h30min e depois incubados *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: substrato de receptor de insulina 1 - IRS1 (sc-559), fosfoenolpiruvato carboxiquinase - PEPCCK (sc-271029) e glicose 6-fosfatase- G6Pase (sc-39815S) da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA); e anti-fosfo-Akt (#4060); fosfoinositídeo 3-quinase – PI3K (#4292) da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). O

gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase - GAPDH (sc-25778) da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA) foi usado como proteína constitutiva. Ao final do período, as membranas foram então incubadas por 2h com os anticorpos secundários específicos (*rabbit* ou *mouse*). As bandas foram detectadas pelo substrato de quimioluminescência peroxidase de rábano apriomarada (ECL) da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA) e então visualizadas e adquiridas pelo C-DiGit™ Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica relativa por meio do software FIJI (ImageJ, NIH, Cambridge, MA, EUA).

### 3.7. Extração de RNA e RT- qPCR

A análise de expressão gênica foi realizada via RT – qPCR. O RNA foi extraído usando procedimentos padrão. Os tecidos foram homogeneizados em 400µl de Trizol (Thermo Fisher Scientific), e o conteúdo de RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Um total de 3µg de RNA foi usado para a síntese de cDNA usando kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). As amostras de cDNA do fígado foram submetidas a uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando 60ng de cDNA e primers para IRS-1, PI3Kca, Akt, PTEN, Ppck, G6pc, PtPN1 e o primer para GAPDH foi utilizado como controle endógeno todos da TaqMan (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), e iTaq Universal Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) usados de acordo com a recomendação do fabricante. Cada reação de PCR foi realizada em duplicata. Água miliQ, em vez de cDNA, foi usada como controle negativo. Nas amostras de cDNA do hipotálamo utilizamos os primers iTaq Universal SYBR Green (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para quantificar a expressão dos genes relógio: Clock, Bmal1 e Per2 (Conforme Tabela 1). Os dados foram avaliados usando o software StepOne Software (Thermo Fisher Scientific), calculando  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen, 2001).

<b>Tabela 1. Conjunto de primers para genes relógios no tecido hipotalâmico de ratos</b>		
<b>Gene</b>	<b>Foward</b>	<b>Reverse</b>
Clock	5'-TCTCTTCCAAACCAGACGCC-3' Rato	3'-TGCGGCATACTGGATGGAAT-5' Rato
Bmal1	5'-TGGACTGCAACCGCAAGAG-3' Rato	3'-CCTTCCATGAGGGTCATCTTTG-5' Rato
Per2	5'-CCCATCCCACACTTGCCTC-3' Rato	3'-CACTGTGCCAGCCGGG-5' Rato

### 3.8. Peroxidação lipídica

Para a dosagem de peroxidação lipídica no fígado, foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estimativa de TBARS foi realizada espectrofotometricamente seguindo o método descrito por Ohkawa et al. (64), com algumas modificações. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico, ácido acético (pH 3,4) e SDS a 95°C por 60 min. O produto da reação, malondialdeído (MDA), foi lido à 532nm e sua concentração foi determinada baseada em uma curva padrão, na qual foi posteriormente normalizada pela quantidade de proteína (MDA em nmol/mg de proteína).

### 3.9. Proteína carbonilada (PC)

A quantificação de proteína carbonilada no fígado foram medidos seguindo o método descrito por Colombo et al. (65), com algumas modificações. As amostras foram incubadas com DNPH preparado em 2 mol/L HCl. A mistura foi mantida no escuro por 1h e agitada em vórtex a cada 15min. Tampão de desnaturação, etanol e hexano foram então adicionados a cada tubo e a mistura final foi agitada em vórtice por 40 segundos e centrifugada a 3000 rpm por 10min. O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol-acetato de etilo (1:1 v/v) e ressuspenso em tampão de desnaturação. A amostra foi agitada em vórtice por 5min e foi usada para medir a absorbância a 370nm. Os resultados são expressos como nmol de conteúdo de carbonilada/mg de proteína.

### 3.10. Atividade da superóxido dismutase e catalase

A atividade de superóxido dismutase (SOD-1) e catalase (CAT) no fígado foram determinadas espectrofotometricamente. Para SOD-1 o princípio do método é a capacidade da enzima superóxido dismutase de inibir a autoxidação da epinefrina. As amostras de tecido hepático foram incubados com bitartarato de epinefrina 60 mmol/L, e a intensidade da cor da amostra medida a 480nm, segundo o método de Misra e Fridovich (22) com algumas modificações. A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de SOD / mg de proteína.

A análise da atividade da CAT foi realizada através da decomposição do  $H_2O_2$  à 240nm de acordo com o método descrito por Aebi(66) com algumas modificações. As amostras de fígado foram incubadas com 86 mmol/L de  $H_2O_2$  e tampão de fosfato de sódio (pH 7,0). A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de CAT/mg de proteína. Um U de enzima decompôs assim um  $\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2/\text{min}$  a pH 7,0 a 25°C. A concentração de proteína total foi medida pelo método descrito por Bradford (24) usando BSA como padrão.

### 3.11. Análises Bioquímicas

Os marcadores bioquímicos para glicemia, colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade- LDL, lipoproteína de alta densidade – HDL, lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL, aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT, fosfatase, desidrogenase, lipase, albumina , proteínas Totais, bilirrubina direta e total foram medidos usando kits comerciais disponibilizados gratuitamente pela BioClin (Belo Horizonte, MG, Brasil) utilizando o plasma coletado ao final do protocolo após 12h de jejum, entre os ZT 13 e 14 para CTR e ZT 12 e 13 para DSC, nos grupos CTR e DSC respectivamente.

### 3.12. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm EPM$ ). A atividade locomotora foi plotada em actogramas pelo software *El Temps* para visualizar os componentes rítmicos e o regime de iluminação. O periodograma de Sokolove e Bushell (67) foi utilizado para detectar o ritmo da atividade locomotora e os dados fornecidos foram utilizados para elaborar a porcentagem de variância (V%). Calculamos a razão entre as variâncias do componente arrastado pela luz (LEC) e não-arrastado pela luz (NLEC) para cada sujeito (taxa de dessincronia), dados originados da porcentagem de variância do periodograma. Razões aproximadamente  $\approx 1$  indicam uma contribuição equilibrada dos componentes. Razões  $>1$  indicam dominância do componente LEC, enquanto razões  $<1$  indicam dominância do componente NLEC, nas comparações das médias dos grupos nos componentes LEC e NLEC, utilizamos teste t de Student, pois esses componentes são vistos apenas nos

dois grupos DSC. Através das análises do actograma e periodograma, um animal do grupo DSC RF foi retirado das análises subsequentes após não ser possível visualização dos padrões esperados neste protocolo DSC.

A análise dos dados iniciou com a realização do teste de Shapiro-Wilk para verificar a pressuposição de normalidade de todas variáveis analisadas, todos os dados apresentaram distribuição normal. Sendo assim, para comparação entre as médias dos grupos utilizamos o teste paramétrico ANOVA-Two Way (regime de iluminação x regime de alimentação) seguido de post-hoc de Tukey. Além disso, a ingestão alimentar e o oGTT foram analisados comparando também a área sob a curva (ASC) durante todo período do protocolo. O nível de significância mínimo estabelecido foi de  $p < 0,05$ . As análises e os gráficos foram realizados através do software GraphPad Prism (versão 8).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Atividade locomotora

Actograma e periodograma são gráficos individuais para cada animal utilizados para visualizar e analisar os parâmetros cronobiológicos da atividade locomotora, permitindo neste caso comprovar a dessincronização forçada nos animais. Apenas um animal não exibia dissociação dos osciladores e foi removido das análises. Na análise de periodograma observamos pico único nos grupo CTR AL (Figura 2. A) e RF (Figura 2. C). No entanto, dois picos foram observados nos grupos DSC AL (Figura 2. B) e RF (Figura 2. D).

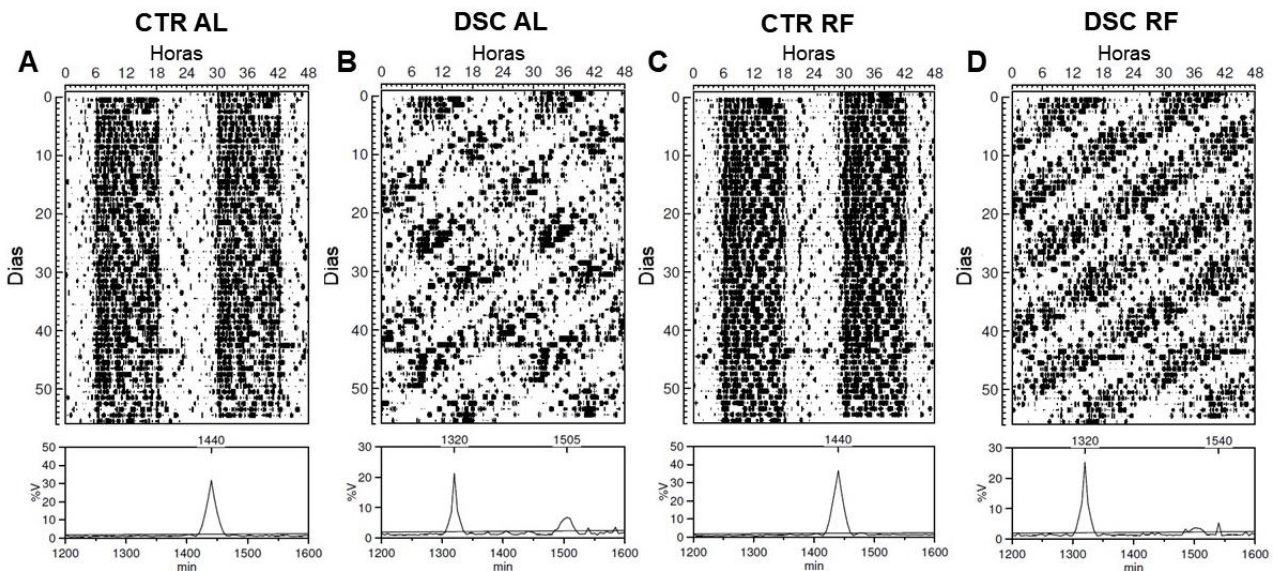


Figura 2. Efeitos da dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito sob a atividade locomotora. Actograma representativo em *double-plot* de um rato do grupo controle sob o regime de iluminação CE24 (12h:12h) *ad libitum* (A), um rato do grupo dessincronizado sob o regime de iluminação CE22 (11h: 11h) *ad libitum* (B); um rato do grupo controle sob o regime de iluminação CE24 (12h:12h) e alimentação em tempo restrito (C), um rato do grupo dessincronizado sob o regime de iluminação CE22 (11h: 11h) e alimentação em tempo restrito (D) durante oito semanas. O periodograma de cada animal representativo está abaixo de seu respectivo actograma (n = 4 - 6 animais por grupo).

A Figura 3. A, apresenta os resultados do somatório da atividade locomotora durante todo protocolo, ou seja, durante oito semanas, não sendo identificado diferenças significativas em nenhum grupo. No entanto, quando observamos a atividade locomotora separadamente entre as fases do CE, é possível visualizar que a predominância da atividade se encontra na fase escura para todos os grupos quando comparado a fase escura no mesmo grupo, exceto no grupo DSC AL (Figura 3.B).

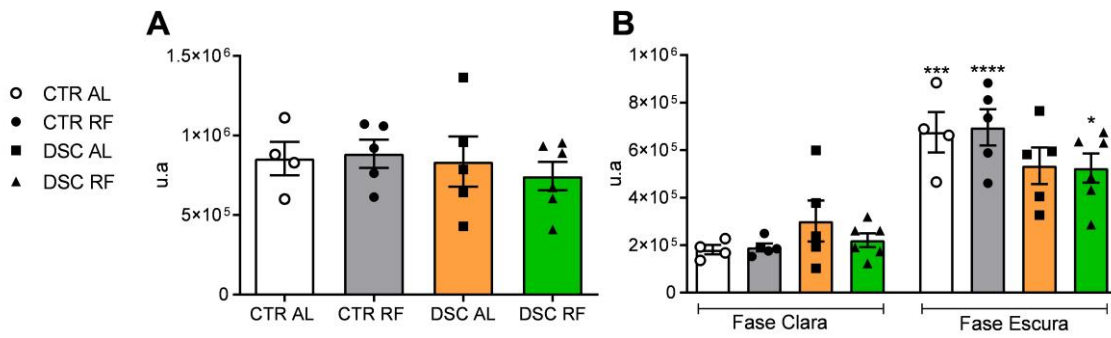


Figura 3. Efeitos da dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito sob a atividade locomotora. Somatório absoluto de atividade locomotora durante oito semanas (A) e total de atividade locomotora para cada fase separadamente do ciclo claro/escuro (B). A atividade locomotora foi detectada e registrada por sensor de movimento acoplado no software de acionamento programado - SAP. Os resultados são expressos como Média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$  indicam diferença significativa no teste Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey entre as fases clara e escura entre o mesmo grupo ( $n = 4 - 6$  animais por grupo).

O TRF não afetou a potência do ritmo de atividade nos grupos submetidos à CE24: CTR AL e CTR RF (Figura 4 e Figura 5.A). O grupo DSC RF mostra poder numericamente maior do componente LEC e menores de NLEC em comparação com DSC AL, mas não estatisticamente significativo (Figura 5. B e C). No entanto, a razão da % de variância (taxa de dessincronia) foi significativamente maior no grupo DSC RF (Figura 5.D).

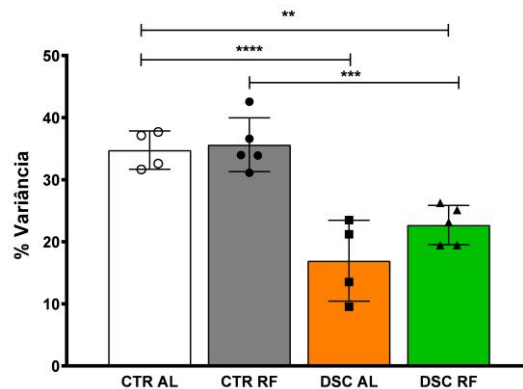


Figura 4. Variação do ritmo sincronizado com o ciclo claro-escuro. Valores obtidos por meio do periodograma de Sokolove-Bushell ( $T=1440$  min ou  $T=1320$  min). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Todos \* indicam  $P < 0,05$  no teste post-hoc de Tukey HSD após Two Way ANOVA, ( $n = 4 - 6$  animais por grupo).

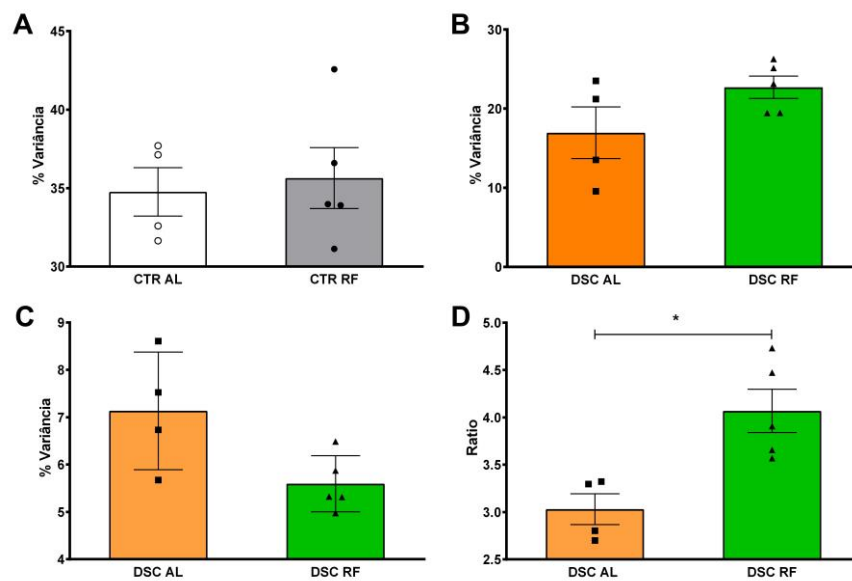


Figura 5. Variância do ritmo sincronizado com o ciclo claro-escuro dos grupos separadamente. Variação do ritmo no grupo CTR ad libitum e restrito (A), variação do ritmo sincronizado com o ciclo claro-escuro nos grupos DSC ad libitum e restrito (B), ritmo de corrida livre ou não sincronizado nos grupos DSC ad libitum e restrito (C) e relação de dessincronização DSC ad libitum e restrito (D). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Todos \* indicam  $p < 0,05$  no teste post-hoc de Tukey HSD após Two Way ANOVA, ( $n = 4 - 6$  animais por grupo).

## 4.2 Ingestão alimentar e massa corporal

Durante todo protocolo experimental, ou seja, oito semanas observamos que tanto CTR RF quanto DSC RF, ingerem mais ração que os animais *ad libitum* de seu respectivo grupo na fase escura do CE (Figura 6. A). Além disso, na fase clara a ingestão do grupo DSC AL é maior quando comparado aos animais do grupo CTR AL, somando uma média semanal de 59g a mais do que grupo CTR AL (Figura 6. B), porém não refletiu no consumo total deste grupo. No entanto, a média da ingestão total no grupo DSC RF está reduzida, diferindo-se num total de 17g quando comparado ao grupo CTR AL (Figura 6.C), refletido na evolução da massa corporal a partir da segunda semana quando comparado ao grupo CTR AL e DSC AL (Figura 6. D).

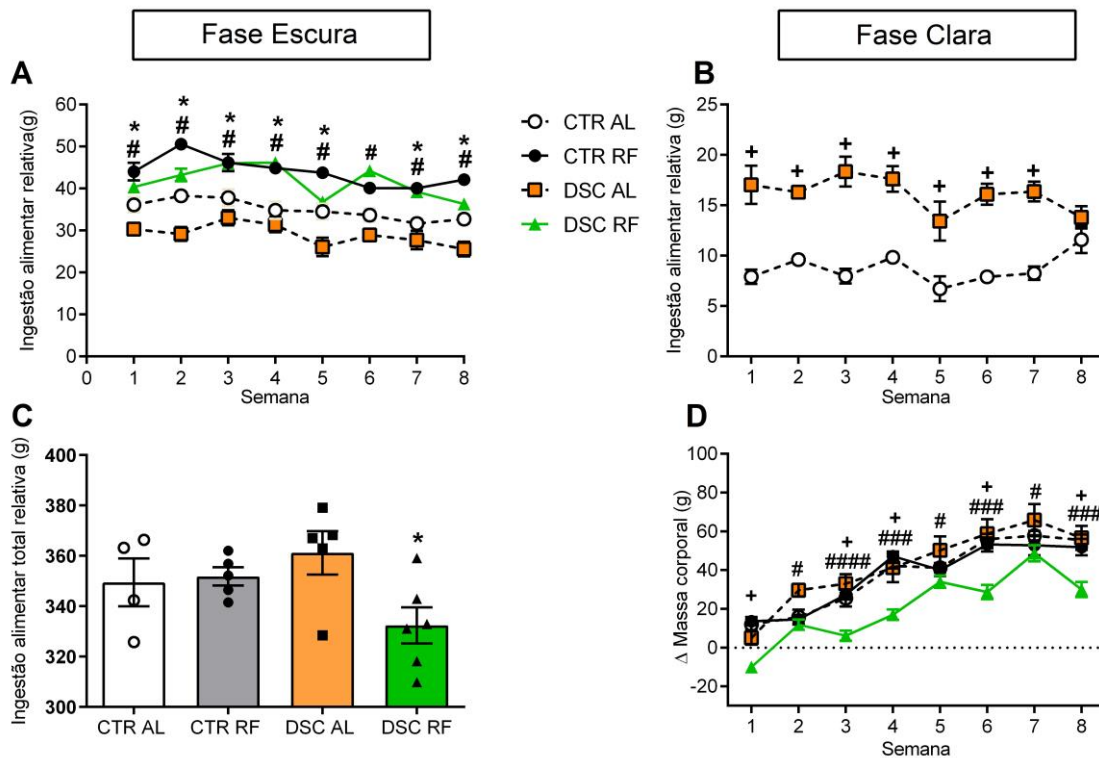


Figura 6. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na ingestão alimentar e na massa corporal durante oito semanas. Ingestão alimentar relativa na fase ESCURA (A) e CLARA (B) durante oito semanas. Consumo alimentar total relativo (C) e evolução da massa corporal (D). Os resultados são expressos como Média  $\pm$  EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. \*  $P < 0,05$  indica diferença significativa entre os grupos CTR AL. + $P < 0,05$  indica diferença significativa entre os grupos CTR AL. #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  e ###  $P < 0,001$  e ####  $P < 0,0001$  indica diferença significativa entre os grupos DSC quando comparado com o grupo DSC AL, ( $n = 4 - 6$  animais por grupo).

### 4.3 Homeostase da glicose

Não observamos diferenças significativas nas análises relacionadas à homeostase da glicose plasmática durante a oitava semana de protocolo experimental entre os pontos dos testes de tolerância à insulina (Figura 7.A) e tolerância oral à glicose (Figura 7.B). Nas análises de Kitt (Figura 7.C) e área sob a curva (Figura 7.D) também não identificamos nenhuma alteração significativa.

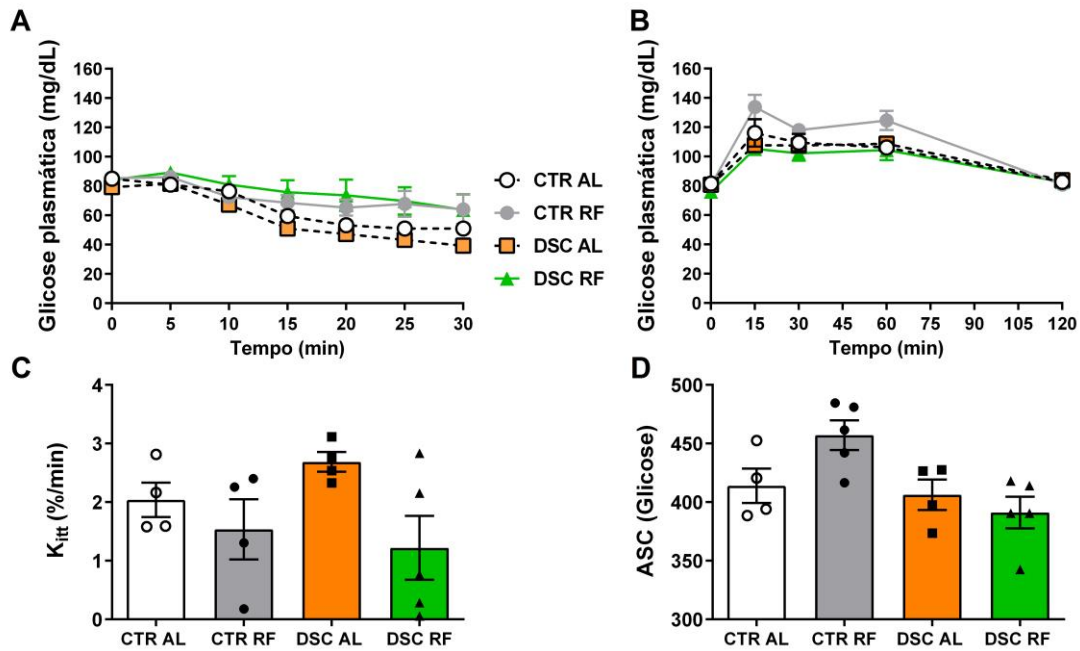


Figura 7. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na homeostase da glicose *in vivo* em dias de alinhamento (coincidência). Curva do teste de tolerância à glicose oral - GTT (A), área sob a curva (B), curva do teste de tolerância à insulina - ITT (C) e constante de decaimento da glicose - Kitt (D). Os resultados são expressos como Média  $\pm$  EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey, (n = 4 - 6 animais por grupo).

#### 4.4 Expressão gênica no fígado e no hipotálamo

Na Figura 8 abaixo, é apresentado a expressão dos genes relacionados à via da insulina no fígado. Os genes IRS-1 e PI3Kca (Figura 8. A, B e D) não apresentaram diferenças entre os grupos, porém observamos aumento nos níveis de mRNA de AKT (Figura 8.C) no grupo DSC RF. Na via da gliconeogênese a expressão gênica de G6Pc aumentou no grupo DSC AL (Figura 8.E), mas não há diferenças significativas na expressão de Pck1 (Figura 8.D) quando comparado ao grupo CTR AL. Além disso, PTEN e PTPN1 em ambos grupos DSC AL e RF também estão aumentados em relação aos grupos CTR AL (Figura 8. F e G).

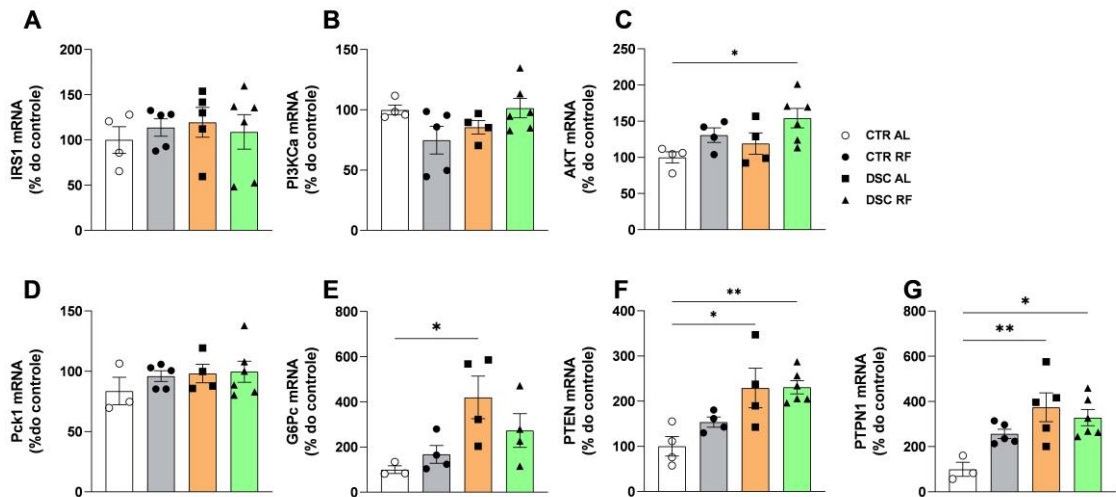


Figura 8. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica de genes envolvidos na homeostase glicêmica no fígado após 12 horas de jejum em dias de alinhamento (coincidência). Expressão gênica de mRNA de IRS1 (A), PI3KCa (B), AKT (C), Pck1 (D), G6Pc (E), PTEN (F) e PTPN1 (G). Os resultados são expressos como Média ± EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. \* P < 0,05 indica diferença significativa, \*\*P < 0,01, (n = 4 - 6 animais por grupo).

Genes de neuropeptídeos relacionados à saciedade e o hormônio liberador de corticotrofina demonstraram diferenças significativas com associação da alimentação em tempo restrito. O tempo de alimentação restrito na fase escura aumentou a expressão gênica de NPY e Cartpt no grupo CTR-RF. No entanto, no grupo DSC-RF a dessincronização circadiana parece eliminar esse aumento quando associado à alimentação em tempo restrito, em comparação ao grupo CTR-AL e DSC-AL (Figura 9. A-B). Porém, a expressão gênica do gene CRH demonstrou aumento significativo em todos os grupos experimentais quando comparado ao grupo CTR-AL (Figura 9.C).

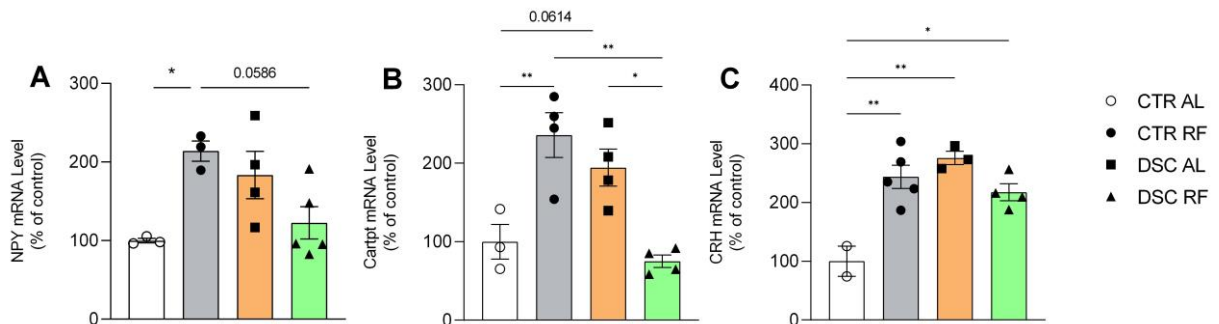


Figura 9. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica de NPY, CARTpt e CRH no hipotálamo após 12 horas de jejum em dias de alinhamento (coincidência). Expressão gênica de mRNA de NPY (A), Cartpt (B) e CRH(C). Os resultados são expressos como Média ± EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. \* P < 0,05 indica diferença significativa, \*\*P < 0,01, (n = 4 - 6 animais por grupo).

A expressão gênica dos genes relógios Bmal1, Clock1 e Per2 no hipotálamo no início da fase escura (CTR ZT: 13-14; DSC ZT: 12-13) não

demonstraram diferenças significativas em nenhuma das condições apresentadas, conforme podemos observar na Figura 10.

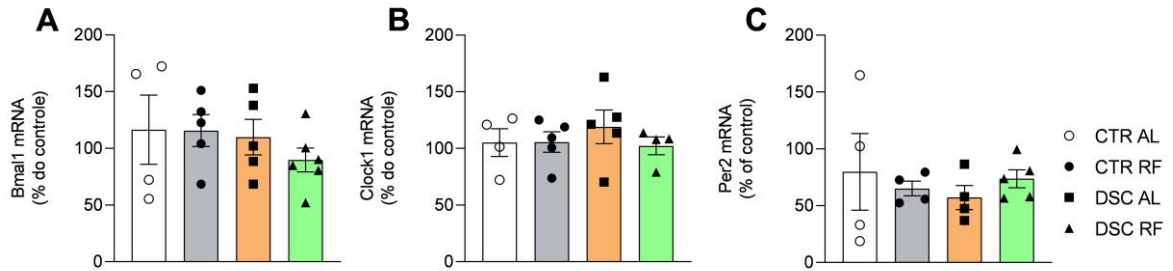


Figura 10. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão gênica dos genes relógios no hipotálamo em dias de alinhamento (coincidência). Expressão gênica de mRNA de Bmal1(A), Clock1 (B) e Per2(C). Os resultados são expressos como Média  $\pm$  EPM após Two Way ANOVA, (n = 4 - 6 animais por grupo).

#### 4.5 Expressão de proteínas no fígado

A Figura 11 apresenta a expressão das proteínas na via de sinalização de insulina no fígado. Observamos aumento na expressão de PI3K apenas no grupo DSC AL quando comparado ao grupo CTR AL (Figura 11.B), observou-se reversão desse aumento no grupo DSC RF. Além disso, o grupo DSC RF apresentou redução nos níveis de f-Akt quando comparada ao grupo CTR AL (Figura 11.C). Não observamos diferenças estatísticas na expressão das enzimas envolvidas na via da gliconeogênese no fígado - PEPCK e G6pase (Figura 11. D e E).

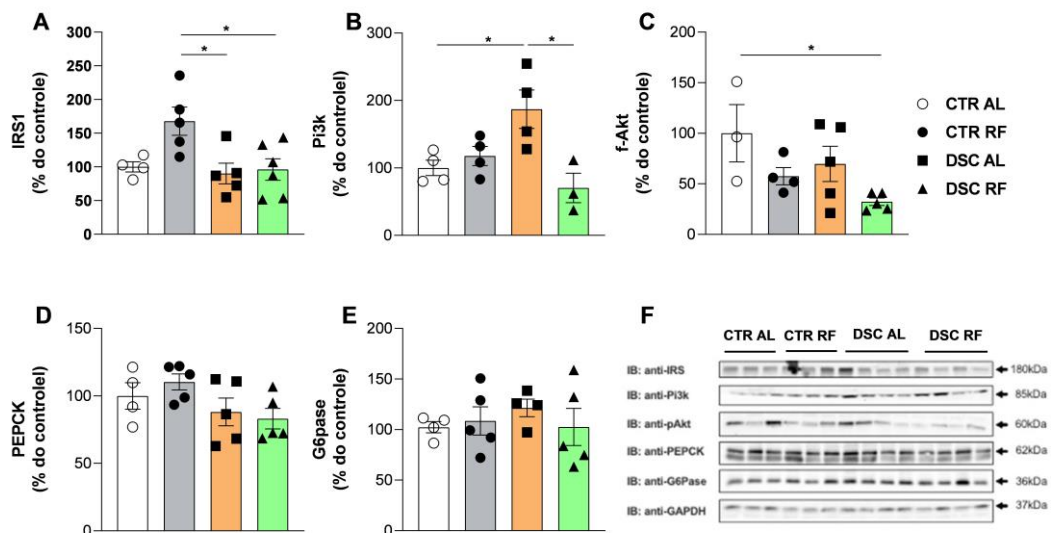


Figura 11. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito na expressão de proteínas envolvidas na homeostase glicêmica após 12 horas de jejum em dias de alinhamento (coincidência). Expressão nos níveis de proteína do IRS1(A), Pi3K(B), f-Akt(C), PEPCK (D) e G6Pase (E). Figuras representativas das membranas de acrilamida utilizadas (F). Os resultados são expressos como Média  $\pm$  EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. \* P < 0,05 indica diferença significativa, (n = 4 - 6 animais por grupo).

## 4.6 Estresse Oxidativo no fígado

Nos grupos DSC, apresentaram aumento significativo dos biomarcadores de estresse oxidativo - peroxidação lipídica e proteína carbonilada, independente do regime alimentar, comparado aos grupos CTR AL e RF (Figura 12.B). Além disso, identificamos aumento na atividade de SOD-1 nos grupos DSC AL e RF (Figura 12.C), porém, este aumento foi observado apenas no grupo DSC RF na atividade da enzima CAT quando comparado ao grupo CTR AL (Figura 12.D).

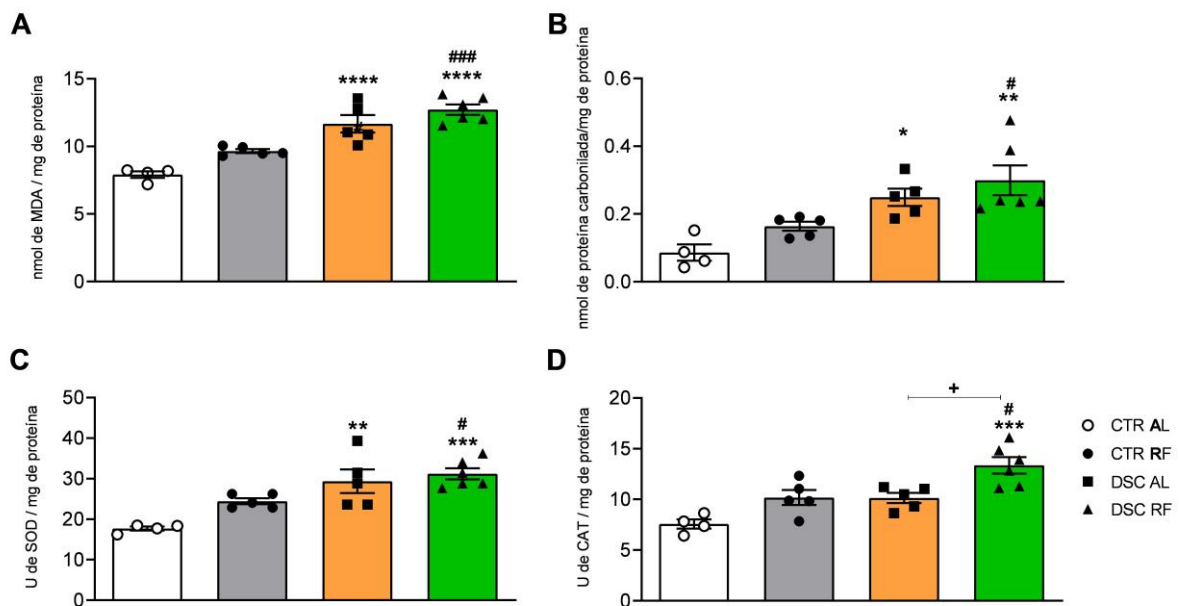


Figura 12. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob enzimas e biomarcadores envolvidos no sistema antioxidante no fígado em dias de alinhamento (coincidência). Efeito sob os níveis de peroxidação lipídica (A), proteína carbonilada (B), atividade da superóxido dismutase (C) e catalase (D). Os resultados são expressos como Média ± SEM. (n = 4 - 6 animais por grupo após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e \*\*\*\* P < 0,0001, quando comparado com o grupo CTR AL. # P < 0,05, ## P < 0,01 e ### P < 0,001, quando comparado com o grupo CTR RF. + P < 0,05, quando comparados apenas entre os grupos DSC AL e DSC RF (n = 4 - 6 animais por grupo).

## 4.7 Análises bioquímicas plasmáticas e massa dos órgãos

A Tabela 2 apresenta o resultado das análises bioquímicas plasmáticas demonstrando poucas alterações significativas, sendo uma delas os valores de glicemia, com diminuição no grupo DSC AL comparado ao grupo CTR AL e DSC RF. Os valores de triglicerídeos plasmáticos diminuíram apenas no grupo CTR RF quando comparado ao grupo CTR AL. Nas análises referentes à função hepática a enzima fosfatase apresentou diminuição em ambos grupos submetidos à dessincronização

circadiana forçada DSC AL e DSC RF quando comparado ao grupo CTR AL. No entanto, a enzima amilase aumentou no grupo DSC RF quando comparado ao grupo DSC AL.

**Tabela 2. Análises bioquímicas plasmática de ratos Wistar em jejum (12h) em dias de alinhamento (coincidência), após oito semanas de dessincronização forçada e alimentação em tempo restrito**

PARÂMETROS	CTR AL	CTR RT	DSC AL	DSC RF
Massa corporal final (g)	379±4	357±7	371±13	347±8
Glicemia mg/dL	180.1±64	164.5±2.3	141.7±4 <sup>a</sup>	175.5±5.2 <sup>b</sup>
Triglicerídeos mg/dL	35.9±8.4	13.6±1.3 <sup>a</sup>	24.2±3.8	27±3.4
Colesterol g/dL	39.5±3.1	36.9±5.4	41.4±4.1	42.8±5.4
HDL mg/dL	20.4±1.1	16.3±0,4	19.3±2.4	19.7±1.8
LDL mg/dL	11.9±3.1	17.9±5.5	19.3±6.2	17.8±5.5
VLDL mg/dL	7.1±1.6	2.7±0,2	5.9±1.2	6.3±1
AST (UI/L)	81.1±8.8	76.35±2.5	71.2±9.8	74.47±10.3
ALT (u/l)	96.1±4.6	75.98±9.8	96.7±7.3	81.1±4.6
Amilase	459.9±21.4	448.1±10.78	404.4±17.4	490.8±28.8 <sup>b</sup>
Fosfatase (U/L)	446.7±40.6	349.4±37.6	304.3±11.4 <sup>a</sup>	313.9±20 <sup>a</sup>
Desidrogenase (U/L)	229.4±32	277.1±87.6	319.9±85.2	221.6±28.9
Lipase (U/L)	31.3±12.4	32.1±10.6	11.2±1.9	26.4±8.1
Albumina (g/dL)	2.65±0.07	2.59±0.08	2.57±0.07	2.57±0.07
Proteínas Totais	6.12±0.26	5.73±0.10	5.74±0.13	5.66±0.15
Bilirrubina Total	0.32±0.04	0.34±0.02	0.43±0.04	0.45±0.04
Bilirrubina Direta	0.13±0.05	0.22±0.05	0.17±0.11	0.19±0.13

Resultados são representados como Média ± EPM após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. <sup>a</sup> P <0.05 vs CTR AL, <sup>b</sup> P <0.05 vs DSC AL ANOVA Two Way. LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade; VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade; AST– aspartato aminotransferase; ALT– alanina aminotransferase (n = 4 - 6 animais por grupo).

Não encontramos diferenças significativas na massa absoluta do fígado, pâncreas e glândula adrenal em nenhum grupo experimental (Figura 13). De forma semelhante, as condições experimentais não interferiram na distribuição corporal do tecido adiposo branco: retroperitoneal, mesentérica, inguinal e epididimal ou na sua somatória absoluta e relativa em nenhum dos grupos (Figura 14).

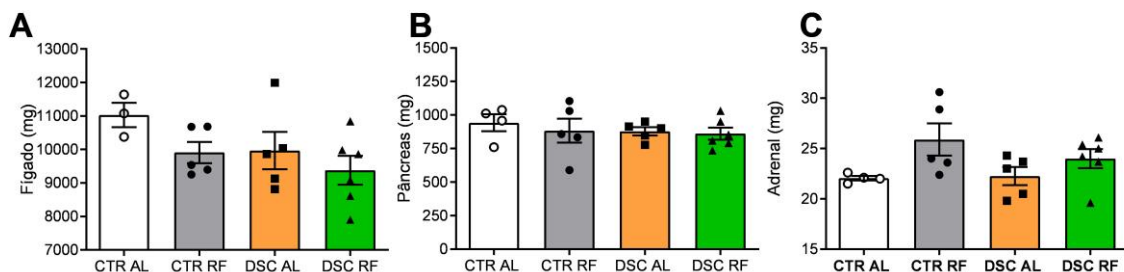


Figura 13. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob a massa dos órgãos. Massa absoluta do fígado (A), pâncreas (B) e glândula adrenal (C). Os resultados são expressos como Média ± SEM após Two Way ANOVA (n = 4 - 6 animais por grupo).

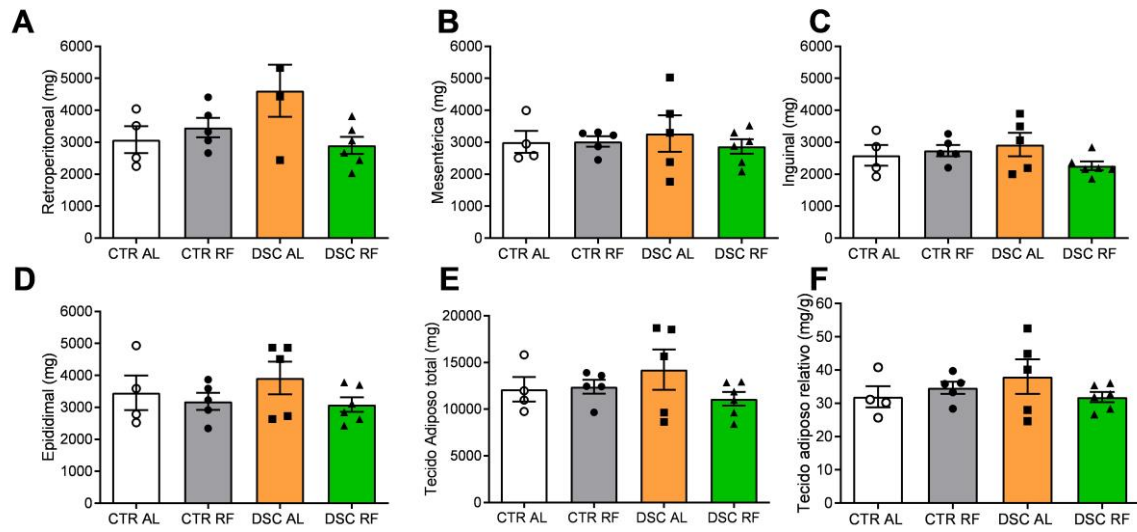


Figura 14. Efeitos da dessincronização circadiana e alimentação em tempo restrito sob o tecido adiposo branco. Massa do tecido adiposo na região retroperitoneal (A), mesentérica (B), inguinal (C), epididimal (D), somatória do tecido adiposo total absoluto (E) e relativo (F). Os resultados são expressos como Média  $\pm$  SEM. (n = 4 - 6 animais por grupo) após Two Way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a exposição crônica ao regime de luminosidade simétrica CE22 associado ao TRF, promove diferentes desfechos na atividade locomotora, no metabolismo e no sistema de defesa antioxidante hepático. Ambos grupos de animais submetidos à dessincronização circadiana forçada, DSC AL e DSC RF, manifestaram simultaneamente dois ritmos locomotores: um componente arrastado pela luz (LEC) e outro componente não arrastado pela luz (NLEC). O TRF aumentou a robustez do LEC no grupo DSC RF comparado ao grupo DSC AL, porém TRF não afetou o período NLEC, corroborando com estudos anteriores (68,69). Sabemos que neste protocolo o LEC não ocorre devido ao mascaramento (13,69).

Diferente de outros estudos que utilizaram o TRF, não encontramos diferenças significativas na massa corporal absoluta ou no tecido adiposo branco, apenas na evolução do peso. A imposição de TRF em animais DSC resultou em perda significativa na primeira semana permanecendo menor durante todo o protocolo no grupo DSC RF quando comparado ao CTR AL e entre DSC AL (Figura 6.D). Vale ressaltar que, diferentemente da nossa metodologia, em alguns estudos a disponibilidade de alimentos restringiu-se por tempo inferior, aproximadamente 2-4h, ocasionando diminuição acentuada na ingestão calórica, ou seja, a diminuição na massa corporal é principalmente pela quantidade de ingestão calórica e não pela janela de alimentação (39,70).

Além disso, Arble *et al* (40) mostraram que o TRF aumentou a massa corporal de camundongos com acesso alimentar restrito à fase clara, ou seja, na fase atípica de alimentação de roedores. No entanto, a dieta fornecida era hiperlipídica – DRG, diferentemente do nosso estudo, pois ofertamos dieta padrão (Presence®, São Paulo, SP, Brasil) para todos grupos. Além disso, não avaliamos os efeitos da disponibilidade de alimentos apenas na fase clara. Apesar disso, identificamos aumento na ingestão do grupo DSC AL durante a fase clara (Figura 6.B), quando comparado ao grupo CTR AL. Quando comparamos as médias dos grupos referentes a ingestão total (somatório das duas fases do CE), observamos redução apenas no grupo DSC RF (Figura 6.C). Contudo, não observamos alterações significativas nas

medidas do tecido adiposo total ou separadamente (retroperitoneal, mesentérica, inguinal e epididimal) em nenhum grupo experimental (Figura 14).

Outro fator importante ao compararmos nossos resultados com publicações anteriores pode ser esclarecido pela diferença genética entre as cepas utilizadas, já que para o mesmo procedimento podemos encontrar respostas diferentes quando as cepas se diferem (70).

Ao analisar os neuropeptídeos envolvidos no comportamento alimentar, observamos que tanto os níveis de CART quanto de NPY estão aumentados no grupo CTR RF. Podemos inferir que o aumento do NPY representa um mecanismo fisiológico de antecipação ao horário da oferta de alimentos, visto que a coleta do tecido analisado ocorreu no início da fase escura, momento que o alimento era disponibilizado. Curiosamente, a sincronização não-fótica através dos alimentos torna os roedores mais ativos aproximadamente uma hora antes da disponibilidade de alimentos, bem como aumenta os níveis de corticosterona plasmáticos(39)

Sabe-se que o peptídeo CART também está relacionado a regulação do peso corporal através do comportamento alimentar, como observado por Lambert (71), após administração intracerebroventricular (icv) isolada de CART, a ingestão alimentar em ratos foi inibida. A administração subsequente de NPY (icv) também foi capaz de reduzir a ingestão. Essa interação funcional entre NPY e CART foram sugeridas primeiramente por Lambert após realização de microscopia de luz em seções duplamente imunomarcadas para imunorreatividade de NPY e CART no PVN, que apresentou varicosidades positivas para NPY ao redor dos corpos celulares positivos para CART.

Sugerimos então, que o aumento simultâneo do peptídeo CART e do NPY no grupo CTR RF, poderia estar relacionado ao controle fino do comportamento alimentar, estimulando a saciedade e equilibrando a ingestão calórica. Em nosso estudo, parece evitar o aumento da ingestão calórica, apesar do TRF. Apesar de não mensurar os valores séricos de leptina em nosso estudo, a literatura demonstrou que CART é ativado por aumento dos níveis de leptina (72) e a supressão da ingestão alimentar mediada pela leptina é controlada por uma redução equilibrada e indução de NPY e CART, respectivamente.

No grupo DSC RF houve diminuição na ingestão alimentar total que refletiu conseqüentemente na evolução da massa corporal neste grupo. No entanto, não há diferenças significativas nos níveis de NPY e CART. Em nossos achados, a

dessincronização circadiana parece perturbar a interação desses neuropeptídeos nos grupos DSC AL e DSC RF afetando o comportamento alimentar, demonstrando que os níveis desses neuropeptídeos são dependentes da condição alimentar e do regime de iluminação que o animal se encontra.

Foi mostrado anteriormente neste mesmo modelo animal, que o ritmo e os níveis de corticosterona plasmática estão alterados e difere nos dias de alinhamento e desalinhamento. Além disso, especula-se que esses efeitos estejam relacionados a sensibilidade adrenal ao ACTH, pois as alterações entre corticosterona e ACTH não se correlacionaram (73). Por outro lado, o aumento na expressão gênica de CRH nos grupos DSC AL e RF neste estudo, associado ao aumento da zona fasciculada do córtex da adrenal em animais DSC em nossos estudos anteriores (12), nos permitem inferir um possível mecanismo de compensação para normalização desses níveis plasmáticos.

A produção adrenal de glicocorticoides é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e a produção de CRH é de extrema importância para sua liberação(74). Além disso, a liberação de corticosterona (roedores) é rítmica com pico durante o início da fase escura, ou seja, fase ativa em animais noturnos em situações normais, aumentando sua liberação em condições de estresse fisiológico.

Por outro lado, também sugerimos que a expressão gênica de CRH no hipotálamo se elevou para aumentar os níveis de corticosterona circulante preparando o organismo para receber o alimento, pois os glicocorticoides são hormônios vitais e com multitarefas fisiológicas, incluindo a regulação da glicose. Além disso, os glicocorticóides possuem um ritmo circadiano com pico no início da fase escura em roedores (75–77). De maneira semelhante, o TRF em outro modelo animal tornou os roedores mais ativos aproximadamente uma hora antes da disponibilidade de alimentos, assim como aumentou os níveis de corticosterona plasmáticos(39,70).

As pistas ambientais do ciclo claro/escuro, ou seja, presença ou ausência de luz, são recebidas no SCN através do TRH e projeta-se para alguns núcleos do hipotálamo, dentre eles o núcleo paraventricular (PVN), envolvido na síntese de glicocorticoides (37,38). Portanto, o desalinhamento circadiano através do fotoperíodo além de provocar estresse fisiológico, promove dissociação do SCN ocasionando rupturas de alguns ritmos hormonais, dentre eles a liberação de glicocorticoides, provavelmente pela via SCN-PVN.

Apesar disso, o protocolo de DSC e o TRF parece não interferir diretamente na homeostase da glicose (Figura 7). Contudo, nos animais submetidos apenas à DSC os níveis séricos de glicose estavam reduzidos, porém a associação com TRF evitou essa redução, como observado no grupo DSC RF (Tabela 1). Já no grupo submetido apenas ao TRF os níveis de triglicérides reduziram (Tabela 2). Nas análises de lipidograma: colesterol total, HDL, LDL e VLDL não diferiram em nenhum dos grupos submetidos ao CE22 (Tabela 2).

A partir das análises da expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de insulina via PI3K/AKT no fígado, identificamos aumento da PI3K no grupo DSC AL (Figura 9.B) quando comparada ao grupo CTR AL, e a associação com TRF evitou esse aumento no grupo DSC RF, diminuindo a expressão de f-AKT neste grupo DSC RF (Figura 9.C). Em contrapartida, o aumento na expressão gênica da Akt total no grupo DSC RF (Figura 8.C) parece ser um mecanismo compensatório para elevar os níveis dessa proteína.

Identificamos aumento na expressão gênica do PTEN e PTPN1 em ambos grupos DSC AL e DSC RF (Figura 8. F e G), nos permitindo inferir que a DSC ocasiona desajustes relacionados à sensibilização da insulina e o TRF não é capaz de reverter essa situação. Além disso, esses aumentos podem se relacionar à diminuição na expressão da proteína fAkt no fígado. É bem conhecido que a modulação da hiperglicemia e da resistência à insulina é influenciada pelo PTEN (78) através de seu papel negativo sob a sinalização da insulina, pois sua redução ou inibição melhora a sensibilidade à insulina. (79,80).

Por outro lado, as proteínas FoxO são outro alvo da AKT, incluindo inibição direta de Forkhead box 01 (FoxO1), envolvidas na regulação da expressão dos genes fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) envolvidos no metabolismo da glicose (81–83). Neste estudo não investigamos a expressão das proteínas FoxO, mas analisamos G6Pase e PEPCK, envolvidos no aumento da gliconeogênese. A expressão gênica de G6Pase está aumentada apenas no grupo DSC AL (Figura 8.E), porém não há diferenças significativas nos valores da expressão da proteína dessa enzima neste grupo (Figura 11.E).

Com base nesses resultados, o TRF parece evitar o aumento na expressão gênica de G6Pase em animais submetidos neste modelo de DSC. Além disso, poderia reverter o aumento da expressão da proteína PI3K, diminuindo conseqüentemente os níveis da f-AKT no grupo DSC RF, sem alterar os níveis do substrato do receptor de

insulina-1 (IRS1). O tratamento isolado com TRF não altera a cascata de sinalização da via da insulina no fígado quando comparado com CTR AL e mantém a homeostase da glicose neste grupo.

O reestabelecimento da homeostase, bem como sua manutenção envolvem diversas vias por meio de circuitos sobrepostos. Neste estudo, avaliamos apenas uma via envolvida na homeostase da glicose. Apesar de não avaliar outras vias da homeostase da glicose, sugerimos que diferentes vias aferentes e outros neurotransmissores hipotalâmicos podem estar envolvidos na mediação e regulação da gliconeogênese. Além disso, modificações pós-traducionais desempenham papéis importantes na expressão de proteínas e na modulação dos ritmos biológicos (84,85)

Foi demonstrado que TRF atenua os prejuízos na homeostase da glicose, ganho de peso e esteatose hepática ocasionados pela DRG na fase clara (40,86,87), apesar disso alguns de nossos resultados do grupo DSC RF não apresentam atenuação ou reversão dos efeitos ocasionados apenas pela dessincronização circadiana, grupo DSC AL. Concluimos que a janela alimentar, possui maior influência e/ou benefícios em organismos prejudicados com alto teor de gordura na dieta, pois a ingestão de lipídios na fase ativa de roedores permite melhor adequação ao seu metabolismo.

A maioria dos estudos investigando efeitos sob expressão de genes do relógio no hipotálamo envolvendo sincronizadores não-fóticos, como o arrastamento alimentar, utilizou TRF com acesso restrito à poucas horas diárias e durante a fase clara, resultando em ingestão hipocalórica e alterações na organização temporal dos osciladores periféricos em roedores (88). No entanto, a disponibilidade de alimento apenas na fase escura não interfere significativamente a expressão gênica do SCN (89).

Houve muitas limitações no que se refere à investigação da expressão gênica dos osciladores centrais e periféricos em nosso estudo. A primeira limitação está no fato de não realizarmos dissecação do SCN para análises específicas dos osciladores centrais, além disso exploramos apenas um ponto, não sendo possível acompanhar o ritmo.

Não detectamos diferenças na expressão gênica dos principais genes relógios do sistema de temporização: Bmal1, Clock e Per2 no hipotálamo. Corroborando, com estudos anteriores que demonstraram que o TRF não afeta a fase do marcapasso SCN, mas é um forte Zeitgeber para os osciladores circadianos

periféricos (90). Essa foi nossa segunda limitação, pois não avaliamos a expressão gênica dos osciladores periféricos, tendo em vista a natureza multioscilar do sistema de temporização. Com base em nossos resultados, é possível que outros componentes rítmicos do sistema de temporização circadiano possam ser alterados ou interrompidos como resultado do TRF, portanto vale a pena examinar esses osciladores em estudos futuros.

Por último, investigamos os efeitos no sistema antioxidante. Analisamos primeiramente as principais enzimas do sistema antioxidante: a superóxido dismutase – SOD-1, que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (91) e a catalase – CAT, uma hemoproteína que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (92). A atividade da CAT (Figura 12) aumentou apenas no grupo DSC RF. No entanto, a atividade de enzima SOD-1 e dos biomarcadores de estresse oxidativo: TBARS e a proteína carbonilada estavam todos aumentados em ambos grupos DSC AL e RF (Figura 12). Contudo, ao comparamos os níveis apenas entre os grupos DSC eles não se diferem, portanto o TRF não é capaz de atenuar os efeitos na atividade redox de um organismo submetido à dessincronização interna forçada.

Embora não tenhamos mensurado melatonina plasmática, sugerimos que o aumento do estresse oxidativo observado no tecido hepático está parcialmente relacionado a níveis reduzidos de melatonina, pois mudanças no fotoperíodo afetam tais concentrações plasmáticas. Sabe-se que a melatonina possui papel cronológico, marcando o início da fase escura, e além disso possui papel antioxidante, apesar de pouco esclarecido (93–95).

Além disso, um estudo demonstrou que CART protege o mtDNA após indução de  $H_2O_2$  (96). Sugerimos que o aumento observado dos níveis de CART no grupo CTR RF (Figura 9), estão relacionados parcialmente ao combate de radicais livres promovendo o equilíbrio no sistema antioxidante desse grupo. No entanto, a dessincronização circadiana perturba essa interação, e apesar do aumento da expressão gênica de CART no grupo DSC AL, não foi suficiente para manter o equilíbrio das enzimas e biomarcadores do sistema antioxidante. Por outro lado, o TRF atenuou a expressão gênica de CART, mas em contrapartida elevou ainda mais o estresse oxidativo (Figura 12).

Refutamos nossa hipótese inicial na maior parte dos parâmetros analisados, pois o TRF não atenuou os prejuízos ocasionados pela dessincronização circadiana.

Sabe-se que o arrastamento da atividade locomotora neste modelo promove a alternância em momentos de alinhamento (onde ambas as fases de atividade coincidem) e desalinhamento da atividade locomotora (onde a fase de atividade de um ritmo termina quando a fase de atividade de o outro começa) (35). Portanto, nossa tentativa de coincidir a alimentação e a vigília adaptando apenas a disponibilidade de alimentos à fase escura, parece intensificar alguns efeitos, pois não levou em consideração essa alternância e afetou principalmente o sistema antioxidante e o metabolismo hepático.

## 6. CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos achados demonstram TRF não afetou a potência do ritmo de atividade locomotora nos grupos submetidos à CE24: CTR AL e CTR RF. No entanto, aumentou a taxa de dessincronia no grupo DSC RF indicando dominância do componente LEC. A DSC ou o TRF separadamente não altera a ingestão total ou a massa corporal, mas a associação de ambos (grupo DSC RF) promoveu menor ingestão alimentar total, refletindo na evolução da massa corporal, mas não na distribuição do tecido adiposo branco.

O TRF promove aumento significativo de importantes mediadores centrais da ingestão de alimentos: NPY e CART, enquanto a associação de TRF com a DSC abole esse efeito.

A dessincronização forçada promove maior expressão gênica de PTEN, PTPN1 e G6Pase no fígado, porém o TRF é capaz de reverter os efeitos apenas na G6Pase. A DSC altera a cascata da sinalização de insulina via PI3K/AK, aumentando a expressão da proteína PI3K, sendo revertido quando associado com TRF, porém ocasiona conseqüentemente diminuição acentuada na expressão proteica de fAKT no grupo DSC RF.

Pela primeira vez, nossos resultados demonstraram que esse modelo animal de dessincronização circadiana afeta significativamente o sistema antioxidante.

Portanto, levantamos preocupações sobre os efeitos à longo prazo das alterações metabólicas e do desequilíbrio no sistema antioxidante na fisiologia de indivíduos submetidos ao desalinhamento circadiano crônico por tempo indeterminado, característica do trabalho por turnos, tornando o fotoperíodo e a exposição à luz artificial um alvo interessante para intervenções.

Além disso, futuros estudos poderão investigar se os prejuízos observados são reflexos de efeito primário ou secundário, ou seja, se provém diretamente da perturbação cíclica ou da modulação nas vias estudadas.

## REFERÊNCIAS

1. Knutsson A, Jonsson BG, Akerstedt T, Orth-Gomer K. INCREASED RISK OF ISCHAEMIC HEART DISEASE IN SHIFT WORKERS. *The Lancet*. 1986;328(8498).
2. Haus E, Smolensky M. Biological Clocks and Shift Work: Circadian Dysregulation and Potential Long-term Effects. *Cancer Causes & Control*. 2006 May;17(4):489–500.
3. Salgado-Delgado R, Ángeles-Castellanos M, Buijs MR, Escobar C. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. 2008 Jun;154(3):922–31.
4. Morris CJ, Purvis TE, Mistretta J, Hu K, Scheer FAJL. Circadian Misalignment Increases C-Reactive Protein and Blood Pressure in Chronic Shift Workers. *J Biol Rhythms*. 2017 Apr 27;32(2):154–64.
5. Alibhai FJ, Tsimakouridze E v., Reitz CJ, Pyle WG, Martino TA. Consequences of Circadian and Sleep Disturbances for the Cardiovascular System. Vol. 31, *Canadian Journal of Cardiology*. 2015.
6. Bray MS, Young ME. Diurnal variations in myocardial metabolism. Vol. 79, *Cardiovascular Research*. 2008.
7. Guo Y, Liu Y, Huang X, Rong Y, He M, Wang Y, et al. The Effects of Shift Work on Sleeping Quality, Hypertension and Diabetes in Retired Workers. *PLoS One*. 2013 Aug 16;8(8):e71107.
8. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB. Rotating Night Shift Work and Risk of Type 2 Diabetes: Two Prospective Cohort Studies in Women. *PLoS Med*. 2011 Dec 6;8(12):e1001141.
9. Sun M, Feng W, Wang F, Li P, Li Z, Li M, et al. Meta-analysis on shift work and risks of specific obesity types. *Obesity Reviews*. 2018 Jan;19(1):28–40.
10. Thosar SS, Butler MP, Shea SA. Role of the circadian system in cardiovascular disease. Vol. 128, *Journal of Clinical Investigation*. 2018.
11. Guerrero-Vargas NN, Espitia-Bautista E, Escalona R, Lugo-Martínez H, Gutiérrez-Pérez M, Navarro-Espíndola R, et al. Timed restricted feeding cycles drive daily rhythms in female rats maintained in constant light but only partially restore the estrous cycle. *Front Nutr*. 2022 Sep 20;9.
12. de Oliveira IGB, Ferreira MD, Lopes PR, Campos DBT, Ferreira-Neto ML, Santos EHR, et al. Forced internal desynchrony induces cardiometabolic alterations in adult rats. *Journal of Endocrinology*. 2019;242(2).
13. Campuzano A, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A. Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol Behav*. 1998;63(2).
14. Lund J, Arendt J, Hampton S, English J, Morgan L. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *Journal of Endocrinology*. 2001 Dec 1;171(3):557–64.

15. Morgan L, Hampton S, Gibbs M, Arendt J. Circadian Aspects of Postprandial Metabolism. *Chronobiol Int.* 2003 Jan 7;20(5):795–808.
16. Al-Naimi S, Hampton SM, Richard P, Tzung C, Morgan LM. Postprandial Metabolic Profiles Following Meals and Snacks Eaten during Simulated Night and Day Shift Work. *Chronobiol Int.* 2004 Jan 7;21(6):937–47.
17. Cannon WB. ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiol Rev.* 1929 Jul 1;9(3):399–431.
18. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002 Aug;418(6901):935–41.
19. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. Vol. 35, *Annual Review of Neuroscience.* 2012.
20. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties. Vol. 72, *Annual Review of Physiology.* 2009.
21. Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 2002 Jul 24;309(1):89–98.
22. Halberg F. Chronobiology in 1975. *Chronobiologia.* 3(1):1–11.
23. Stephan FK, Zucker I. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1972 Jun;69(6):1583–6.
24. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972 Jul;42(1):201–6.
25. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science (1979).* 1990 Feb 23;247(4945):975–8.
26. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. In 2011. p. 175–230.
27. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. Vol. 72, *Annual Review of Physiology.* 2009.
28. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 1972;146(1).
29. van Gelder RN. Recent Insights into Mammalian Circadian Rhythms. *Sleep.* 2004 Feb;27(1):166–71.
30. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 2008 Jan;31(1):27–36.

31. Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2013.
32. Aschoff J. Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1960 Jan 1;25(0):11–28.
33. Quintero JE, Kuhlman SJ, McMahon DG. The Biological Clock Nucleus: A Multiphasic Oscillator Network Regulated by Light. The Journal of Neuroscience. 2003 Sep 3;23(22):8070–6.
34. Díez-Noguera A, Vilaplana J, Campuzano A, Cambras T. Presence of Two Circadian Components in the Motor Activity Rhythm of Young Rats Entrained to Different T Cycles. Biol Rhythm Res. 1994;25(2).
35. de La Iglesia HO, Cambras T, Schwartz WJ, Díez-Noguera A. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. Current Biology. 2004;14(9).
36. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. J Comp Neurol. 1972 Sep;146(1):1–14.
37. Vrang N, Larsen PJ, Mikkelsen JD. Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means ofPhaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing. Brain Res. 1995 Jun;684(1):61–9.
38. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. Journal of Endocrinology. 2009 Jan;200(1):3–22.
39. de Araujo LD, Roa SL, Bueno AC, Coeli-Lacchini FB, Martins CS, Uchoa ET, et al. Restricted Feeding Schedules Modulate in a Different Manner the Expression of Clock Genes in Rat Hypothalamic Nuclei. Front Neurosci. 2016 Dec 6;10.
40. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. Obesity. 2009 Nov;17(11):2100–2.
41. Kennaway DJ, Varcoe TJ, Voultzios A, Boden MJ. Global Loss of Bmal1 Expression Alters Adipose Tissue Hormones, Gene Expression and Glucose Metabolism. PLoS One. 2013 Jun 4;8(6):e65255.
42. Varcoe TJ, Gatford KL, Voultzios A, Salkeld MD, Boden MJ, Rattanatray L, et al. Rapidly alternating photoperiods disrupt central and peripheral rhythmicity and decrease plasma glucose, but do not affect glucose tolerance or insulin secretion in sheep. Exp Physiol. 2014 Sep 1;99(9):1214–28.
43. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian *Clock* Mutant Mice. Science (1979). 2005 May 13;308(5724):1043–5.
44. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. Nature. 2002;417(6884).

45. Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 2004 Nov;30(5):398–408.
46. Weickert MO, Pfeiffer AFH. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2006 Aug 23;49(8):1732–41.
47. Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2011 Jun 5;46(3):200–15.
48. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec;414(6865):799–806.
49. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2005 May 2;115(5):1343–51.
50. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab.* 2010 Oct;12:83–92.
51. Lambert JE, Ramos–Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2014 Mar;146(3):726–35.
52. Yang SC, Tseng HL, Shieh KR. Circadian-clock system in mouse liver affected by insulin resistance. *Chronobiol Int.* 2013 Jul 5;30(6):796–810.
53. Tan E, Scott EM. Circadian rhythms, insulin action, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014 Jul;17(4):343–8.
54. Rao MN, Blackwell T, Redline S, Stefanick ML, Ancoli-Israel S, Stone KL. Association Between Sleep Architecture and Measures of Body Composition. *Sleep.* 2009 Apr 1;32(4):483–90.
55. Szosland D. Shift work and metabolic syndrome, diabetes mellitus and ischaemic heart disease. *Int J Occup Med Environ Health.* 2010 Jan 1;23(3).
56. Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009 Dec 15;106(50):21453–8.
57. Bray MS, Shaw CA, Moore MWS, Garcia RAP, Zanutta MM, Durgan DJ, et al. Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(2).
58. Alibhai FJ, LaMarre J, Reitz CJ, Tsimakouridze E v., Kroetsch JT, Bolz SS, et al. Disrupting the key circadian regulator CLOCK leads to age-dependent cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;105.
59. Sternberg H, Rosenthal T, Shamiss A, Green M. Altered circadian rhythm of blood pressure in shift workers. *J Hum Hypertens.* 1995 May;9(5):349–53.

60. Ben-Hamo M, Larson TA, Duge LS, Sikkema C, Wilkinson CW, de la Iglesia HO, et al. Circadian Forced Desynchrony of the Master Clock Leads to Phenotypic Manifestation of Depression in Rats. *eNeuro*. 2016 Nov;3(6):ENEURO.0237-16.2016.
61. Gaspar S, Moreno C, Menna-Barreto L. Os plantões médicos, o sono e a ritmicidade biológica. *Rev Assoc Med Bras*. 1998 Sep;44(3):239–45.
62. Scheer FAJL, Morris CJ, Shea SA. The internal circadian clock increases hunger and appetite in the evening independent of food intake and other behaviors. *Obesity*. 2013 Mar;21(3):421–3.
63. Teixeira BS, Silva CM, Silva ATF, Santos LLD, de Paiva Maia YC, Pedrazzoli M, et al. Influence of fasting during the night shift on next day eating behavior, hunger, and glucose and insulin levels: a randomized, three-condition, crossover trial. *Eur J Nutr*. 2022 Dec 17;
64. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2).
65. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1019.
66. Aebi H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C).
67. Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol*. 1978;72(1).
68. Carneiro BTS, Araujo JF. Influence of scheduled restricted feeding on reentrainment of motor activity rhythm after a 6-h light-dark advance in rats. *Psychol Neurosci*. 2011 Jul;4(3):317–22.
69. Cambras T, Chiesa J, Araujo J, Díez-Noguera A. Effects of Photoperiod on Rat Motor Activity Rhythm at the Lower Limit of Entrainment. *J Biol Rhythms*. 2004 Jun 29;19(3):216–25.
70. Aung O, Weber ET. Differential effects of time-restricted feeding on circadian locomotor activity, food intake and body weight gain in BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Biol Rhythm Res*. 2022 Oct 3;53(10):1523–38.
71. Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*. 1998 Aug;29(4):293–8.
72. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 1998 May;393(6680):72–6.
73. Wotus C, Lilley TR, Neal AS, Suleiman NL, Schmuck SC, Smarr BL, et al. Forced Desynchrony Reveals Independent Contributions of Suprachiasmatic Oscillators to the Daily Plasma Corticosterone Rhythm in Male Rats. *PLoS One*. 2013 Jul 22;8(7):e68793.
74. Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*. 1995 Feb;373(6513):427–32.

75. Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA Axis-Rhythms. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2014. p. 1273–98.
76. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol*. 2019 Jul 4;10.
77. Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*. 1999 May 1;48(5):1198–214.
78. Lee SK, Lee JO, Kim JH, Kim SJ, You GY, Moon JW, et al. Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated pten down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells. *J Cell Biochem*. 2011 May;112(5):1259–67.
79. Bulger DA, Conley J, Conner SH, Majumdar G, Solomon SS. Role of PTEN in TNF $\alpha$  induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jun;461(3):533–6.
80. da Costa RM, Neves KB, Mestriner FL, Louzada-Junior P, Bruder-Nascimento T, Tostes RC. TNF- $\alpha$  induces vascular insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Dec 25;15(1):119.
81. Pagliassotti MJ, Wei Y, Bizeau ME. Glucose-6-Phosphatase Activity Is Not Suppressed but the mRNA Level Is Increased by a Sucrose-Enriched Meal in Rats. *J Nutr*. 2003 Jan 1;133(1):32–7.
82. Bastie CC, Nahlé Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T, et al. FoxO1 Stimulates Fatty Acid Uptake and Oxidation in Muscle Cells through CD36-dependent and -independent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr;280(14):14222–9.
83. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone*. 2012 Feb;50(2):437–43.
84. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FRA, Loudon ASI, Reppert SM. Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*. 2001 Dec;107(7):855–67.
85. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):139–48.
86. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metab*. 2012 Jun;15(6):848–60.
87. Tsai JY, Villegas-Montoya C, Boland BB, Blasier Z, Egbejimi O, Gonzalez R, et al. Influence of dark phase restricted high fat feeding on myocardial adaptation in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Feb;55:147–55.
88. Challet E, Caldelas I, Graff C, Pévet P. Synchronization of the Molecular Clockwork by Light- and Food-Related Cues in Mammals. *Biol Chem*. 2003 Jan 15;384(5).
89. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998;93(6).

90. le Minh N. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):7128–36.
91. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170–5.
92. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov 1;35(5):1147–50.
93. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1).
94. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*. 2010;85(3).
95. Hu S, Zhu P, Zhou H, Zhang Y, Chen Y. Melatonin-induced protective effects on cardiomyocytes against reperfusion injury partly through modulation of IP3R and SERCA2a via activation of ERK1. *Arq Bras Cardiol*. 2018;110(1).
96. Mao P, Meshul CK, Thuillier P, Goldberg NRS, Reddy PH. CART Peptide Is a Potential Endogenous Antioxidant and Preferentially Localized in Mitochondria. *PLoS One*. 2012 Jan 3;7(1):e29343.