



## EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ADIPOSIDADE CORPORAL E ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE CAMUNDONGOS

**Renan Fudoli Lins Vieira**<sup>1</sup>, Vitor Rosetto Muñoz<sup>1</sup>, Rafael Lima Junqueira<sup>1</sup>, Fellipe de Oliveira<sup>1</sup>, Rafael Calais Gaspar<sup>1</sup>, Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari<sup>1</sup>, Adelino S.R. da Silva<sup>2</sup>, Dennys Esper Cintra<sup>1</sup>, Leandro Pereira de Moura<sup>1</sup>, Eduardo Rochete Ropelle<sup>1</sup>, José Rodrigo Pauli<sup>1</sup>

1 – Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

2 – Universidade de São Paulo

**Financiamento:** PIBIC/CNPq

### **Introdução:**

A obesidade é uma doença com proporções pandêmicas, que vem aumentando nas últimas décadas decorrente de alterações no estilo de vida como inatividade física e alimentação inadequada, e que provoca grande impacto social e econômico no mundo (1). Dentre as estratégias terapêuticas não farmacológicas utilizadas para o combate e prevenção da obesidade, o jejum intermitente (JI) e o exercício aeróbio (EA) são intervenções que demonstram benefícios no tratamento e prevenção de distúrbios metabólicos. Os estudos mostram que a adoção do JI pode ser uma estratégia eficaz e natural no controle da massa corpórea, sendo capaz de estimular o desenvolvimento do tecido adiposo bege, melhorar a sensibilidade à insulina e o acúmulo de gordura hepático em animais (2,3). O EA ao aumentar o gasto energético pode ser uma alternativa para a prevenção e tratamento da obesidade e doenças associadas (4).

### **Objetivo:**

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de um protocolo de JI de forma isolada e combinado com EA sobre a via de sinalização da insulina e na expressão de genes hepáticos relacionados com a oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

### **Métodos:**

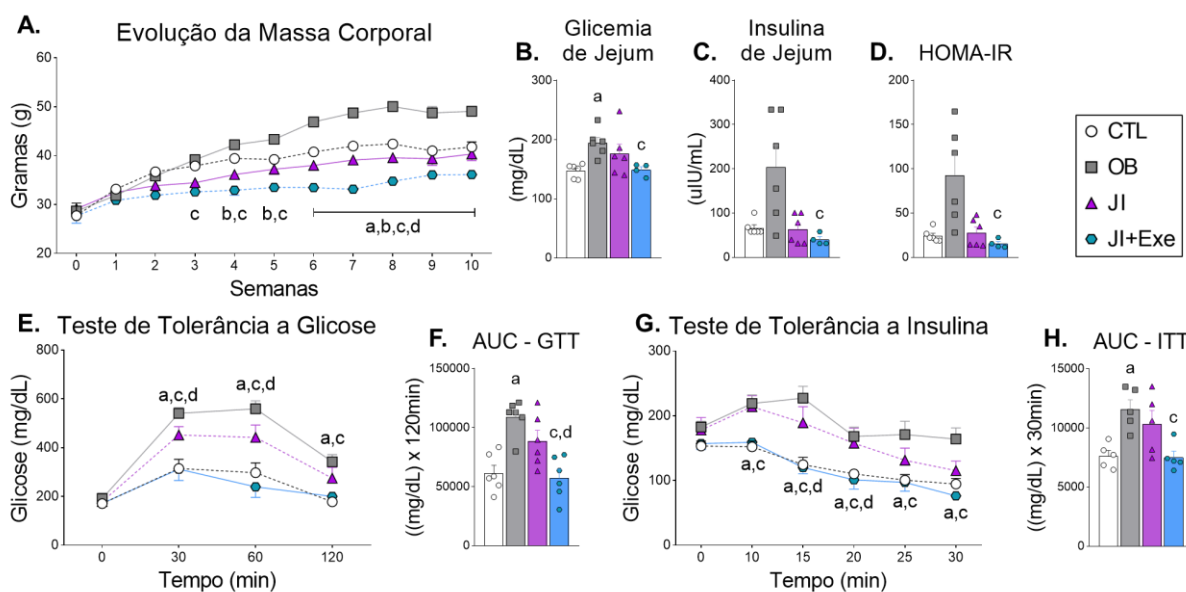
Para isso, utilizamos camundongos Swiss, machos, e distribuímos os animais em 4 grupos durante 10 semanas: grupo Controle (CTL), que teve disponibilidade de dieta comercial *Ad Libitum*; grupo Obeso (OB), que teve disponibilidade de dieta hiperlipídica *Ad Libitum*; grupo Jejum Intermitente (JI), que realizava JI de 16 horas com uma janela de alimentação com dieta hiperlipídica de 8 horas na fase ativa dos animais (22h-06h); grupo JI mais Exercício Aeróbio (JI+Exe), que além de realizar o JI também pratica treinamento em esteira na intensidade de 60% da velocidade de exaustão, 7 dias na semana por 60 minutos. Durante essas 10 semanas de experimento, os testes de tolerância a glicose e teste de tolerância a insulina foram realizados, além disso, os animais também foram colocados no sistema de monitoramento animal (CLAMs), para a análise da respirometria. Após as 10 semanas de protocolo, os animais foram eutanasiados e o soro e os tecidos foram extraídos. Posteriormente foram realizadas as análises bioquímicas, histológicas (Oil Red) e moleculares (Western blotting e RT-qPCR). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP –



Campinas-SP (processo n°5185-1/2019). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os dados que não passaram no teste de normalidade foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. O teste de Shapiro-Wilk examinou a normalidade. Os dados que mostram normalidade foram analisados usando o teste t de Student ao comparar dois grupos e o teste de ANOVA foi utilizado para a comparação de mais de dois grupos, seguido por post-hoc de Bonferroni. A significância estatística utilizada foi  $p < 0,05$ . Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 8.0®.

## Resultados:

Os dados fisiológicos mostram que a partir da 6ª semana o grupo OB apresentou massa corporal maior comparado aos grupos CTL, JI e JI+Exe (Figura 1 A). Além disso, a partir da 6ª semana também encontramos diferença na massa corporal entre os grupos JI e JI+Exe. Ao analisarmos a glicemia de jejum, insulina de jejum e o HOMA-IR, o grupo OB mostrou prejuízo metabólico e o grupo JI+Exe teve uma melhora dos parâmetros analisados (Figura 1 B-D). Além disso, o grupo OB apresentou prejuízo na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina comparado ao grupo CTL, contudo, os protocolos de JI e EA mostraram se eficiente ao atenuar esses efeitos (Figura 1 E-H).

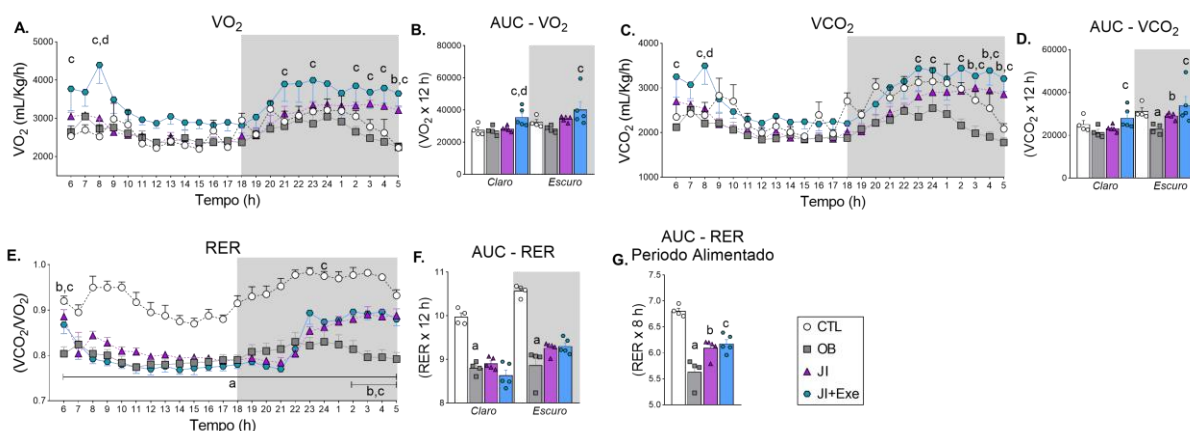


**Figura 1. Parâmetros fisiológicos e metabólicos.** A. Curva de peso corporal durante 10 semanas. B. Glicose em jejum após 6 horas de jejum coletado do sangue da cauda. C. Insulina em jejum após 6 h de jejum medida no soro. D. Índice HOMA-IR. E. Curva do teste de tolerância à glicose. F. A área sob a curva do teste de tolerância à glicose. G. Curva do teste de tolerância à insulina. H. Área sob a curva do teste de tolerância à insulina. As barras representam médias e SEM dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe ( $n = 4-6$ ). A significância estatística utilizada foi  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> para o grupo CTL *versus* OB; <sup>b</sup> para o grupo OB *versus* JI; <sup>c</sup> para o grupo OB *versus* JI+Exe; <sup>d</sup> para o grupo JI *versus* JI+Exe.

Nas análises do CLAMs, o grupo JI+Exe apresentou maior consumo de oxigênio comparado aos grupos OB e JI durante o ciclo claro e comparado ao grupo OB durante o ciclo escuro (Figura 2 A-B). O consumo de VCO<sub>2</sub> do grupo JI+Exe foi maior do que o grupo OB no ciclo claro e escuro (Figura 2 C-D). Os dados do RER foram menores no grupo OB em relação ao grupo CTL nos dois ciclos, em relação aos grupos JI e JI+Exe não houve diferença, contudo, ao analisar o RER apenas no período em que os grupos JI e JI+Exe tinham oferta

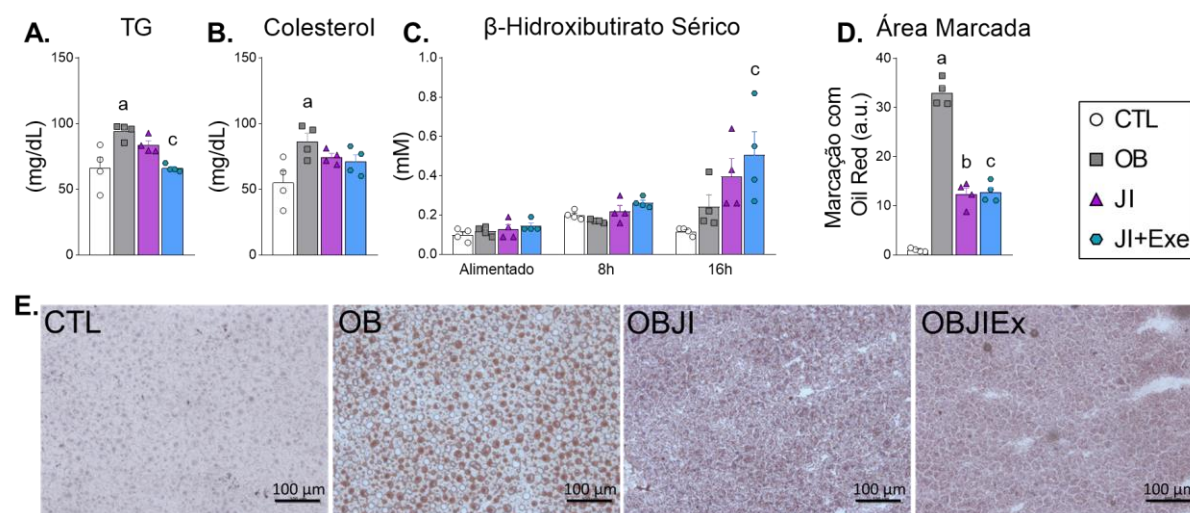


da dieta, os valores de RER foram maiores nos grupos JI e JI+Exe comparado ao grupo OB (Figura 2 E-G).



**Figura 2. Consumo de oxigênio, produção de CO<sub>2</sub> e relação de troca respiratória (RER).** A. Consumo de VO<sub>2</sub> por 24 horas. B. Consumo de VO<sub>2</sub> durante os ciclos claro e escuro. C. Produção de VCO<sub>2</sub> por 24 horas. D. Produção de VCO<sub>2</sub> durante os ciclos claro e escuro. E. Relação de troca respiratória por 24 horas. F. A relação de troca respiratória (RER) durante os ciclos claro e escuro. G. O RER durante o período de alimentação dos grupos JI e JI+Exe. As barras representam médias e SEM dos grupos CTL (n = 4), OB (n = 4), JI (n = 5) e JI+Exe (n = 5). A significância estatística utilizada foi p < 0,05. <sup>a</sup> para o grupo CTL versus OB; <sup>b</sup> para o grupo OB versus JI; <sup>c</sup> para o grupo OB versus JI+Exe; <sup>d</sup> para o grupo JI versus JI+Exe.

Ao avaliarmos os marcadores bioquímicos, os níveis séricos de TG e colesterol do grupo OB estavam elevados comparado ao grupo CTL (Figura 3 A-B). Na avaliação de corpos cetônicos, mensuramos os níveis de β-Hidroxibutirato (β-HB) em tempos de jejum diferente (Figura 3 C). Após 16 horas de jejum, os níveis de β-HB foi maior no grupo JI+Exe comparado ao grupo OB. As análises histológicas, mostraram acúmulo de gordura hepática no fígado do grupo OB, que apresentaram maior área de coloração de lipídios comparado ao grupo CTL, o que não foi observado nos grupos JI e JI+Exe (Figura 3 D-E).

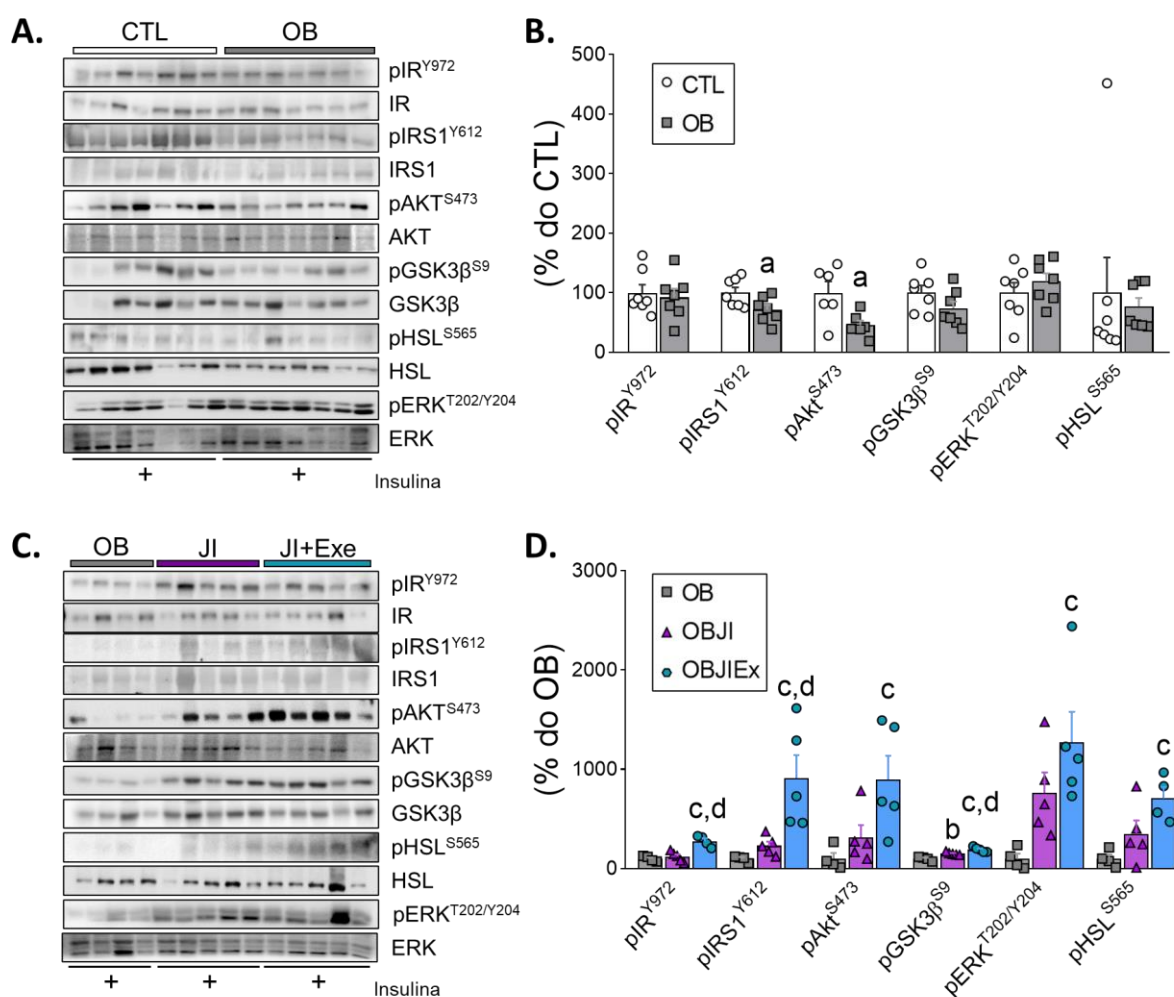


**Figura 3. Análise bioquímica sérica e conteúdo de gordura hepática.** A. Quantificação de triglicerídeos no soro. B. Quantificação de colesterol no soro. C. Quantificação de β-hidroxibutirato em soro com diferentes tempos de jejum. D. Quantificação da área marcada com óleo vermelho. E. Marcação lipídica por coloração de óleo vermelho em seções de fígado. As barras representam médias e SEM dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe (n = 4-6). A significância estatística utilizada foi p < 0,05. <sup>a</sup> para



o grupo CTL *versus* OB; <sup>b</sup> para o grupo OB *versus* JI; <sup>c</sup> para o grupo OB *versus* JI+Exe; <sup>d</sup> para o grupo JI *versus* JI+Exe.

A análise molecular no fígado de proteínas estimuladas com insulina mostrou que o grupo OB teve diminuição da fosforilação de IRS1<sup>Y612</sup> e Akt<sup>S473</sup> em comparação com o grupo CTL, sem alterações no pIR<sup>Y972</sup>, pGSK3β<sup>S9</sup>, pERK<sup>T202/Y204</sup> e pHSL<sup>S565</sup> (Figura 4 A-B). O grupo JI+Exe teve aumento em relação ao pIR<sup>Y97</sup>, IRS1<sup>Y612</sup>, pAkt<sup>S473</sup>, pGSK3β<sup>S9</sup>, pERK<sup>T202/Y204</sup> e pHSL<sup>S565</sup> comparado ao grupo OB (Figura 4 C-D). Além disso, a fosforilação do pIR<sup>Y97</sup>, IRS1<sup>Y612</sup> e pGSK3β<sup>S9</sup> no grupo JI+Exe foi maior do que o grupo JI. Por fim, o grupo JI apresentou aumento de pGSK3β<sup>S9</sup> em comparação com o grupo OB.



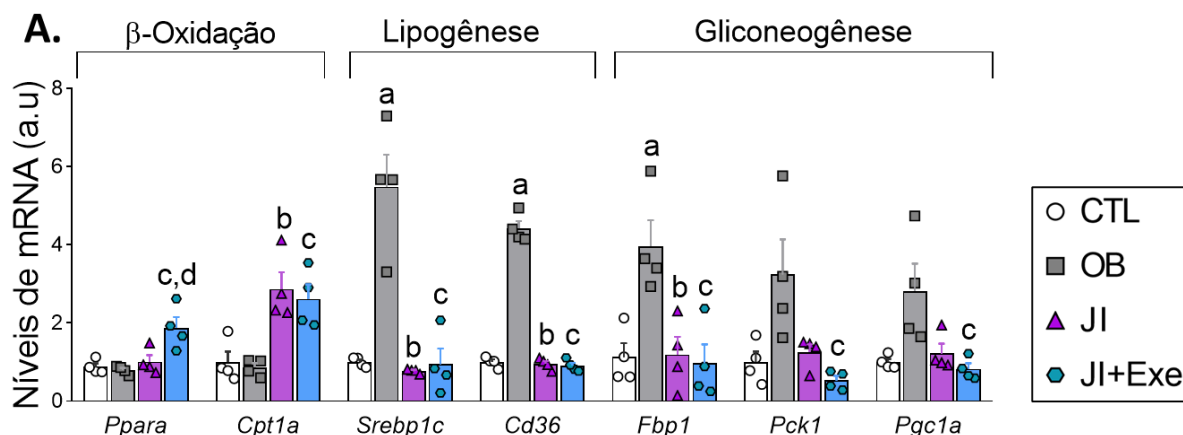
**Figura 4. Análise molecular da via de sinalização da insulina no fígado da 1ª Etapa.** A. Extratos de fígado com estimulação de insulina dos grupos CTL e OB. B. Proteínas relacionadas com a via de sinalização de insulina e a oxidação de ácidos graxos dos grupos CTL (n = 7) e OB (n = 7). C. Extratos de fígado com estimulação de insulina dos grupos OB, JI e JI+Exe. D. Proteínas relacionadas com a via de sinalização da insulina e a oxidação de ácidos graxos dos grupos OB (n = 4), JI (n = 5) e JI+Exe (n = 5) grupos. As barras representam médias e SEM dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe. A significância estatística utilizada foi  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> para o grupo CTL *versus* OB; <sup>b</sup> para o grupo OB *versus* JI; <sup>c</sup> para o grupo OB *versus* JI+Exe; <sup>d</sup> para o grupo JI *versus* JI+Exe.

O mRNA para genes relacionados à  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, lipogênese e produção de glicose hepática induzida por insulina no fígado também foram determinados. Para os genes de oxidação de ácidos graxos, os níveis de *ppara* foram significativamente





maiores no grupo JI+Exe em comparação com OB e JI e *Cpt1a* foi maior nos grupos JI e JI+Exe em relação ao grupo OB. Para os genes relacionados com a lipogênese, o grupo OB apresentou níveis aumentados de *Srebp1c* e *Cd36* em comparação com o grupo CTL, mas os grupos JI e JI+Exe apresentaram níveis mais baixos em comparação ao grupo OB. Quanto aos genes gliconeogênicos, o grupo OB apresentou níveis mais elevados de *Fbp1*, *Pck1* e *Pgc1a* em comparação ao grupo CTL, entretanto, o grupo JI+Exe mostraram alguma proteção contra esse aumento (Figura 5 A).



**Figura 5. Expressão da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese no tecido hepático.** A. Níveis de mRNA em genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (*Ppara* / *Cpt1a*), lipogênese (*Srebp1c* / *Cd36*) e gliconeogênese (*Fbp1* / *Pck1* / *Pgc1a*). O gene GAPDH foi utilizado para normalizar os níveis de mRNA. As barras representam médias e SEM dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe ( $n = 4$ ). A significância estatística utilizada foi  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> para o grupo CTL versus OB; <sup>b</sup> para o grupo OB versus JI; <sup>c</sup> para o grupo OB versus JI+Exe; <sup>d</sup> para o grupo JI versus JI+Exe.

### Conclusão:

Os resultados obtidos mostram que o JI isolado consegue reduzir o ganho de peso e adiposidade, além disso, aumenta a oxidação de ácidos graxos e reduz genes de lipogênese no fígado. Adaptações adicionais foram encontradas no grupo que aliou JI e EA, como aumento do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), produção de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ) e produção de corpos cetônicos ( $\beta$ -Hidroxiacetato). JI+Exe melhorou também a via de sinalização da insulina, promoveu aumento dos genes de oxidação de ácidos graxos, e redução da expressão de genes ligados a gliconeogênese e lipogênese no fígado. Além disso, os resultados em nível molecular do grupo JI+Exe foram acompanhados por melhora do metabolismo de glicose, triglicerídeos séricos mais baixos e conteúdo lipídico hepático reduzido. Em conclusão, os resultados indicam que o JI associado com o EA é capaz de mitigar os efeitos deletérios do consumo de dieta hiperlipídica sobre a adiposidade corporal, metabolismo hepático e homeostase glicêmica em camundongos.

### Referências:

- 1 **Gregg EW et al.** Global health effects of overweight and obesity. *N Engl J Med* 2017;377:80–1.
- 2 **Delahaye LB et al.** Time-restricted feeding of a high-fat diet in male C57BL/6 mice reduces adiposity but does not protect against increased systemic inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018;43:1033–42.
- 3 **Chaix A et al.** Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab* 2014;20:991–1005.
- 4 **Petridou A et al.** Exercise in the management of obesity. *Metabolism*. 2019.