



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata Spezani de Souza

**Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos
obesos induzidos por dieta**

Rio de Janeiro
2020

Renata Spezani de Souza

**Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos obesos
induzidos por dieta**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Renata Spezani de.
Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos
obesos induzidos por dieta / Renata Spezani de Souza. – 2020.
68 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Dieta hiperlipídica – Efeitos adversos – Teses. 2. Núcleo
arqueado do hipotálamo – Teses. 3. Jejum intermitente – Teses. 4.
Neuropeptídeo Y – Teses. 5. Pró-opiomelanocortina – Teses. 6.
Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Mandarin-de-
Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 577.115:611.814

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renata Spezani de Souza

**Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos obesos
induzidos por dieta**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de julho de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Fabiane Ferreira Martins
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda Ornellas Pinto da Cruz
Centro Universitário Augusto Motta

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos cientistas do mundo inteiro que estão lutando bravamente na busca de respostas para o enfrentamento que estamos vivendo nesse momento histórico de pandemia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo e por acreditarem na minha capacidade de perseverar.

Aos meus familiares de sangue e de coração, todos contribuem de alguma forma na minha jornada e escolhas com palavras de encorajamento.

Ao meu amor, Alex Farah, que sempre será meu professor, amigo, companheiro, incentivador, dedicando sempre o seu melhor a mim, cuidando e entendendo os meus momentos de distanciamento. Obrigada pelo amor, cuidado e por me conhecer melhor do que a mim mesma.

Ao meu orientador professor Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda por ter me acolhido gentilmente com toda a disposição para me ajudar, pela paciência, pelas conversas e pela competência e comprometimento profissional. A sua paixão pela pesquisa é uma grande fonte de inspiração.

Aos professores que fizeram parte da minha formação para chegar até aqui. Sem eles nada disso seria possível.

A todos do LMMC por todo suporte técnico na realização do trabalho e humano nos momentos mais difíceis, tornando-os mais leves.

À minha amiga Renata, aliada dentro e fora do laboratório, compartilhando alegrias, incertezas, tristezas e emoções desde a graduação e, com certeza, vamos permanecer assim pela vida toda. Obrigada por chegar e ficar.

Às meninas e um menino que têm um lugar especial no meu coração, cada um com seu jeitinho especial: Tamiris, minha companheira de academia, açaí e boas risadas. Obrigada por estar sempre por perto para me ajudar e me ensinar o que sabe com tanta boa vontade e presteza. Thaty, minha “malvada” favorita. Obrigada por sempre trabalhar comigo até a exaustão e pelas longas conversas até na madrugada. Aline, minha fonte de inspiração de viver um dia de cada vez. Obrigada pelo cuidado e por me fazer acreditar que posso “nascer sempre com as manhãs”. Pedro, o “misanthropo” mais prestativo do laboratório. Obrigada por estar sempre me ajudando e motivando com boas ideias.

Gratidão à Mel, minha companheira de quatro patas, que sempre está ao meu lado, até mesmo nas noites sem dormir. Ela acalenta e aquece meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também a FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho.

Você não acorda um belo dia e se transforma em borboleta
- Crescer é um processo.
Não há mais nada que você possa temer.
O sol e suas flores chegaram.

Rupi Kaur

RESUMO

SPEZANI, Renata. *Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos obesos induzidos por dieta*. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O consumo contínuo de alimentos ricos em gordura saturada leva à obesidade e alterações metabólicas periféricas e centrais. Nosso objetivo foi investigar como o jejum intermitente (JI) poderia influenciar o hipotálamo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, concentrando-se em marcadores moleculares relacionados à função de saciedade/fome na região do núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo. Além disso, a ingestão de alimentos e energia, massa corporal e resistência à leptina foram estudados. Camundongos machos C57BL/6J, com três meses de idade, foram divididos em grupo controle (C, alimentado com dieta controle) e grupo hiperlipídico (HL, alimentado com dieta rica em lipídios) por oito semanas. Em quatro semanas adicionais, metade dos animais de cada grupo fez JI (24h alimentado /24h em jejum), enquanto a outra metade continuou a se alimentar livremente. Assim, quatro novos grupos foram formados: C, CJI, HL e HLJI. A massa corporal e o consumo de energia aumentaram nos animais HL, bem como os coxins gordurosos, e houve aumento da glicemia, colesterol total, triacilglicerol, insulinemia, índice de resistência à insulina (FIRi), leptinemia e redução da adiponectinemia. O JI melhorou todos esses parâmetros inclusive a expressão do gene da *Leptina* no tecido adiposo epididimal. No hipotálamo, as expressões gênicas foram aumentadas para *Leptina* e *Socs3*, com uma diminuição de *Obrb*, sugerindo resistência à leptina. O JI melhorou significativamente esses parâmetros, embora não tenha sido estatisticamente significativa para o *Socs3*. A expressão gênica de *Npy* foi maior nos grupos HL e HLJI, enquanto *Pomc* diminuiu predominantemente no JI. A expressão proteica do NPY foi maior nos grupos submetidos ao JI. O POMC mostrou uma redução significativa no JI, mas houve um aumento no HLJI. A imunofluorescência com marcação NPY e POMC na região ARC no hipotálamo confirmou os resultados moleculares. A expressão gênica dos marcadores inflamatórios *Il-6*, *Il-1 β* e *Tnf- α* no hipotálamo foi maior nos grupos JI, exceto *Tnf- α* no grupo HLJI. Em conclusão, existe um efeito benéfico do JI em animais obesos induzidos por dieta, resultando em massa corporal reduzida, metabolismo lipídico melhorado e melhora na sensibilidade à insulina periférica, leptina e adiponectina. O JI reduziu a resistência central à leptina, aumentando a expressão do *Obrb* hipotalâmico. No entanto, houve um aumento na expressão hipotalâmica de marcadores pró-inflamatórios, indicando que o JI pode ter um efeito colateral, pelo menos no período utilizado neste estudo, que deve ser considerado no tratamento de comorbidades associadas à obesidade induzida pela dieta.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Núcleo arqueado. Neuropeptídeo Y. Neuropeptídeo pró-opiomelanocortina. Inflamação.

ABSTRACT

SPEZANI, Renata. *Hypothalamic impact of intermittent fasting in diet-induced obese mice*. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Continued consumption of high-fat foods leads to obesity and peripheral and central metabolic changes. We aimed to investigate how intermittent fasting (IF) could influence the hypothalamus of mice fed a high-lipid diet, focusing on molecular markers related to the hunger-satiety function in the arcuate nucleus (ARC) region of the hypothalamus. Also, food and energy intake, body mass, and resistance to leptin were studied. Male C57BL/6J mice, aged three months, were divided into a control group (C, fed a control diet) and a high-fat group (HF, fed a diet rich in lipids) for eight weeks. An additional four weeks, half of the animals in each group did IF (24h fed/24h fasting), while the other half of the animals continued to feed freely. Thus, four new groups were formed: C, CIF, HF, and HFIF. Body mass and energy consumption increased in HF animals, as well as fatty pads, and there was an increase in blood glucose, total cholesterol, triacylglycerol, insulinemia, insulin resistance index (FIRi), leptinemia and reduction in adiponectinemia. *Leptin* gene expression increased in the epididymal adipose tissue in the HF group. The IF reduced all these parameters. In the hypothalamus, gene expressions were increased for *Leptin* and *Socs3*, with a decrease in *Obrb*, suggesting resistance to leptin. The IF significantly improved these parameters, even though it was not statistically significant for *Socs3*. The gene expression of *Npy* was higher in the HF and HFIF groups, while *Pomc* decreased predominantly in HF. The protein expression of NPY was higher in the groups submitted to IF. POMC showed a significant reduction in HF, but there was an increase in HFIF. Immunofluorescence with NPY and POMC labeling in the ARC region in the hypothalamus confirmed the molecular results. Gene expression of inflammatory markers *Il-6*, *Il-1 β* and *Tnf- α* in the hypothalamus were higher in the IF groups, except for *Tnf- α* in the HFIF group. In conclusion, there is a beneficial effect of IF in diet-induced obese mice reduced body mass, improved lipid metabolism, and sensitivity to peripheral insulin, leptin, and adiponectin. The IF reduced the central resistance to leptin, increasing the expression of hypothalamic *Obrb*. However, there was an increase in the hypothalamic expression of pro-inflammatory markers, indicating that IF may have a side effect, at least in the period used in this study, which should be considered in the treatment of comorbidities associated with diet-induced obesity.

Keywords: High-fat diet. Arcuate nucleus. Neuropeptide Y. Proopiomelanocortin neuropeptide. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do hipotálamo em camundongo.....	23
Figura 2 -	Neurônios e núcleos que controlam o balanço energético.....	24
Figura 3 -	Via de sinalização da leptina.....	28
Figura 4 -	Desenho experimental.....	35
Figura 5 -	Citoarquitetura das áreas do hipotálamo na região do núcleo arqueado.....	38
Figura 6 -	Sequências dos primers utilizados no qPCR.....	40
Figura 7 -	Massa corporal analisada ao longo do período experimental.....	43
Figura 8 -	Análises plasmáticas (glicemia de jejum, insulina e FIRi).....	45
Figura 9 -	Análises plasmáticas (leptina e adiponectina).....	45
Figura 10 -	Expressão gênica no hipotálamo (<i>Leptina</i> , <i>Obrb</i> e <i>Socs3</i>).....	46
Figura 11 -	Expressão gênica no hipotálamo (<i>Il 6</i> , <i>Il-1β</i> e <i>Tnf-α</i>).....	47
Figura 12 -	Expressão gênica e proteica no hipotálamo (neuropeptídeo Y e neuropeptídeo pró-opiomelanocortina).....	48
Figura 13 -	Fotomicrografias de cortes coronais do hipotálamo (microscopia confocal a laser) com marcação de NPY.....	49
Figura 14 -	Fotomicrografias de cortes coronais do hipotálamo (microscopia confocal a laser) com marcação de POMC.....	49
Figura 15 -	Representação gráfica resumida dos principais efeitos periféricos e centrais obtidos do jejum intermitente em camundongos obesos induzidos por dieta.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição e conteúdo energético das dietas experimentais.....	34
Tabela 2 -	Ingestão alimentar, consumo de energia, depósitos de gordura e parâmetros bioquímicos.....	44
Tabela 3 -	ANOVA de dois fatores: dieta vs. jejum intermitente.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 V	Terceiro ventrículo
ACTH	Hormônio adeno corticotrófico
AgRP	Proteína relacionada ao <i>agouti</i>
AHN	Núcleo hipotalâmico anterior
AM	Amígdala
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ARC	Núcleo arqueado
AIN	Instituto Americano de Nutrição
BHE	Barreira hematoencefálica
β -EP1	Beta-endorfina 1
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina do soro bovino
C	Controle
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CC	Corpo caloso
CCX	Córtex cerebral
CEUA	Comissão de ética para uso de animais
CT	Colesterol total
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindole
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
dT	Desoxitimidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPAC1	Troca de proteínas ativadas diretamente pelo AMP cíclico
EM	Eminência mediana
FIRi	Índice de resistência à insulina em jejum
FX	Fórnix
HI	Hipocampo

HL	Rica em lipídio
IL	Interleucina
IRS	Receptor de insulina
JAK	Janus quinase
JI	Jejum intermitente
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LHA	Área hipotalâmica lateral
MBH	Hipotálamo mediobasal
MC	Massa corporal
MCR	Receptor de melanocortinas
MSH	Hormônio estimulante de melanócito
NIH	Instituto nacional de saúde
NPY	Neuropeptídeo Y
Ob	Gene da obesidade
ObRb	Forma longa do receptor de leptina
PBS	Tampão fosfato-salino
PFA	Área perifornicular
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
POA	Área pré-óptica
POMC	Pró-ópiomelanocortina
PTP	Proteína tirosina fosfatase
PTPN	Proteína tirosina fosfatase não receptora
PVN	Núcleo paraventricular
QO	Quiasma óptico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SCN	Núcleo supraquiasmático
SNC	Sistema nervoso central
SOCS	Supressor de sinalização de citocina
SON	Núcleo supraóptico
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
SE	Septo

TA	Tecido adiposo
TAG	Triacilglicerol
TH	Tálamo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tyr	Resíduo de fosforilação de tirosina
VMH	Núcleo ventromedial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1	Dieta hiperlipídica	18
1.2	Obesidade induzida por dieta em camundongo	19
1.3	Hipotálamo	21
1.3.1	<u>Neuropeptídeos hipotalâmicos</u>	25
1.4	Sinais periféricos de adiposidade	26
1.4.1	<u>Leptina</u>	27
1.4.2	<u>Insulina</u>	28
1.5	Jejum intermitente	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Animais	33
3.2	Dieta	33
3.3	Massa corporal, ingestão de alimentos e consumo de energia	35
3.4	Sacrifício e extração de tecidos	35
3.5	Análises plasmáticas	36
3.6	Imunofluorescência e microscopia confocal a varredura laser	37
3.7	Western Blotting	38
3.8	qPCR	39
3.9	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	42
4.1	Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética	42
4.2	Análises plasmáticas	44
4.3	Expressão gênica e proteica	46
4.4	Imunofluorescência e Microscopia Confocal a Laser	48
4.5	ANOVA de dois fatores: dieta versus jejum intermitente	50
5	DISCUSSÃO	52

CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A – Aprovação do comitê de ética.....	67
ANEXO B – Artigo publicado.....	68

INTRODUÇÃO

A ingestão de alimentos ricos em lipídios tem contribuído para o surgimento de comorbidades associadas ao aumento da massa corporal e alterações metabólicas, e modelos experimentais tem sido propostos para estudar essas alterações, inclusive no camundongo (1).

O hipotálamo é a região do diencefalo responsável pela manutenção da homeostase energética. A regulação está associada a capacidade do hipotálamo de orquestrar respostas fisiológicas complexas, como ingestão de alimentos e gasto de energia, ritmo circadiano e resposta ao estresse e alterações metabólicas e obesidade podem comprometer essas funções (2). Vários núcleos hipotalâmicos estão diretamente envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e do gasto energético, como o núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), hipotálamo ventromedial e dorsomedial (VMH e DMH), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (LHA) (3, 4).

A dieta hiperlipídica modifica os mecanismos regulatórios no hipotálamo através de um desequilíbrio do binômio fome-saciedade, controlada majoritariamente pela leptina através da via de sinalização da Janus kinase-2/Transdutores de sinal e ativadores de transcrição-3 (JAK2/STAT3), resultando em hiperfagia e aumento da adiposidade (5). O receptor da leptina é expresso e facilmente detectável em grande parte no núcleo arqueado hipotalâmico juntamente com o neuropeptídeo Y (orexígeno) e com o neuropeptídeo pró-opiomelanocortina (POMC) (anorexígeno), ambos envolvidos com o desenvolvimento da resistência periférica e central à leptina, já que uma deficiência da mesma estimula o apetite aumentando a expressão de neuropeptídeos orexígenos e suprimindo a expressão dos anorexígenos (6, 7).

O jejum intermitente (JI) é definido por períodos de abstenção voluntária da alimentação, praticado globalmente por diversas populações (8), e tem se mostrado uma abordagem eficaz na perda de massa corporal em indivíduos obesos, Pode ser realizado em diferentes protocolos, como por exemplo, o jejum em dias alternados, ou jejum de uma a duas vezes na semana alternados com dieta irrestrita nos períodos sem jejum (9). Apesar de alimentos serem consumidas livremente nos períodos de realimentação, o jejum em dias alternados em modelos de roedores

obesos induzidos por dieta reduziu as concentrações plasmáticas de colesterol e triacilglicerol (10), pois não há uma compensação total do déficit calórico que é ocasionado no período de jejum (8). Dessa forma, o JI tem sido sugerido como uma medida não farmacológica para melhorar a saúde, combatendo a obesidade e os distúrbios metabólicos (11), principalmente reduzindo os níveis de glicose no sangue e aumentando a sensibilidade à insulina, associados à mobilização de ácidos graxos e a geração de cetonas levando a redução do colesterol total, triacilglicerol e leptina circulante, e aumentando os níveis de adiponectina (10, 12).

Esse estudo tem a hipótese de o JI em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica, além de reduzir a massa corporal, melhorar o metabolismo de lipídios e a glicemia, diminuir as alterações deletérias nos neurotransmissores envolvidos na regulação do apetite e marcadores inflamatórios no hipotálamo.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Dieta hiperlipídica

Os ácidos graxos estão presentes na dieta principalmente sob a forma de triacilglicerol e representam os principais blocos de construção dos lipídios (13, 14). Os alimentos contêm diferentes tipos de ácidos graxos, que são ácidos carboxílicos com cadeia alifática longa podendo ser: saturada, monoinsaturada ou poli-insaturada (15).

A gordura é um macronutriente valioso e possui um papel central na obtenção de energia para a manutenção de uma vida saudável, sendo a segunda fonte de energia mais importante para os humanos. Entretanto, ela é consumida como uma parte do alimento que contém outros nutrientes e compostos dietéticos, tendo assim efeitos aditivos e sinérgicos sobre a saúde, interagindo de maneira complexa e difícil de delinear, sendo imprescindível determinar o tipo e quantidade de gordura ingerida diariamente (15, 16).

Recomenda-se para um adulto saudável consumir entre 20 % e 35 % em energia com um maior consumo de ácidos graxos poli-insaturados e ingestão limitada de gorduras trans e saturadas (13). Para roedores na fase adulta, a quantidade de lipídios na dieta deve ser de 40 g/kg da dieta, o que corresponde a apenas 10 % de gordura em sua composição (17).

Para uma dieta ser considerada com alto teor de gordura, o percentual para humanos varia de 30 % a 75 % de lipídios na sua composição (18). No caso dos roedores, um percentual de 50 % ou mais é utilizado na dieta hiperlipídica (1).

Considerando que o apetite é a força motriz para a busca, escolha e ingestão de alimentos, e o ambiente obesogênico atual em que vivemos, somos impelidos a escolher alimentos de alta densidade energética, maior palatabilidade e efeitos fracos na saciedade, promovendo assim um consumo excessivo de lipídios (19), também conhecido como “consumo excessivo passivo”, no qual há um consumo não deliberado de energia derivada de lipídio, levando a ingestão excessiva de gordura em uma única refeição, produzindo um balanço energético positivo expressivo a curto prazo (20).

Existem mecanismos sensoriais lipídicos que evoluíram para aumentar a habilidade de detectar e consumir gorduras, ampliando assim a capacidade de captação e armazenamento de energia do organismo. Esses mecanismos incluem sensores em diversas regiões do corpo, sobretudo no hipotálamo, já que é ele que vincula a detecção de nutrientes ao controle do metabolismo e do comportamento alimentar. Assim, as gorduras presentes nos alimentos podem induzir alterações na função hipotalâmica, visto que elas podem ser metabolizadas dentro dos neurônios, produzindo sinais que controlam a expressão de neurotransmissores envolvidos na homeostase energética. Além disso, a sinalização inflamatória central pode ser ativada por quantidades excessivas de alguns ácidos graxos, ocasionando distúrbios funcionais e, até mesmo, apoptose neuronal. Portanto, os lipídios da dieta conquistaram reconhecimento por suas atuações diretas no cérebro, já que são capazes de afetar vários processos cerebrais ao regular a transmissão sináptica, a fluidez da membrana, as vias de transdução de sinal e a homeostase energética (15, 16, 21).

1.2 Obesidade induzida por dieta em camundongo

A obesidade pode ser definida pelo acúmulo anormal ou excessivo de energia derivada dos alimentos que pode prejudicar a saúde, estando a gordura abdominal, em humanos, associada a maior risco de comorbidades cardiovasculares e altas taxas de mortalidade (22). O excesso de adiposidade é uma característica hereditária determinada por interações complexas entre genes e meio ambiente, incluindo uma dieta suplementada com uma quantidade adicional de energia. Assim como os seres humanos, os roedores diferem no ganho de massa corporal quando a densidade energética do alimento está aumentada (23).

Como resultado, muitas pesquisas estão focadas nos aspectos genéticos e fisiológicos que causam obesidade (24). Os camundongos geneticamente modificados têm sido utilizados como modelos eficientes para mimetizar a obesidade humana (25, 26). Ao menos, 10 cromossomos (2, 4, 5, 7-9, 11, 12, 16, 17) têm locais implicados na regulação da obesidade (24). Os modelos C57BL/6J (B6) e 129 e sua origem intercruzada (C57BL/6ByJx129P3/J) F2 (27), foram as linhagens mais

estudadas para obesidade poligênica, sendo o B6 um padrão de escolha por pesquisadores para estudos em obesidade e síndrome metabólica, já que ganham peso com maior eficiência do que camundongos 129S quando consomem uma dieta hiperlipídica (23).

Além de maior massa corporal, B6 e F2 apresentam níveis mais altos de insulina e leptina, e mostram maior intolerância à glicose do que o modelo 129, apesar da menor ingestão de alimentos (28). Segundo Collins et al. (29), o desenvolvimento da resistência à insulina, hiperglicemia e obesidade no camundongo B6 são paralelas à progressão de formas comuns da doença humana. Por exemplo, o desenvolvimento de diabetes e obesidade em humanos ocorre de forma gradual e frequentemente na presença de uma dieta rica em gordura (29).

Essas características no C57BL/6 são adquiridas de forma dominante com pelo menos quatro loci em três cromossomos diferentes contribuindo para o fenótipo obeso (30). Em 2015, Ussar et al. demonstraram que além de fatores genéticos e ambientais, a microbiota do camundongo C57BL/6J alimentados com dieta rica em gordura possui forte propensão ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) (31).

A fisiopatologia da SM pode ser atribuída em grande parte à resistência à insulina, com fluxo excessivo de ácidos graxos circulantes (32). Como a sinalização central da insulina é necessária para o controle do peso corporal e para a homeostase da glicose, as mudanças bioquímicas nas vias de sinalização mediadas por insulina que ocorrem na SM, resultam em diminuição no transporte e metabolismo da glicose mediados por insulina (33).

A hiperlipidemia é uma característica da SM que resulta da resistência à insulina no tecido adiposo. A insulina melhora a captação de glicose pelos adipócitos, promove a diferenciação e inibe a lipólise. Desse modo quando a ação da insulina falha nos adipócitos, glicose e lipídios são redistribuídos para a circulação e órgãos, resultando em hiperlipidemia e órgãos gordurosos (34).

Estudos também mostram o envolvimento de marcadores inflamatórios como componentes da SM. Sabe-se que a obesidade está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau, que contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (35, 36). A exposição crônica de camundongos à IL-6 leva à resistência à insulina com hiperglicemia (37).

Além disso, nessa inflamação crônica causada pela obesidade, a citocina pró-inflamatória TNF- α está presente em maior quantidade no tecido adiposo comprometendo a ativação da fosforilação da tirosina na cascata de sinalização da insulina prejudicando sua ação (36). Um estudo mostrou que camundongos obesos com uma mutação nula direcionada ao gene que codifica TNF- α apresentaram níveis mais baixos de circulação de ácidos graxos livres e aumento na sensibilidade à insulina (38, 39).

Em contrapartida, a adiponectina é uma citocina anti-inflamatória produzida por adipócitos que além de aumentar a sensibilidade à insulina, inibe etapas do processo inflamatório. A diminuição de adiponectina circulante em camundongos produz alterações no metabolismo consistentes com a síndrome metabólica (33, 40).

O balanço energético envolve a capacidade do cérebro de coordenar a atividade do tecido periférico através de seus núcleos hipotalâmicos garantindo o aproveitamento de um nutriente quando é ingerido. Além do consumo excessivo de energia, complicações metabólicas relacionadas à obesidade envolvem a conversão, armazenamento e utilização inadequados de nutrientes: um processo integrado conhecido como "partição de nutrientes". Nesse sentido, os vínculos entre obesidade e suas comorbidades, podem se originar de uma alteração primária na capacidade do cérebro de orquestrar a atividade dos tecidos periféricos (41).

1.3 Hipotálamo

O hipotálamo é uma estrutura anatomicamente complexa, situada logo acima da adenohipófise, responsável pela manutenção da homeostase corporal (2, 42). É uma região encefálica delimitada semelhantemente tanto em humanos como em roedores, com o cuidado de usar a nomenclatura adequada pois roedores são quadrúpedes. Com essa ressalva, em roedores o hipotálamo (parte do diencéfalo) está limitado cefálica e rostralmente pelo sulco hipotalâmico (e tálamos), e caudal e dorsalmente pelo quiasma óptico e corpos mamilares (43). É composto por núcleos heterogêneos, conectados por projeções neuronais que integram sinais hormonais e nutricionais periféricos levando a respostas neuroendócrinas e/ou autonômicas (44).

Os núcleos hipotalâmicos regulam funções fisiológicas distintas, como alimentação *versus* gasto energético, termorregulação, comportamentos sexuais, respostas ao estresse e controle do ritmo circadiano (45, 46). Esses núcleos no cérebro de camundongo, como por exemplo, o ventromedial e arqueado são identificados na região de bregma (ponto anatômico de interseção da sutura coronal e sagital no crânio) -1,34 mm (47, 48).

O camundongo é um modelo importante na pesquisa biomédica. Em geral, ele compartilha o mesmo conjunto de 20.000 genes codificadores de proteínas com humanos, com 85% de identidade de sequência entre proteínas homólogas, permitindo associações entre fenótipos e genótipos (49). A busca de novos modelos de camundongos requer uma métrica sensível para fazer comparações tridimensionais com a neuroanatomia humana (50). Por exemplo, o hipotálamo ventromedial pode estar completamente ausente se o plano parassagital é desviado apenas em +120 µm a lateral +0,60 mm. Para evitar erros, a seção do cérebro deve ser cuidadosamente avaliada usando um atlas de coordenadas estereotáxicas do cérebro de camundongo, de modo a obter seções exatamente no plano mais próximo à imagem encontrada no atlas (47).

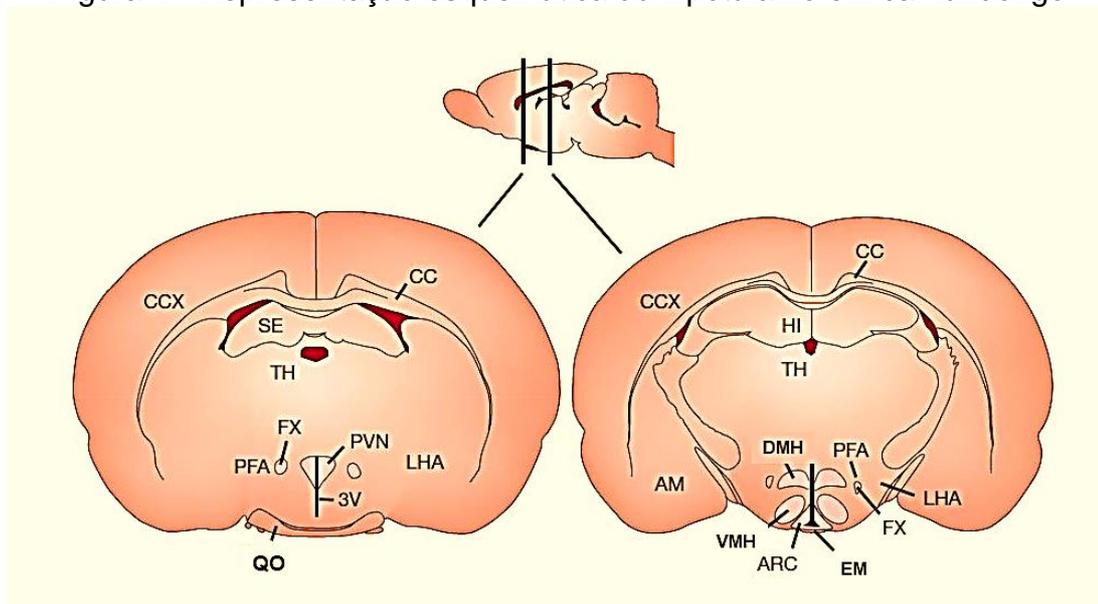
O hipotálamo pode ser dividido em três regiões:

- a) **periventricular** formada pela área pré-óptica (POA), núcleo supraquiasmático (SCN), núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado (ARC) e núcleo posterior;
- b) **área medial** composta pelo núcleo hipotalâmico anterior (AHN), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMH) e núcleo pré-mamilar;
- c) **área hipotalâmica lateral** (LHA) formada pelo núcleo pré-óptico lateral, núcleo hipotalâmico lateral, núcleo tuberomamilar e núcleo supraóptico (SON).

A eminência mediana (EM) está situada no hipotálamo médio-basal, sendo o recesso infundibular do terceiro ventrículo (3V), delimitado pelo lado dorsal que faz contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR) (51). A Figura 1 mostra as principais regiões hipotalâmicas envolvidas na sinalização de adiposidade e regulação na ingestão de alimentos, onde os neurônios de primeira ordem estão localizados sobretudo no ARC e projetados anteriormente ao PVN, bem como na área adjacente

ao fórnix e ao LHA. Outras regiões implicadas na regulação da ingestão de alimentos incluem o VMH e o DMH (3).

Figura 1 - Representação esquemática do hipotálamo em camundongo



Legenda: Amígdala (AM); núcleo arqueado (ARC); corpo caloso (CC); córtex cerebral (CCX); núcleo dorsomedial (DMH); eminência mediana (EM); fórnix (FX); hipocampo (HI); área hipotalâmica lateral (LHA); área perifornicária (PFA); núcleo paraventricular (PVN); quiasma óptico (QO); septo (SE); tálamo (TH); núcleo ventromedial (VMH); terceiro ventrículo (3V).

Nota: A pequena figura no topo representa um corte longitudinal do cérebro de um roedor, com o bulbo na extremidade anterior à esquerda e o tronco posterior caudal à direita. As linhas verticais indicam dois cortes coronais em duas regiões indicadas abaixo com as principais estruturas hipotalâmicas envolvidas na sinalização da adiposidade e regulação da ingestão de alimentos.

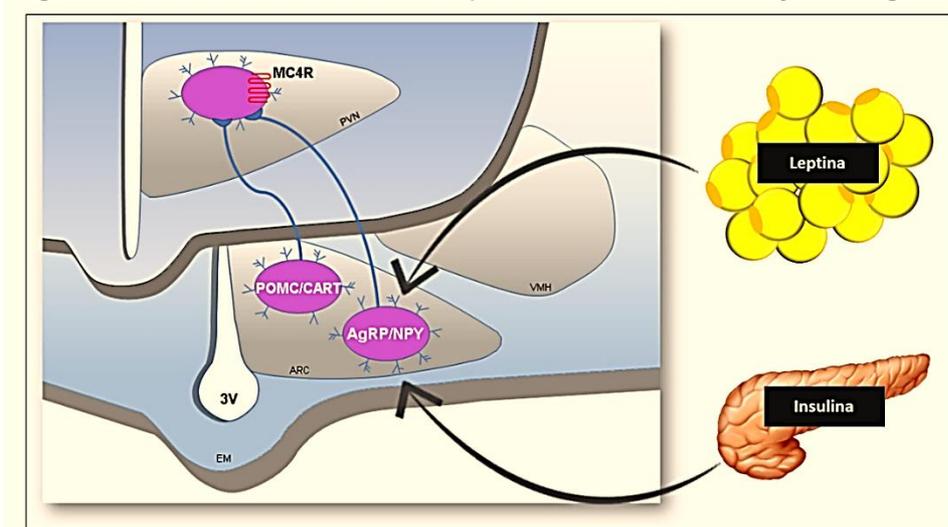
Fonte: Adaptado de Schwartz et al. (3).

O ARC é um conjunto de corpos celulares neuronais em forma de arco, localizado na base do hipotálamo adjacente ao terceiro ventrículo e à EM. É responsável por integrar sinais hormonais periféricos que refletem o *status* de energia do corpo. A EM é uma região não protegida pela barreira hematoencefálica (BHE) com capilares fenestrados semipermeáveis que integram sinais hormonais à circulação periférica para a homeostase energética (52-54). Essa integração de sinais ocorrem em duas populações neuronais funcionalmente antagônicas no ARC: uma que expressa os neurotransmissores orexígenos que produzem e liberam o neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao *agouti* (AgRP), enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexígenos pró-opiomelanocortina (POMC) e o fator de transcrição regulada por cocaína-anfetamina (CART) (2).

Os neurônios que produzem os neuropeptídeos NPY e POMC no ARC enviam projeções para o VMH, LHA e PVN para regular a alimentação e o gasto energético. De forma curiosa, a quantidade dessas fibras eferentes no ARC influencia a homeostase energética (45). Em 2014, Vogt et al., demonstraram em um estudo de programação com camundongos C57BL/6 no qual a alimentação materna continha alto teor de gordura, o comprometimento da formação dessas projeções neuronais para o alvo hipotalâmico, causando obesidade e distúrbios de metabolismo da glicose na prole (46).

Em virtude de NPY/AgRP e POMC serem considerados neurônios sensoriais de "primeira ordem" (Figura 2) no controle da homeostase energética e responderem a alterações nas flutuações hormonais e de nutrientes associadas a alterações no estado metabólico (55), serão descritos mais detalhadamente a seguir.

Figura 2 - Neurônios e núcleos que controlam o balanço energético



Legenda: Peptídeo relacionado ao *agouti* (AgRP); núcleo arqueado (ARC); transcrição regulada por cocaína e anfetamina (CART); eminência mediana (EM); receptor de melanocortina 4 (MC4R); neuropeptídeo Y (NPY); pro-opiomelanocortina (POMC); núcleo paraventricular (PVN); núcleo ventromedial (VMH); terceiro ventrículo (3V).

Nota: A figura mostra a representação esquemática de cortes coronais do hipotálamo na região da EM com os principais neurônios e núcleos que fazem parte do sistema melanocortina no hipotálamo e estão localizadas principalmente no ARC e VMH. Eles são chamados de neurônios de primeira ordem, pois recebem entrada direta de hormônios circulantes como leptina e insulina. Eles então sinalizam neurônios de segunda ordem no PVN.

Fonte: A autora, 2020.

1.3.1 Neuropeptídeos hipotalâmicos

O NPY é um peptídeo de 36 aminoácidos nomeado Y para identificar os resíduos de tirosina encontrados nos terminais C e N, bem como em outras três posições na molécula. A maioria dos efeitos metabólicos do NPY são mediados pelo hipotálamo. O ARC é a principal área hipotalâmica da expressão de NPY e seus neurônios projetam seus axônios para o lado ipsilateral do PVN. A expressão de NPY no hipotálamo tende a aumentar com o jejum e diminuir após a alimentação (56, 57).

Em 1996, Erickson et al. relatou que o NPY é produzido em maior quantidade no hipotálamo de camundongos *ob/ob* (58). Estudos mostram que a injeção intracerebroventricular crônica de NPY em roedores normais imita o fenótipo de deficiência de leptina (57, 59), incluindo obesidade, hiperfagia, termogênese reduzida, fertilidade diminuída e inibição da produção de hormônio do crescimento. Como o NPY medeia parte da hiperfagia e o metabolismo reduzido resultante da completa ausência de ação da leptina em camundongos *ob/ob*, também pode contribuir para formas de obesidade associadas à sinalização prejudicada da leptina (58).

Foram relatados seis subtipos de receptores para NPY (Y1-Y6) e todos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. As injeções intracerebroventriculares de NPY estimulam a ingestão, preferencialmente de carboidratos via receptores Y1 e/ou Y5 no PVN do hipotálamo de camundongos (60).

O AgRP é um neuropeptídeo orexígeno expresso de forma concomitante ao NPY no ARC e age como um potente antagonista seletivo no receptor de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R) (55, 61, 62). Um estudo demonstrou que a ablação seletiva induzida de neurônios que expressam AgRP em camundongos adultos resulta em redução aguda da ingestão alimentar, demonstrando um papel crítico desses neurônios na regulação da homeostase energética. Os neurônios que expressam AgRP e NPY neutralizam os neurônios que expressam POMC (63).

O POMC é um polipeptídeo precursor e sua clivagem sequencial gera uma variedade de peptídeos menores biologicamente ativos, como o hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e os hormônios estimulantes de melanócitos (MSH) α , β

e γ , conhecidos como melanocortinas, bem como o ligante do receptor opioide beta-endorfina1 (β -EP1) (64, 65). O hormônio estimulador dos melanócitos alfa (α -MSH) é um peptídeo anorexígeno presentes em neurônios do hipotálamo que atua como ligante endógeno para MC3R e MC4R para inibir a ingestão de alimentos (66, 67).

Estudos feitos com camundongos C57BL/6J obesos induzidos por dieta com deleção de todos os peptídeos derivados de POMC mostraram que essas mutações são capazes de gerar hiperfagia e obesidade (68, 69). Assim como em animais, pesquisa em humanos com ausência dos peptídeos ACTH, α -MSH e β -EP1, denominada síndrome de deficiência de POMC, resultou em obesidade de início precoce, insuficiência adrenal e pigmentação vermelha dos cabelos, mostrando a representatividade do gene POMC implicado na etiologia da obesidade humana. (65).

1.4 Sinais periféricos de adiposidade

Em consonância com a importância dos neurônios hipotalâmicos na fisiopatologia da obesidade, é importante ressaltar que hormônios como a leptina e a insulina funcionam como mensageiros de níveis de energia periférica para o sistema nervoso central (SNC) (70) através de seus receptores (3). Um estudo mostrou que a administração de insulina e leptina exógena no sistema intraventricular de camundongos C57BL/6J, diminui a ingestão de alimentos com consequente perda de massa corporal (71).

A capacidade da leptina e da insulina de controlar a homeostase energética é anulada tanto em humanos com obesidade como em modelos animais obesos induzidos por dieta (70), visto que ambos os hormônios devem ultrapassar a BHE, transportadas através de mecanismos saturáveis, que são prejudicados pela obesidade e patologias associadas, como por exemplo, a hipertrigliceridemia (72, 73).

Assim, é importante caracterizar os mecanismos que causam a resistência hipotalâmica à insulina e leptina, já que ambas têm um papel central na perda do controle coordenado da ingestão alimentar e do gasto energético estabelecendo um paralelo entre diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (74).

1.4.1. Leptina

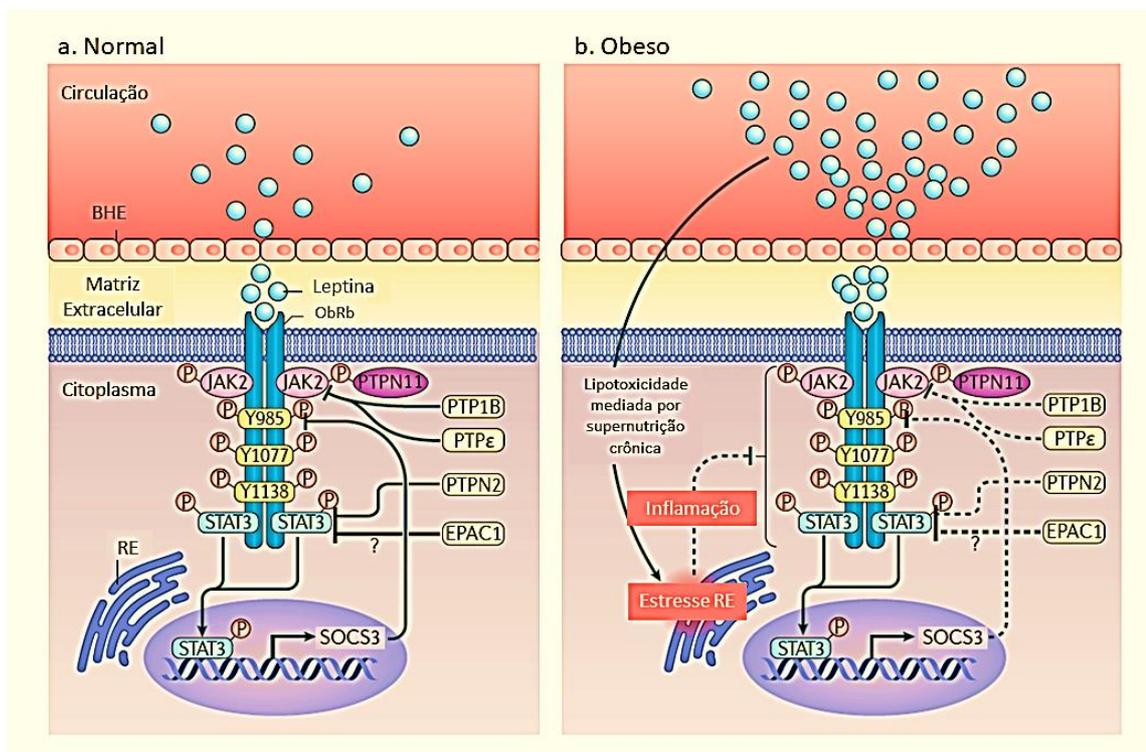
Em 1994, a leptina foi descrita através da clonagem posicional do gene *ob*, usando o modelo de camundongo *ob/ob* (75). A leptina (do grego *leptos*, que significa fino), é expressa predominantemente no tecido adiposo, codifica uma proteína de 167 aminoácidos cuja estrutura cristalina pertence à família das citocinas (76). A leptina circula no plasma de forma livre ou ligada a proteínas em proporção à quantidade de tecido adiposo (77, 78). Consequentemente, os níveis de leptina propagam informações sobre as reservas de energia do corpo para os centros que regulam a homeostase energética (79).

A isoforma longa do receptor de leptina (ObRb) é o principal responsável pela sinalização da leptina e parece mediar a maioria das suas ações fisiológicas (79). No hipotálamo, o ObRb é expresso de forma densa especialmente no ARC (80).

Em condições normais, a leptina circulante atravessa a BHE e se liga ao domínio extracelular de ObRb, que sofre uma alteração conformacional ativando JAK2, que então fosforila outros resíduos de tirosina no domínio intracelular de ObRb para ativar cascatas de sinalização. STAT3 é recrutada pela fosforilação do resíduo Tyr1138, permitindo sua dimerização e subsequente translocação para o núcleo dando início a transcrição de genes-alvo, como: PTP1B, PTPN2, PTP ϵ , EPAC1 e SOCS3, que é um inibidor da sinalização de ObRb, sendo recrutado pela fosforilação do resíduo Tyr985, garantindo que a ativação do receptor não ocorra além de um ponto fisiologicamente necessário (Figura 3.a). Na obesidade, os níveis circulantes de leptina aumentam, o que está associado a transporte diminuído de leptina através da BHE e ativação dos sistemas inibidores de *feedback* negativo que eventualmente levam a uma sinalização ObRb reduzida. O aumento de ácidos graxos livres e a supernutrição crônica causam lipotoxicidade e estresse do retículo endoplasmático (RE) e desencadeiam respostas inflamatórias que podem contribuir para o aumento da resistência à leptina (Figura 3.b) (70, 79).

A leptina também é capaz de ativar o substrato do receptor de insulina (IRS) via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K), que também é o principal mecanismo intracelular da cascata de sinalização da insulina (81).

Figura 3 - Via de sinalização da leptina



Legenda: (a) Em indivíduos com peso corporal normal; (b) Na obesidade. Barreira hematoencefálica (BHE); troca de proteínas ativadas diretamente pelo AMP cíclico 1 (EPAC1); Janus quinase 2 (JAK2); forma longa do receptor de leptina (ObRb); proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B); proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 2 (PTPN2); proteína tirosina fosfatase épsilon (PTPε); retículo endoplasmático (RE); supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3); transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3).

Fonte: Adaptado de Cui et al. (79).

1.4.2. Insulina

A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas endócrino e é um sinal de adiposidade periférica para o SNC, já que os níveis plasmáticos de insulina variam diretamente com as alterações na homeostase energética. Por exemplo, após uma refeição há a liberação de insulina e a subsequente ativação do seu receptor celular indicando a disposição dos nutrientes absorvidos. Por outro lado, a privação de alimentos induz respostas metabólicas que requerem baixos níveis de insulina no ambiente. Além disso, estados de deficiência sistêmica de insulina como por exemplo, no diabetes mellitus não controlado, está associada à hiperfagia (56, 82).

A ação da insulina é iniciada quando a insulina se liga a receptores na membrana plasmática das células. Os receptores de insulina são distribuídos de forma anatomicamente heterogênea dentro do encéfalo, sendo expressos inclusive no ARC (83, 84). Isso é consistente com a hipótese de que a insulina periférica atua nos núcleos hipotalâmicos para controlar o balanço energético (56).

Estudos mostram que a insulina ou compostos miméticos administrados em regiões do hipotálamo de roedores demonstra uma forte evidência do papel anorético da insulina no SNC, mostrando uma diminuição da ingestão de alimentos e redução da massa corporal (85, 86). Por outro lado, camundongos com deleção específica de receptor de insulina no SNC, tornaram-se obesos, dislipidêmicos e com aumento dos níveis periféricos de insulina (87).

1.5 Jejum Intermitente

O jejum é uma prática importante em muitas religiões, tanto para benefícios espirituais quanto físicos. Entretanto, pesquisas sobre regimes de jejum baseados em costumes religiosos são predominantemente observacionais como por exemplo, durante o Ramadã, uma prática islâmica para muçulmanos adultos saudáveis (8).

Uma meta-análise feita em 2012 mostrou que embora durante os períodos de alimentação no Ramadã não requererem restrição de energia, à medida que a ingestão de alimentos e líquidos se torna menos frequente, podem ocorrer alterações na massa corporal. No entanto, essas mudanças de peso durante o Ramadã foram relativamente pequenas e principalmente revertidas após o término, retornando gradualmente ao *status* anterior ao jejum (88).

O jejum intermitente (JI) tem sido proposto como mecanismo adaptativo para imitar ciclos de abundância e escassez de alimentos no final do período paleolítico. Assim, a prática levaria a construção de um genótipo econômico, necessário para a sobrevivência durante a privação, utilizando as reservas de lipídios e glicogênio durante o jejum e reabastecendo esses estoques de energia durante o período de realimentação (89, 90).

O JI pode ser realizado com diferentes protocolos como uma possível abordagem a longo prazo para reduzir massa corporal (9). Entre esses regimes, o

jejum em dias alternados, que envolve 24 horas de jejum, durante as quais não são consumidas calorias, e 24 horas de alimentos e bebidas *ad libitum* (8), foi o modelo escolhido para este estudo.

Jejum em dias alternados em roedores com obesidade induzida por dieta, com comparação com a restrição calórica, na qual a ingestão calórica diária é reduzida cronicamente em 20% a 40%, mas a frequência das refeições é mantida, mostrou que o jejum foi capaz de reduzir a massa corporal, concentrações séricas de insulina, glicose em jejum, colesterol total (CT) e triacilglicerol (TAG) (91). Além disso, o JI reduz a esteatose hepática em camundongos (92), bem como a expressão de genes inflamatórios e a proliferação de células que aumentam o risco de câncer em humanos (10).

A hora do dia exerce um papel fundamental na integração da energia e do metabolismo, bem como nos padrões de secreção hormonal e no sono. Houve uma evolução do organismo para restringir sua atividade em alguns horários, desenvolvendo um relógio circadiano endógeno para garantir que os processos fisiológicos sejam realizados harmonicamente nos horários ideais (93). Os ritmos circadianos ocorrem ao longo dos ciclos claro-escuro de 24 horas e incluem mudanças na biologia e comportamento (94).

O sinal de que o organismo está alimentado parece ser a indicação de tempo dominante para o ritmo circadiano, inclusive controlando as vias metabólicas. Assim, consumir energia fora da fase normal de alimentação, ou seja, comer tarde da noite em humanos, por exemplo, pode redefinir esse ritmo biológico e perturbar o balanço energético (8). Possivelmente, os efeitos benéficos do JI possam ser mediados, pelo menos em parte, através da redefinição do relógio circadiano mestre, localizado no SCN do hipotálamo, levando a sincronia no metabolismo e na fisiologia do organismo (94).

A adesão ao JI a longo prazo tem sido descrita como um obstáculo pela intensa sensação de fome durante o período de jejum (9). Entretanto, os animais desenvolveram adaptações comportamentais e fisiológicas, que podem aumentar sua aptidão geral, somada a uma resistência a lesões e enfermidades (12). Em consonância com essas afirmações, há influência do JI no controle da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos na homeostase energética em camundongos obesos induzidos por dieta, através de um aumento de (65-75 %) da expressão gênica de

NPY no ARC desses animais, além de diminuição de níveis periféricos de insulina e leptina, reiterando a integração metabólica periférica e central (9).

Além de suas ações no hipotálamo e na periferia, o jejum pode aumentar a atividade da rede neuronal nas regiões cerebrais envolvidas na cognição, resultando na produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que desempenha um papel crítico na integração e otimização de respostas comportamentais e metabólicas a ambientes com recursos energéticos limitados e intensa competição, além de inibir a ingestão de alimentos e aumentar o gasto de energia no hipotálamo (95). Assim, a fome pode ser um fator crítico envolvido na resposta adaptativa central e periférica ao desafio da privação de alimentos por longos períodos (91).

O surgimento de centros de medicina complementar e integrativa nos principais hospitais universitários de todo o mundo que utilizam, entre outras práticas, nutrição e exercício para prevenir e tratar enfermidades, evidencia o interesse por intervenções que substituam ou auxiliem terapias envolvendo somente tratamentos farmacológicos. Entre as intervenções alternativas para prevenção e tratamento de doenças metabólicas crônicas, o jejum intermitente em suas diferentes formas, evidencia um enorme potencial integrativo ao atendimento médico padrão (96).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Observar o efeito do jejum intermitente em camundongos obesos induzidos por dieta sobre o metabolismo energético e os principais neurotransmissores no núcleo arqueado do hipotálamo, que controlam a fome/saciedade.

2.2 Objetivos específicos:

- a) medir a massa corporal, ingestão de alimentos e consumo de energia;
- b) mensurar os níveis plasmáticos de glicose e lipídios;
- c) quantificar componentes da via de sinalização da leptina (JAK/STAT);
- d) avaliar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em nível hipotalâmico;
- e) avaliar a expressão gênica e proteica dos neuropeptídeos NPY (orexígeno) e POMC (anorexígeno).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NHI Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Cuidados e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo nº CEUA 040/2016).

Para este estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J. Os animais foram mantidos em ambiente controlado de temperatura ($21\pm 2^{\circ}$ C) e umidade ($60\pm 10\%$), ciclos de luz de 12/12h claro-escuro, com acesso livre à comida e à água durante o ciclo escuro. O metabolismo e a ilhota pancreática dos animais fizeram parte de estudos de outro pesquisador (92, 97, 98). Os hipotálamos foram estudados em associação a duas dietas diferentes, com alto teor de frutose e hiperlipídica. Os resultados foram submetidos e publicados no Journal of Nutritional Biochemistry (99).

3.2 Dieta

As dietas experimentais foram feitas pela empresa Pragsoluções (Jaú, SP, Brasil), seguindo as recomendações da AIN-93, sendo a composição detalhada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas experimentais

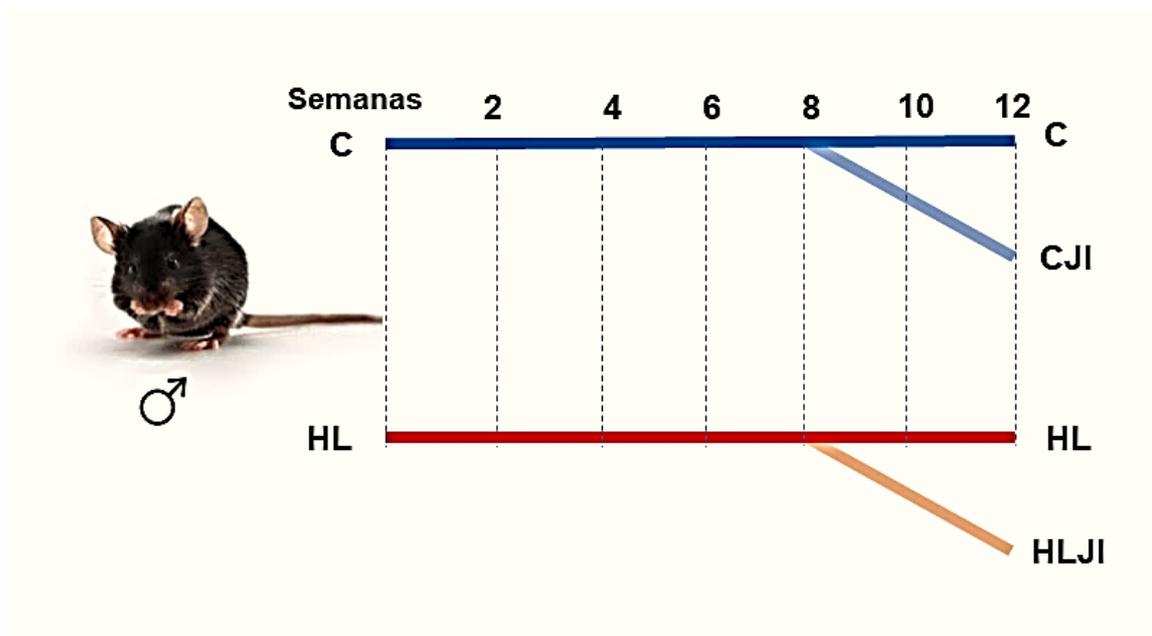
COMPOSIÇÃO (g/Kg)	Grupos	
	C	HL
Caseína	140	175
Amido de milho	620,7	348
Sacarose	100	100
Frutose	-	-
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	238
Fibra	50	50
Mistura de Vitaminas	10	10
Mistura de Minerais	35	35
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000
Energia (kJ)	15916	20920
Hidrato de carbono (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lipídio (%)	10	50

Legenda: Grupo C (dieta controle); grupo HL (dieta hiperlipídica).
 Fonte: Adaptado de Aguila et al. (100).

Inicialmente, os camundongos com 12 semanas foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=30 por grupo) e receberam dietas diferentes durante um período de oito semanas. Um grupo recebeu dieta controle, designado como grupo **C**. O outro grupo recebeu uma dieta hiperlipídica, designado como grupo **HL**.

Após as oito semanas com as suas respectivas dietas experimentais, os animais dos grupos **C** (n=30) e **HL** (n=30) serão divididos novamente em dois grupos nutricionais (n=15 por grupo), segundo o esquema de alimentação livre ou jejum intermitente (JI). Os camundongos que receberam dieta livre mantiveram o padrão de sua alimentação sem modificação. Já os animais submetidos ao JI, foram alimentados com sua dieta específica em dias alternados com o jejum de 24 h. Os grupos foram formados conforme o esquema representado na Figura 4.

Figura 4 - Desenho experimental



Legenda: dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HL), jejum intermitente (JI).

Fonte: A autora, 2020.

3.3 Massa corporal, ingestão de alimentos e consumo de energia

Uma vez por semana, a massa corporal (MC) foi mensurada (sexta-feira, 11h), e a ingestão alimentar (g/dia) foi monitorada diariamente às 8 h, subtraindo-se da quantidade total de alimentos oferecidos, a quantidade remanescente na caixa após 24 h. O consumo de energia foi o produto da ingestão de alimentos pelo valor energético da dieta (Kcal/g).

3.4 Sacrifício e extração de tecidos

Os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas no dia alimentado e parte deles receberam heparina (200 mg/kg) e foram submetidos à anestesia profunda com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg), em seguida abriu-se a caixa torácica e o coração foi exposto para a coleta por

punção cardíaca (átrio direito) de amostras sanguíneas, que em seguida, foram centrifugadas em temperatura ambiente (120 g por 15 minutos), com a finalidade de separar o plasma, sendo imediatamente estocados a -80°C até a realização das análises bioquímicas. Regiões do tecido adiposo foram dissecadas e pesadas (gordura epididimária localizada no abdome inferior e conectada ao epidídimo; gordura retroperitoneal presa à parede abdominal posterior perto dos rins; e gordura inguinal, tecido adiposo subcutâneo entre a caixa torácica e a coxa). Os hipotálamos desses animais foram removidos cuidadosamente com auxílio de um *punch* para biópsia (3 mm), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para as técnicas de biologia celular e molecular.

Outra parte dos camundongos foram profundamente anestesiados e perfundidos transcardialmente com solução salina a 0,9% para a remoção total do sangue e, em seguida com solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PFA, tampão fosfato 0,1 M, PBS, pH 7,4) (101). Os encéfalos foram isolados e rapidamente imersos em uma solução de PFA a 4% (4 horas a 4°C). Posteriormente, foram crioprotetidos com sacarose a 30% em PBS e mantidos durante a noite a 4°C . Os cérebros foram congelados em meio de inclusão específico para corte (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europa, Holanda) e congelados em nitrogênio líquido. Finalmente, os blocos foram seccionados em plano coronal, obtendo-se cortes com espessura nominal de $25\ \mu\text{m}$ em criostato (Leica Biosystems modelo CM1860) a $-16\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os cortes foram aderidos a lâminas previamente gelatinizadas, permanecendo a -20°C até a realização da imunofluorescência.

3.5 Análises plasmáticas

As amostras de sangue coletadas no momento da eutanásia dos camundongos foram utilizadas para avaliar quantitativamente as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triacilglicerol feitas por método enzimático colorimétrico utilizando um espectrofotômetro automático e kits comerciais de acordo com as instruções especificadas (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações plasmáticas de insulina, leptina e adiponectina foram realizadas em duplicata, utilizando kits de ensaio imunoenzimático específicos para camundongos (Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat (EZRMI-13K); Rat/Mouse Leptin ELISA kit Cat (EZML- 82K); Rat/Mouse Adiponectin ELISA kit Cat (EZMADP-60K), Millipore, Missouri, USA). Além disso, foi realizado o índice de resistência à insulina em jejum: FIRi = glicose*insulina/25 (102).

3.6 Imunofluorescência e microscopia confocal a varredura laser

As lâminas com os cortes previamente armazenados a -20° C foram retirados do freezer para ambientação, alocadas em câmara úmida e, em seguida, tratadas com solução de PBS-Triton a 0,3% e bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino durante uma hora, imunomarcadas com os anticorpos primários NPY e POMC diluídos em PBS/BSA 1%, permanecendo em refrigeração durante a noite. Na manhã seguinte, as amostras foram lavadas e imunomarcadas com um anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa, contra-corados com dicloridrato de 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Finalmente, as lâminas foram montadas com *slow-fade* (Invitrogen) com a finalidade de manter a fluorescência. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

As imagens foram identificadas e obtidas em microscópio confocal a *laser* (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Modelo C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA) e um atlas foi utilizado para auxiliar a observação da citoarquitetura das áreas do hipotálamo, compreendendo o núcleo arqueado (ARC) correspondente a região de bregma -1,23 mm a -2,79mm (103) ilustrada na Figura 5. Vale ressaltar que nessa faixa de bregma, o 3v assume diferentes configurações.

com ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade da banda foi quantificada com o software ImageJ (v. 1.49, NIH, ImageJ.nih.gov/ij, EUA).

3.8 qPCR

Os hipotálamos e o tecido adiposo epididimário, dissecados previamente, congelados em nitrogênio líquidos e estocados a -80°C , tiveram o RNA total extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, adicionou-se clorofórmio PA sobre o material e este foi centrifugado (12 min a 120 g a 4°C) para retirar resíduos de DNA remanescentes. Ao sobrenadante coletado, foi adicionado isopropanol e novamente centrifugado, desprezando-se o sobrenadante das amostras e adicionando-se álcool 70 % para purificar o material genético. Em seguida, o conteúdo foi descartado, acrescentando-se água deionizada para a ressuspensão do RNA. Finalmente, o material foi homogeneizado e levado ao banho seco por cinco minutos.

A concentração de RNA foi determinada usando a espectroscopia Nanovue (GE Life Sciences), e 1 μg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) para eliminar qualquer resíduo de DNA e depois foi adicionado EDTA para interromper a reação. A síntese do cDNA da primeira cadeia foi realizada usando primers Oligo (dT) e transcriptase reversa superscript III (ambos de Invitrogen) a partir do mRNA e ao terminar a síntese, o material foi armazenado a -20°C . Para a análise, o material reservado foi previamente retirado do freezer para ambientação e uma mistura de água deionizada, ROX, mix SYBRGreen (Invitrogen) e primer, foi adicionada para que o DNA fosse amplificado e quantificado. Após a pré-desnaturação e ativação da polimerase por 4 min a 95°C , 40 ciclos foram realizados (90°C por 10 seg e 60°C por 15 seg) seguido de uma curva de fusão (60 a 95°C com taxa de aquecimento de $0,1^{\circ}\text{C/s}$). Os controles negativos foram feitos em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada. O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) usou um sistema termociclador Step One Plus (Applied Biosystems).

Os primers (Figura 6) foram projetados usando o software Primer3 (104, 105) para *Npy*, *Pomc*, *Leptina*, *Obrb*, *Socs3*, *Tnf- α* , *Il-1 β* e *Il-6*. A *β -actina* foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados. A

eficiência do qPCR para o gene alvo e controle endógeno são aproximadamente iguais e foram calculados através de uma série de diluição de cDNA. A razão de expressão do mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $-\Delta Ct$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e do controle endógeno (106). A nomenclatura de genes e proteínas foi utilizada de acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura Genética Padronizada para Camundongos (107).

Figura 6 - Sequências dos primers utilizados no qPCR

Primer	5'-3'	3'-5'
<i>β actin</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTCTTGAAGGTCTCAA
<i>Il 1β</i>	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
<i>Il 6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Leptin</i>	CCTGTGGCTTTGGTCCTATC	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
<i>Npy</i>	TGGACTGACCCTCGCTCTAT	TAGTGTGCGCAGAGCGGAGTA
<i>Obr b</i>	ACACTGTTAATTTACACCAGAG	TGGATAAACCCCTTGCTCTTCA
<i>Pomc</i>	CATTAGGCTTGGAGCAGGTC	CTTCTCGGAGGTCATGAAGC
<i>Socs 3</i>	CTTCAGCTCCAAAAGCGAGT	AGCTGTGCGGATAAGAAAG
<i>Tnf α</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

Legenda: Interleucina (*Il*); neuropeptídeo Y (*Npy*); forma longa do receptor de leptina (*Obrb*); pró-opiomelanocortina (*Pomc*); supressor da sinalização de citocina (*Socs*); fator de necrose tumoral (*Tnf*).

Fonte: Untergasser et al. (104) e Koressaar e Remm (105).

3.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram testadas com Análise de Variância (ANOVA) de Brown-Forsythe e Welch, não assumindo que as amostras eram homocedásticas, e teste de comparação múltipla T3 de Dunnett, indicado para amostras pequenas (108).

Para a análise de interação entre os tipos de dieta (dieta controle *versus* dieta hiperlipídica) e o tipo de intervenção (dieta *versus* JI), foi utilizada a análise de variância ANOVA de dois fatores. O nível de significância $P < 0,05$ foi considerado

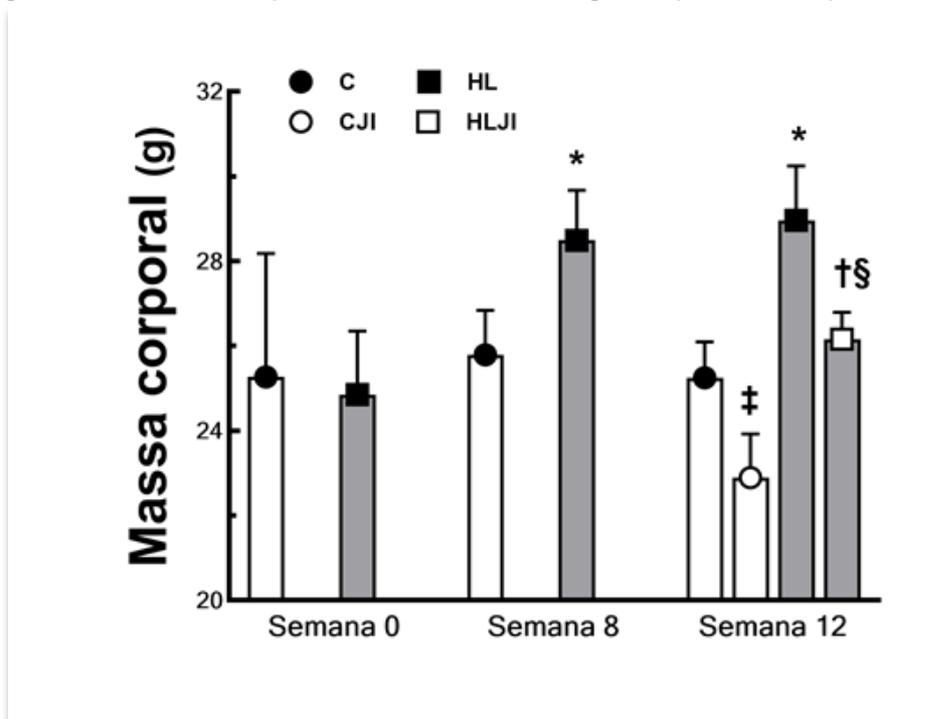
estatisticamente significativo (GraphPad Prism v. 8.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética

Inicialmente a MC do grupo HL não teve diferença significativa quando comparado ao grupo C. Na 8ª semana a MC aumentou em +10 % no grupo HL em contraste ao grupo C. No momento que foi iniciado o JI na 8ª semana a MC foi progressivamente diminuindo com resultados significativos em relação às contrapartes sem JI. Na 12ª semana a MC no grupo HL foi maior em +15 % em relação ao grupo C. No entanto, o JI diminuiu em -10 % a massa corporal nos grupos CJI e HLJI em comparação aos seus homólogos (Figura 7). A ingestão alimentar não apresentou diferença entre os grupos durante todo o estudo. Entretanto, a ingestão energética foi maior em +25 % no grupo HL em contraste ao grupo C, e em +27% no grupo HLJI alternativamente ao grupo CJI. A ingestão alimentar e energética cumulativa apresentaram uma redução de -50 % nos grupos submetidos ao JI em relação às suas contrapartes. Entretanto, nos grupos HL e HLJI, a ingestão energética total foi maior em +27 % e +24 %, respectivamente em relação aos seus homólogos (Tabela 2).

Figura 7 - Massa corporal analisada ao longo do período experimental



Legenda: Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

Nota: Massa corporal analisada nos três principais pontos do estudo: início da ingestão alimentar (semana 0), após introdução da dieta (semana 8) e protocolo de jejum intermitente (semana 12). Média \pm DP (Semanas 0 e 8, n = 20 / grupo; semana 12, n = 10 / grupo), P <0,05 quando: C vs. CJI (‡), C vs. HL (*), CJI vs. HLJI (†), HL vs. HLJI (§).

Fonte: A autora, 2020.

Algumas mudanças significativas foram observadas nos depósitos de gordura epididimária, inguinal e retroperitoneal. O tecido adiposo epididimário foi maior em +111 % no grupo HL quando comparado ao grupo C. O JI foi capaz de reduzir esse depósito de gordura em -38 % no CJI e em -51 % no HLJI comparado aos seus homólogos. O tecido adiposo inguinal também foi maior no grupo HL em +66 % em relação ao grupo C e menor nos grupos submetidos ao JI em -22 % e -50 % quando comparados às suas respectivas contrapartes. Da mesma forma, o tecido adiposo retroperitoneal foi maior no grupo HL em +64 % quando comparado ao grupo C e em +42 % em relação ao grupo HLJI (Tabela 2).

Tabela 2 - Ingestão alimentar, consumo de energia, depósitos de gordura e parâmetros bioquímicos

Dados	C	CJI	HL	HLJI
Ingestão alimentar (g/dia alimentado/animal)	2,22±0,12	2,28±0,19	2,15±0,08	2,15±0,09
Ingestão alimentar (g/jejum/animal)	2,22±0,12	0†	2,15±0,08	0‡
Ingestão alimentar total (g/animal)	66,48±3,49	34,32±2,85†	64,50±2,51	32,31±1,46‡
Consumo de energia (kJ/dia alimentado)	35,93±1,21	35,51±1,66	44,53±1,79†	45,06±1,98
Consumo de energia total (kJ/animal)	1058±55,43	546±45,41†	1349±52,47†	676±30,59‡
TA epididimal (g)	0,39±0,03	0,24±0,06†	0,83±0,09†	0,41±0,02‡
TA inguinal (g)	0,19±0,01	0,15±0,02	0,32±0,03†	0,16±0,02‡
TA retroperitoneal (g)	0,14±0,02	0,09±0,01	0,24±0,02†	0,14±0,04‡
Colesterol total (mg/dL)	115,7±10,87	113,26±11,30	160,30±11,22†	134,92±4,35‡
Triacilglicerol (mg/dL)	63,82±2,34	61,50±6,56	101,53±2,98†	66,68±9,87‡

Legenda: Grupos, C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica); JI (jejum intermitente); TA, tecido adiposo.

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). $P < 0,05$, quando: †≠C; ‡≠HL.

Fonte: A autora, 2020.

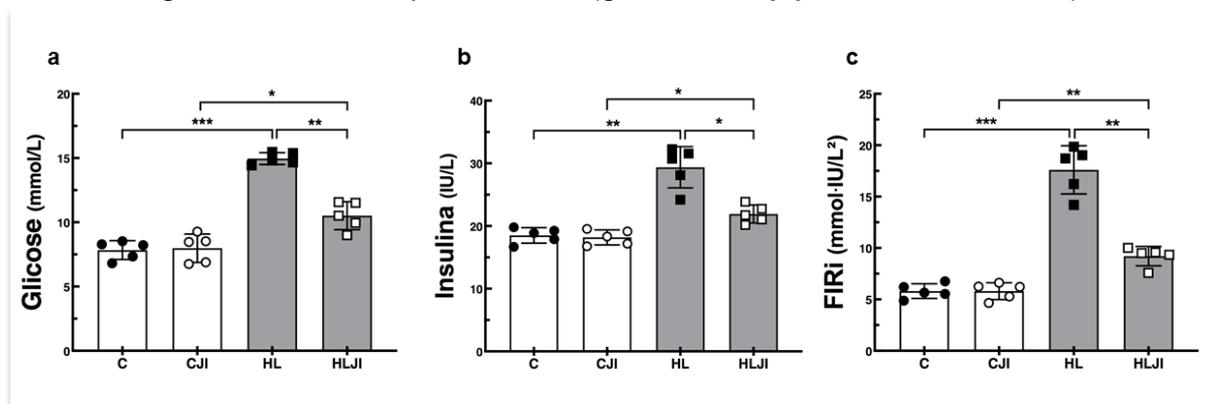
4.2 Análises plasmáticas

Os animais do grupo HL apresentaram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triacilglicerol (+60%) e colesterol total (+38%), quando comparado ao grupo C, e uma redução nesses parâmetros no grupo HLJI (-34% e -16%), respectivamente, em contraste à sua contraparte. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 2. A glicemia também aumentou em HL (+90%) *versus* C e diminuiu no HLJI (-30%) *versus* HL. No entanto, HLJI foi maior em +32 % quando comparado ao grupo CJI (Figura 8a).

A insulina (Figura 8b) e o FIRi (Figura 8c) se comportaram de maneira similar aumentando no grupo HL quando comparados ao C (+60%) e (+203%), respectivamente. O JI foi capaz de diminuir a resistência à insulina, visto que tanto a insulina quanto o FIRi diminuíram no grupo HLJI *versus* HL (-25%) e (-48%). Ambos

os parâmetros foram maiores em HLJI (+21 %) e (+74 %) quando comparados ao CJI, respectivamente.

Figura 8 - Análises plasmáticas (glicemia de jejum, insulina e FIRi)



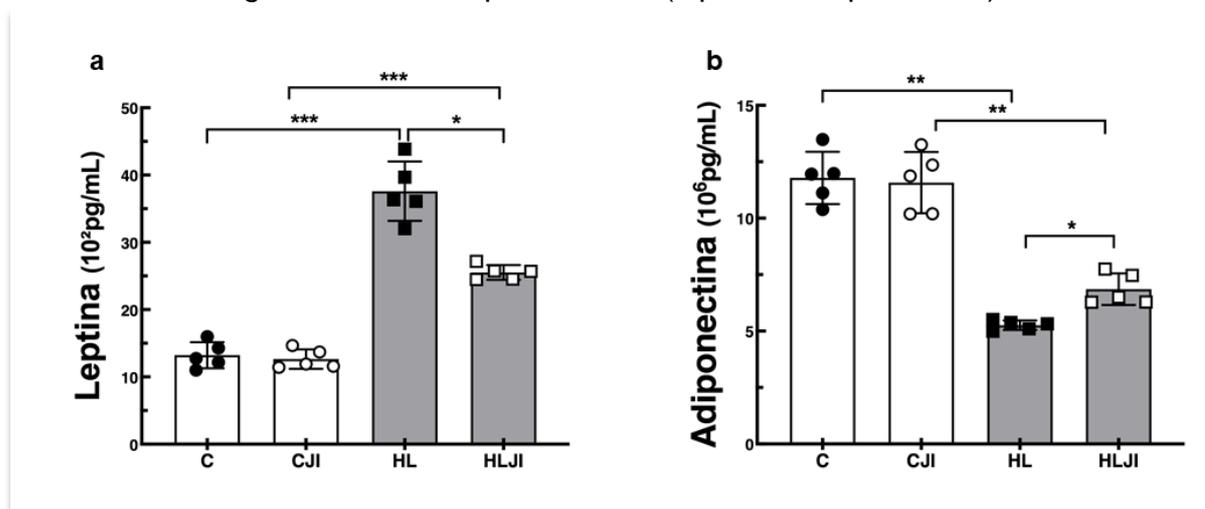
Legenda: (a) Glicemia de jejum, (b) Insulina, (c) FIRi (índice de resistência à insulina) Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

A leptina apresentou um aumento de +184 % em HL *versus* C e de +102 % em HLJI *versus* CJI. No entanto, HLJI foi menor em -32 % quando comparado a HL (Figura 9a). Já a adiponectina, sofreu uma redução de -55 % no grupo HL em contraste ao grupo C e de -41 % no HLJI em relação ao CJI. Entretanto, o grupo HLJI aumentou em +30 % quando comparado a HL (Figura 9b).

Figura 9- Análises plasmáticas (leptina e adiponectina)



Legenda: (a) Leptina, (b) Adiponectina. Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

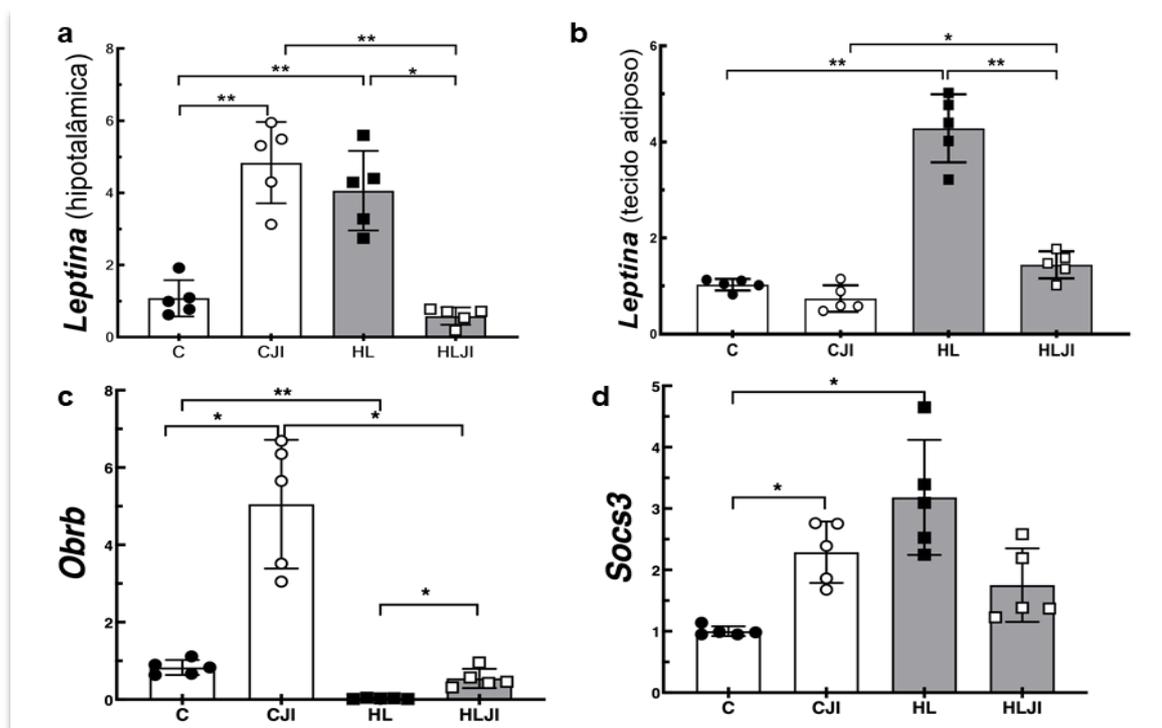
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

4.3 Expressão gênica e proteica

A expressão gênica da *leptina* hipotalâmica aumentou significativamente em +276 % no grupo HL quando comparado ao grupo C. Entretanto, o grupo CJI foi maior em +347 % contraste ao seu homólogo. Além disso, houve um decréscimo de -88 % e -85 % em HLJI *versus* CJI e HL, respectivamente (Figura 10a). A *leptina* do tecido adiposo epididimário aumentou em HL *versus* C em +318 % e diminuiu em -66 % em relação ao seu homólogo, que foi maior em +95 % quando comparado ao CJI (Figura 10b). O receptor *Obrb* apresentou um declínio de -97% em HL em relação ao C. No entanto, o grupo CJI foi maior em +510 % quando comparado à sua contraparte. Adicionalmente, houve um aumento de 1908% em HLJI quando comparado ao grupo HL e um decréscimo de -89% em HLJI *versus* CJI (Figura 10c). A expressão do gene do *Socs3* apresentou um aumento de +218 % em HL *versus* C e de +130 % em CJI relação à sua contraparte (Figura 10d).

Figura 10 - Expressão gênica no hipotálamo (*Leptina*, *Obrb* e *Socs3*)



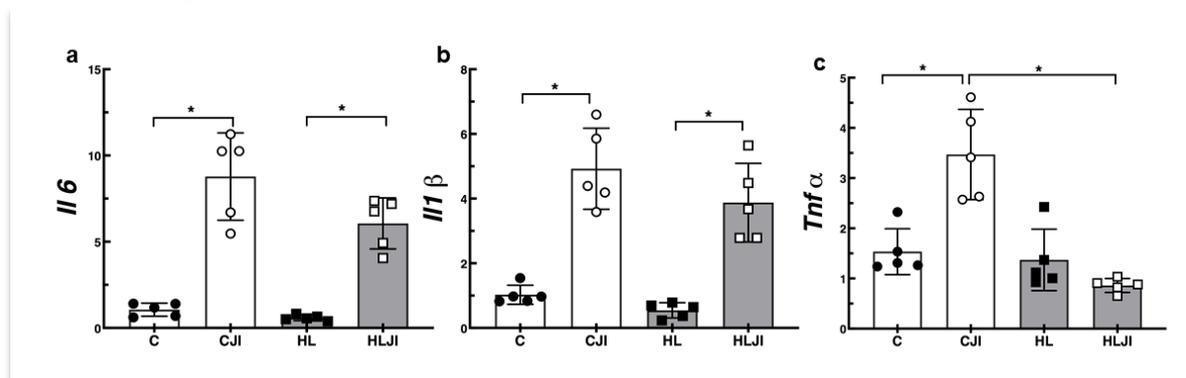
Legenda: (a) *Leptina* (hipotalâmica), (b) *Leptina* (tecido adiposo epididimário), (c) *Obrb* (receptor de leptina de cadeia longa), (d) *Socs3* (supressor de sinalização de citocina 3). Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias *Il-6* (Figura 11a) e *Il-1 β* (Figura 11b) foram similares com um aumento significativo em CJI versus C (*Il-6*, +728 %; *Il-1 β* , +379 %), e em HLJI versus HL (*Il-6*, +933 %; *Il-1 β* , +612 %). O *Tnf- α* (Figura 11c) aumentou em +126 % CJI em relação à sua contraparte e reduziu em -75 % no grupo HLJI quando comparado ao grupo CJI.

Figura 11 - Expressão gênica no hipotálamo (*Il 6*, *Il-1 β* e *Tnf- α*)



Legenda: (a) *Il 6* (interleucina 6), (b) *Il-1 β* (interleucina 1 beta), (c) *Tnf- α* (fator de necrose tumoral alfa). Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

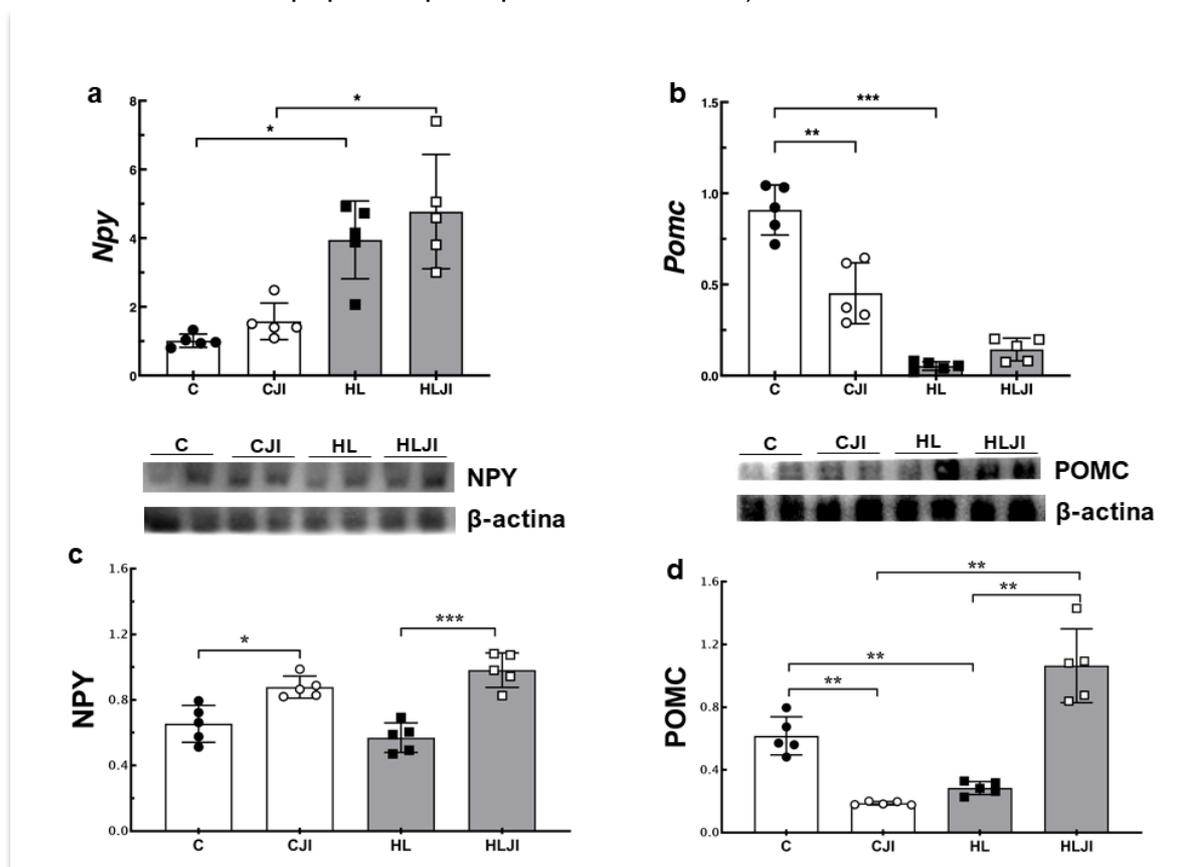
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

A expressão gênica do *Npy* (Figura 12a) aumentou em +289 % no grupo HL quando comparado ao grupo C e em +203 % no grupo HLJI versus CJI. Em contrapartida, a expressão de *Pomc* (Figura 12b) reduziu em -94 % em HL em relação ao C e em -50 % em CJI versus C.

A expressão proteica de NPY (Figura 12c) foi maior nos grupos submetidos ao JI, sendo em +34 % no grupo CJI versus C, e em +72 % em HLJI versus HL. A expressão proteica de POMC (Figura 12d) diminuiu em -70 % em CJI em relação ao grupo C. O grupo HL foi menor em -54 % quando comparado ao C. O jejum aumentou a expressão proteica de POMC nos grupos HLJI em +275 % versus HL e em +468 % versus CJI.

Figura 12 - Expressão gênica e proteica no hipotálamo (neuropeptídeo Y e neuropeptídeo pró-opiomelanocortina)



Legenda: (a) *Npy* (neuropeptídeo Y), (b) *Pomc* (neuropeptídeo pró-opiomelanocortina), (c) NPY e bandas representativas, (d) POMC e bandas representativas. Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

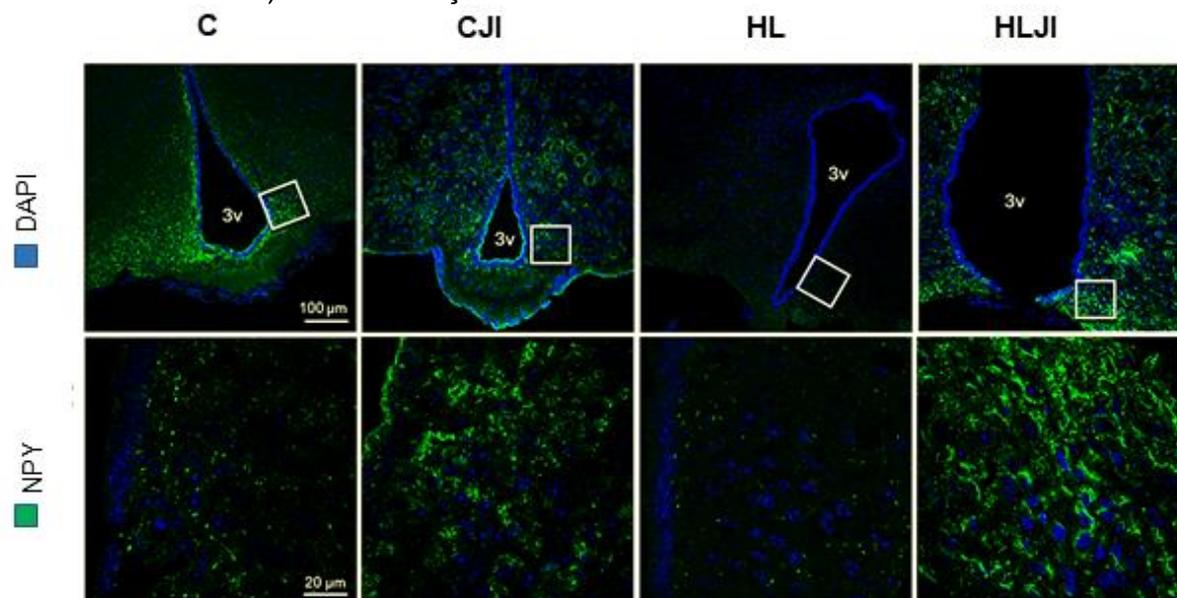
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n = 5/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

4.4 Imunofluorescência e Microscopia Confocal a Laser

Na região do núcleo arqueado no hipotálamo pode ser observada a expressão proteica dos neuropeptídeos NPY (orexígeno) e POMC (anorexígeno) através da intensa marcação em verde de NPY nas fibras nervosas ao redor do terceiro ventrículo que ascendem do núcleo arqueado até o núcleo paraventricular, sobretudo nos grupos submetidos ao jejum (Figura 13). Em contrapartida, a marcação do neuropeptídeo POMC foi menor em todos os grupos (Figura 14).

Figura 13 - Fotomicrografias de cortes coronais do hipotálamo (microscopia confocal a laser) com marcação de NPY

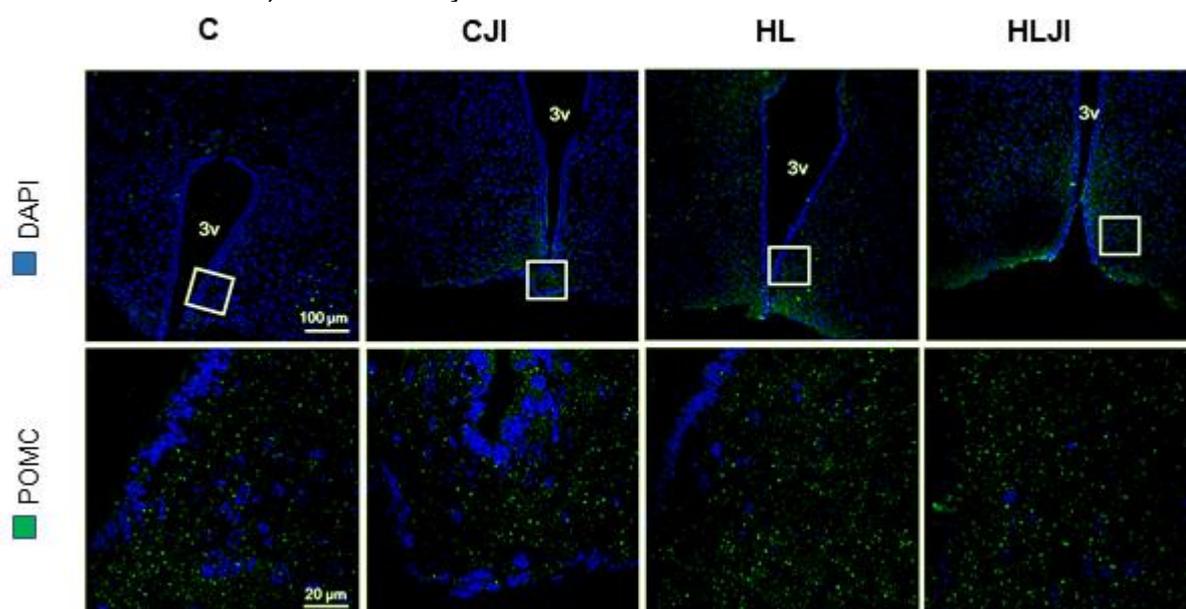


Legenda: 3v, terceiro ventrículo. Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

Nota: Marcação de NPY (verde Alexa 488) e núcleos em azul (DAPI). As áreas indicadas na linha superior foram aumentadas e estão apresentadas na linha inferior.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 14 - Fotomicrografias de cortes coronais do hipotálamo (microscopia confocal a laser) com marcação de POMC



Legenda: 3v, terceiro ventrículo. Grupos: C (dieta controle), HL (dieta hiperlipídica), JI (jejum intermitente).

Nota: Marcação de POMC (verde Alexa 488) e núcleos em azul (DAPI). As áreas indicadas na linha superior foram aumentadas e estão apresentadas na linha inferior.

Fonte: A autora, 2020.

4.5 ANOVA de dois fatores: dieta *versus* jejum intermitente

A Tabela 3 resume os efeitos da dieta, do JI e da interação entre ambos nos resultados. Foram analisados dez parâmetros metabólicos/biométricos e a expressão de onze marcadores moleculares no hipotálamo/tecido adiposo branco (gordura epididimária). A dieta foi significativa em 9/10 dos dados de metabolismo (90 %) e em 8/11 dos marcadores moleculares (73 %). O JI foi significativo em 7/10 dos dados do metabolismo (70 %) e 8/11 dos marcadores moleculares (73 %). A interação entre as intervenções foi significativa em 6/10 dos dados metabólicos (60 %) e 8/11 dos genes e proteínas expressos no hipotálamo (73 %).

Tabela 3 - ANOVA de dois fatores: dieta vs. jejum intermitente

Dados	% de variação e teste de significância					
	Dieta		Jejum intermitente		Interação	
	%	P	%	P	%	P
Biometria e Bioquímica						
Adiponectina	88,10	<0,001	1,34	ns	2,28	ns
Colesterol total	63,25	<0,001	11,15	0,006	7,58	0,02
FIRi	58,30	<0,001	17,82	<0,001	17,80	<0,001
Glicemia	65,25	<0,001	12,94	<0,001	14,76	<0,001
Ingestão alimentar	ns	ns	ns	ns		ns
Ingestão energética	90,39	<0,001	0,02	ns	0,08	ns
Insulina	56,77	<0,001	16,09	<0,001	13,61	0,001
Leptina	78,62	<0,001	9,07	<0,001	7,48	<0,001
Massa corporal (semana 12)	55,62	<0,001	30,34	<0,001	0,21	ns
Triacilglicerol	38,53	<0,001	28,94	<0,001	22,16	<0,001
Marcadores moleculares						
<i>Il-1 β</i>	3,60	ns	80,22	<0,001	0,48	ns
<i>Il-6</i>	4,70	0,03	80,07	<0,001	2,32	ns
<i>Leptina</i> (hipotalâmica)	2,56	ns	0,12	ns	83,08	<0,001
<i>Leptina</i> (TA epididimal)	45,91	<0,001	28,68	<0,001	19,11	<0,001
<i>Npy</i>	70,12	<0,001	3,58	ns	0,12	ns
NPY	ns	ns	72,74	<0,001	6,31	0,04
<i>Obrb</i>	34,78	<0,001	27,76	<0,001	16,94	0,002
<i>Pomc</i>	69,40	<0,001	6,86	0,002	15,34	<0,001
POMC	14,02	<0,001	5,81	0,01	69,25	<0,001
<i>Socs3</i>	18,12	0,008	0,13	ns	49,60	<0,001
<i>Tnfα</i>	38,04	<0,001	10,05	0,02	29,56	<0,001

Legenda: Índice de resistência à insulina (FIRi); interleucina (*Il*); neuropeptídeo Y (*Npy*); forma longa do receptor de leptina (*Obrb*); pró-opiomelanocortina (*Pomc*); supressor da sinalização de citocina (*Socs*); fator de necrose tumoral (*Tnf*).

Fonte: A autora, 2020.

5 DISCUSSÃO

A alimentação é uma das funções fisiológicas básicas, necessária para a manutenção da homeostase fisiológica. Um estado de homeostase energética reflete o equilíbrio entre consumo e gasto de energia. Essa harmonia é garantida e modulada por sinais periféricos integrados pelo hipotálamo que refletem o estado energético do corpo (2). Embora a dieta rica em gordura seja um potente indutor da obesidade em camundongos, o JI demonstrou ser uma alternativa eficiente na redução da massa corporal, melhorando o metabolismo lipídico e a glicemia (92). Neste estudo, a massa corporal aumentou durante o consumo de uma dieta rica em gordura até a oitava semana sem jejum, conforme esperado.

Os animais submetidos ao JI têm metade da ingestão calórica dos animais alimentados livremente. No entanto, esses animais não aumentaram sua ingestão de alimentos para compensar os dias do JI, ou seja, nos dias que se alimentavam *ad libitum* não comiam demais por causa do jejum do dia anterior. Portanto, não houve diferença na ingestão de alimentos ao longo do estudo, referente ao dia de alimentação. Porém, houve uma diferença na ingestão acumulada de alimentos (considerando todos os dias). Resultados anteriores do nosso grupo (92), bem como de outros (9), concordam com os presentes achados. No entanto, o consumo de energia foi maior no grupo HL, fato que pode ser atribuído a maior composição calórica da dieta hiperlipídica.

Como resultado, também ocorreram alterações no metabolismo lipídico e na glicemia. O JI diminui o total de horas disponíveis para a ingestão de alimentos e, portanto, pode reduzir o consumo total de energia, porque, embora a dieta seja irrestrita em outros dias, o déficit calórico gerado pelo jejum não é compensado. Deste modo, reduz-se o risco de obesidade (8, 9).

Nossos achados corroboram pesquisas anteriores sobre JI, mostrando uma diminuição na massa corporal e melhorando os parâmetros bioquímicos (8, 9, 92, 109, 110).

A leptina plasmática geralmente aumenta na obesidade e, quando é incapaz de impedir o ganho de peso, indica resistência à leptina (111). O presente estudo demonstrou um aumento significativo da leptina plasmática em camundongos obesos, corroborando a hipótese de resistência à leptina. Nos grupos submetidos ao

jejum, os níveis plasmáticos de leptina diminuíram. Um estudo recente sugeriu que essa diminuição também pode estar ligada à melhora do metabolismo de carboidratos (92). Ao contrário da leptina, a adiponectina foi reduzida no grupo HL, e mostrou um aumento significativo com o JI. A deficiência de adiponectina prejudica o metabolismo lipídico e induz a resistência à insulina, aumentando o risco de lesão vascular e aterosclerose (111).

Nossos achados também demonstraram um aumento da insulina plasmática no grupo HL, o que é esperado no camundongo C57BL/6 devido à sua predisposição ao desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus e obesidade (112, 113), e houve redução da insulina plasmática após o JI.

Além das consequências metabólicas, é importante observar os efeitos neurais do JI em camundongos expostos à obesidade induzida por dieta. Shu Lin et al. demonstraram que níveis elevados de leptina plasmática causados pelo consumo de uma dieta rica em gordura podem levar à regulação negativa do receptor de leptina no cérebro (6). Na ausência de obesidade, a leptina está predominantemente ligada ao seu receptor. Por outro lado, na obesidade, altos níveis de leptina livre ativa no cérebro dessensibilizam o receptor e aumentam a resistência à leptina (79, 114). Nossos achados sugerem uma diminuição do receptor *Obrb* no grupo HL. A expressão do gene da *leptina* aumentou no grupo HL, sugerindo resistência à leptina. Vários estudos mostram a relação entre o aumento da expressão do gene *Socs3* e a resistência à leptina em resposta à obesidade induzida por dieta (112, 115-117). Um estudo feito com camundongos C57BL/6 com deficiência heterozigótica de *Socs3* apresentou maior sensibilidade à leptina e perda de peso expressiva (118). O presente estudo aponta para um aumento significativo da expressão de *Socs3* em animais alimentados com dieta hiperlipídica, corroborando com a hipótese de resistência à leptina. Sendo o hipotálamo a região do cérebro responsável pela integração de sinais que refletem o *status* metabólico do organismo e a regulação da homeostase energética, é fácil entender por que essa área é tão suscetível aos efeitos da dieta hiperlipídica.

Os neuropeptídeos NPY e POMC participam da regulação energética (119). A expressão do gene *Npy* no núcleo arqueado foi aumentada no grupo HL, como esperado em camundongos obesos que superexpressam neuropeptídeos orexigênicos, gerando hiperfagia em resposta, enquanto a expressão de *Pomc* foi reduzida, o que concorda com a literatura (120). Além disso, foi observado no

presente estudo um aumento na expressão da proteína NPY nos grupos submetidos ao JI comparado a grupos alimentados *ad libitum*, o que já é esperado visto que a privação de alimentos aumenta a liberação de NPY no ARC e PVN (121). Embora o grupo HL tenha reduzido os níveis de NPY, essa questão é controversa, porque estudos mostraram que uma dieta rica em gordura, por exemplo, reduz os níveis de NPY (122, 123), enquanto outros estudos mostraram que uma dieta rica em gordura estava associada a níveis aumentados de NPY (124, 125). Curiosamente, a expressão da proteína POMC também aumentou no grupo HLJI quando comparado ao seu homólogo, sugerindo uma possível melhora na resposta anorexigênica.

Estes dados foram confirmados pela presença desses neuropeptídeos em microscopia confocal a *laser*. Os neurônios anorexigênicos mais estudados no ARC são os neurônios pró-opiomelanocortina (POMC), pois sintetizam o POMC, que pode ser clivado em vários peptídeos, como a cocaína e a transcrição regulada por anfetamina (CART), que diminuem a ingestão de alimentos. A maioria desses peptídeos está no núcleo arqueado e se estende principalmente para as áreas do núcleo paraventricular, hipotálamo lateral e tronco cerebral, todos associados ao controle do balanço energético (126).

Durante o desenvolvimento fetal, há uma grande expressão do gene *Pomc* nos neurônios localizados ventralmente no diencéfalo em desenvolvimento que contêm os progenitores de uma fração da rede POMC hipotalâmica adulta (127). A leptina pela via JAK2/STAT3 estimula a expressão do gene *Pomc* no hipotálamo (128), o qual é expresso em milhares de neurônios do hipotálamo (126). Camundongos com deleção do gene *Pomc* foram a prova definitiva de que peptídeos derivados de POMC são cruciais para a regulação da homeostase energética (129). Esses camundongos apresentam hiperfagia, causando ganho excessivo de massa corporal (64). Além disso, estudos mostram que mutações genéticas no gene *Pomc* causam obesidade em humanos (130, 131).

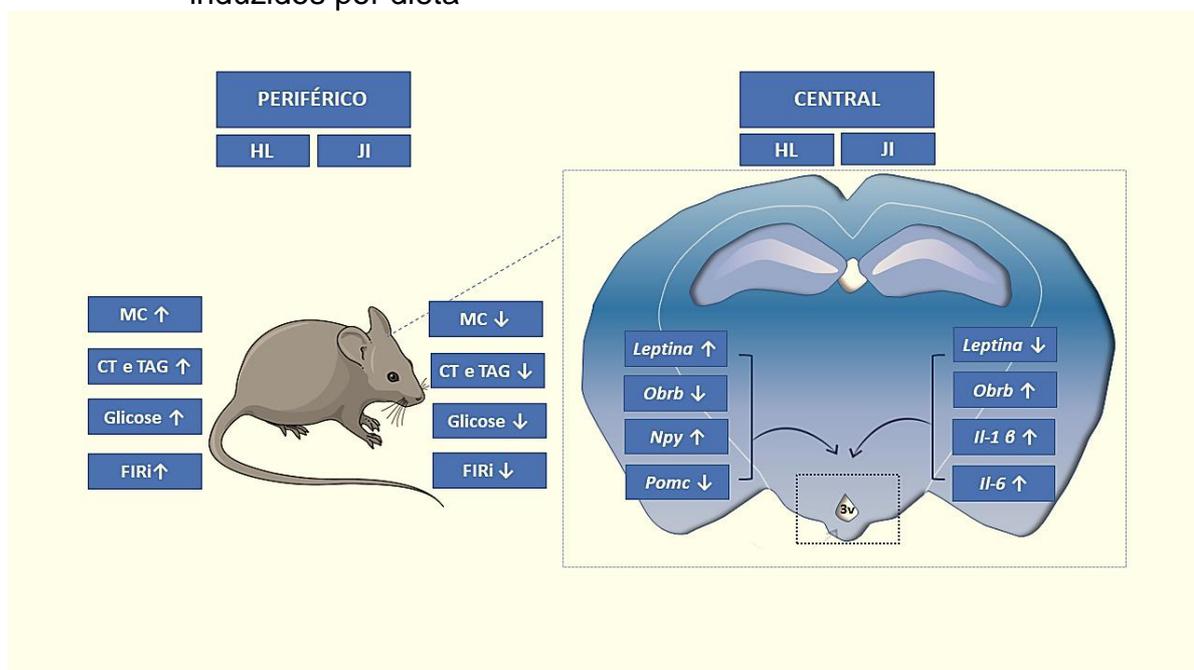
A inflamação hipotalâmica tem sido correlacionada ao desenvolvimento e progressão da obesidade, além de ser considerada o principal fator de desregulação dos mecanismos celulares que medeiam a fisiopatologia da obesidade (132). O ARC do hipotálamo é um dos alvos mais importantes das citocinas pró-inflamatórias de ação central (133). Na obesidade induzida por dieta, a inflamação ocorre no hipotálamo mediobasal (MBH), que contém o ARC e a eminência mediana (EM) (134). De Souza et al., em 2005, descreveram a inflamação associada à obesidade

ativando vias inflamatórias no hipotálamo de animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas, resultando na regulação positiva de *Tnf- α* , *Il-1 β* e *Il-6* (74). Em nossos experimentos, apesar da dieta rica em gordura administrada por 8 semanas ter causado obesidade nos animais, não houve uma resposta inflamatória local no hipotálamo, o que pode ser uma limitação do nosso estudo. Um estudo recente em camundongos C57BL/6 submetidos a um protocolo alimentar comparável ao utilizado não mostrou diferenças na expressão gênica de *Tnf- α* e *Il-6* no hipotálamo entre os grupos C e HL (135). Os dados são consistentes com o conceito de inflamação de baixo grau que ocorre no desenvolvimento e manutenção da obesidade (136, 137). Curiosamente, em nossos achados, as citocinas pró-inflamatórias *Il-1 β* e *Il-6* aumentaram nos grupos submetidos ao JI, mas o *Tnf- α* diminuiu no grupo HLJI, levantando uma importante questão da utilização do JI a longo prazo para tratamento coadjuvante em distúrbios metabólicos.

CONCLUSÃO

Os achados do nosso estudo demonstraram o efeito do JI na redução da massa corporal, na melhora do metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina, bem como na leptina e adiponectina à nível periférico. Além disso, o JI foi capaz de reduzir uma provável resistência central à leptina ocasionada pela dieta hiperlipídica, aumentando também a expressão do seu receptor no hipotálamo. Entretanto, houve um aumento na expressão hipotalâmica de marcadores pró-inflamatórios nos camundongos, sugerindo que o JI pode ter efeitos adversos que devem ser mais investigados para que se institua o mesmo como medida não farmacológica no tratamento de distúrbios metabólicos. A Figura 15 mostra resumidamente os principais efeitos periféricos e centrais do JI em camundongos obesos induzidos por dieta.

Figura 15 - Representação gráfica resumida dos principais efeitos periféricos e centrais obtidos do jejum intermitente em camundongos obesos induzidos por dieta



Legenda: Índice de resistência à insulina (FIRi); dieta hiperlipídica (HL); jejum intermitente (JI); massa corporal (MC); colesterol total (CT); triacilglicerol (TAG); interleucina (Il); neuropeptídeo Y (Npy); forma longa do receptor de leptina (Obrb); pró-opiomelanocortina (Pomc).

Fonte: A autora, 2020.

REFERÊNCIAS

1. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Santos CF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(3):212-23.
2. Carmo-Silva S, Cavadas C. Hypothalamic Dysfunction in Obesity and Metabolic Disorders. *Adv Neurobiol.* 2017;19:73-116.
3. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404(6778):661-71.
4. Gonnissen HK, Hulshof T, Westerterp-Plantenga MS. Chronobiology, endocrinology, and energy- and food-reward homeostasis. *Obes Rev.* 2013;14(5):405-16.
5. Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. *Physiol Behav.* 2016;153:47-55.
6. Lin S, Storlien LH, Huang XF. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res.* 2000;875(1-2):89-95.
7. Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):642-52.
8. Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:371-93.
9. Gotthardt JD, Verpeut JL, Yeomans BL, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA, et al. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss With Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology.* 2016;157(2):679-91.
10. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(1):7-13.
11. Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva CC, Masselli Dos Reis IG, Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. *Endocrinology.* 2014;155(7):2456-66.
12. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017;39:46-58.
13. Vannice G, Rasmussen H. Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J Acad Nutr Diet.* 2014;114(1):136-53.

14. Hofmann K, Lamberz C, Piotrowitz K, Offermann N, But D, Scheller A, et al. Tanycytes and a differential fatty acid metabolism in the hypothalamus. *Glia*. 2017;65(2):231-49.
15. Chianese R, Coccorello R, Viggiano A, Scafuro M, Fiore M, Coppola G, et al. Impact of Dietary Fats on Brain Functions. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(7):1059-85.
16. Dragano NR, Monfort-Pires M, Velloso LA. Mechanisms Mediating the Actions of Fatty Acids in the Hypothalamus. *Neuroscience*. 2019 Nov 2; S0306-4522(19)30698-0. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.012. Online ahead of print.
17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
18. Hohos NM, Skaznik-Wikiel ME. High-Fat Diet and Female Fertility. *Endocrinology*. 2017;158(8):2407-19.
19. Maher T, Clegg ME. Dietary lipids with potential to affect satiety: Mechanisms and evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(10):1619-44.
20. Green SM, Wales JK, Lawton CL, Blundell JE. Comparison of high-fat and high-carbohydrate foods in a meal or snack on short-term fat and energy intakes in obese women. *Br J Nutr*. 2000;84(4):521-30.
21. Obici S, Rossetti L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology*. 2003;144(12):5172-8.
22. Gerl MJ, Klose C, Surma MA, Fernandez C, Melander O, Mannisto S, et al. Machine learning of human plasma lipidomes for obesity estimation in a large population cohort. *PLoS Biol*. 2019;17(10):e3000443.
23. Lin C, Theodorides ML, McDaniel AH, Tordoff MG, Zhang Q, Li X, et al. QTL analysis of dietary obesity in C57BL/6byj X 129P3/J F2 mice: diet- and sex-dependent effects. *PLoS One*. 2013;8(7):e68776.
24. Chu DT, Malinowska E, Jura M, Kozak LP. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol Rep*. 2017 Apr;5(7):e13093. doi: 10.14814/phy2.13093.
25. Brockmann GA, Bevova MR. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet*. 2002;18(7):367-76.
26. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(2):173-81.

27. Reed DR, McDaniel AH, Li X, Tordoff MG, Bachmanov AA. Quantitative trait loci for individual adipose depot weights in C57BL/6ByJ x 129P3/J F2 mice. *Mamm Genome*. 2006;17(11):1065-77.
28. Almind K, Kahn CR. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2004;53(12):3274-85.
29. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav*. 2004;81(2):243-8.
30. Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2366-71.
31. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015;22(3):516-30.
32. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018;36(1):14-20.
33. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
34. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014;220(2):T1-T23.
35. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004;2(2):82-104.
36. Lauterbach MA, Wunderlich FT. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflugers Arch*. 2017;469(3-4):385-96.
37. Kim YD, Kim YH, Cho YM, Kim DK, Ahn SW, Lee JM, et al. Metformin ameliorates IL-6-induced hepatic insulin resistance via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) in mouse models. *Diabetologia*. 2012;55(5):1482-94.
38. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997;389(6651):610-4.
39. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
40. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1771-6.

41. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, Delbes AS, Castel J, Martinez S, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(5):725-37.
42. Burbidge S, Stewart I, Placzek M. Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Compr Physiol.* 2016;6(2):623-43.
43. Broadwell RD, Bleier R. A cytoarchitectonic atlas of the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1976;167(3):315-39.
44. Nishizuka M. Topography of the dopamine neurons in the arcuate nucleus of the mouse hypothalamus. *Acta Anat (Basel).* 1979;103(1):34-8.
45. Gao Y, Sun T. Molecular regulation of hypothalamic development and physiological functions. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4275-85.
46. Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell.* 2014;156(3):495-509.
47. Collins SC, Wagner C, Gagliardi L, Kretz PF, Fischer MC, Kessler P, et al. A Method for Parasagittal Sectioning for Neuroanatomical Quantification of Brain Structures in the Adult Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2018;8(3):e48.
48. Moriwaki C, Chiba S, Wei H, Aosa T, Kitamura H, Ina K, et al. Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus. *J Chem Neuroanat.* 2015;68:1-13.
49. Mikhaleva A, Kannan M, Wagner C, Yalcin B. Histomorphological Phenotyping of the Adult Mouse Brain. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016;6(3):307-32.
50. Chen XJ, Kovacevic N, Lobaugh NJ, Sled JG, Henkelman RM, Henderson JT. Neuroanatomical differences between mouse strains as shown by high-resolution 3D MRI. *Neuroimage.* 2006;29(1):99-105.
51. Elizondo-Vega R, Cortes-Campos C, Barahona MJ, Oyarce KA, Carril CA, Garcia-Robles MA. The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med.* 2015;19(7):1471-82.
52. Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(2):153-60.
53. Langlet F. Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(11):753-60.
54. Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides.* 2010;31(4):757-76.

55. Lemus MB, Bayliss JA, Lockie SH, Santos VV, Reichenbach A, Stark R, et al. A stereological analysis of NPY, POMC, Orexin, GFAP astrocyte, and Iba1 microglia cell number and volume in diet-induced obese male mice. *Endocrinology*. 2015;156(5):1701-13.
56. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol*. 2005;184(2):291-318.
57. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*. 1993;133(4):1753-8.
58. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*. 1996;274(5293):1704-7.
59. Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*. 1986;7(6):1189-92.
60. Thorsell A, Heilig M. Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides*. 2002;36(2-3):182-93.
61. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 1997;278(5335):135-8.
62. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*. 1998;1(4):271-2.
63. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*. 2005;8(10):1289-91.
64. Coll AP, Challis BG, Lopez M, Piper S, Yeo GS, O'Rahilly S. Proopiomelanocortin-deficient mice are hypersensitive to the adverse metabolic effects of glucocorticoids. *Diabetes*. 2005;54(8):2269-76.
65. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998;19(2):155-7.
66. Pritchard LE, Turnbull AV, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol*. 2002;172(3):411-21.
67. Loh K, Herzog H, Shi YC. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(3):125-35.
68. Challis BG, Coll AP, Yeo GS, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher RR, et al. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4695-700.

69. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.* 1999;5(9):1066-70.
70. Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1212:97-113.
71. Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 2006;89(5):687-91.
72. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):5-12.
73. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, et al. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes.* 2004;53(5):1253-60.
74. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005;146(10):4192-9.
75. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.
76. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 1997;387(6629):206-9.
77. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999;130(8):671-80.
78. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763-70.
79. Cui H, Lopez M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(6):338-51.
80. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, et al. Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2009;514(5):518-32.
81. Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab.* 2005;2(6):411-20.
82. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 1992;13(3):387-414.
83. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci.* 2002;5(6):566-72.

84. Marks JL, Porte D, Jr., Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 1990;127(6):3234-6.
85. Menendez JA, Atrons DM. Insulin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res*. 1991;555(2):193-201.
86. Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan XM, et al. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med*. 2002;8(2):179-83.
87. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487):2122-5.
88. Sadeghirad B, Motaghipisheh S, Kolehdoz F, Zahedi MJ, Haghdoost AA. Islamic fasting and weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr*. 2014;17(2):396-406.
89. Soeters MR, Lammers NM, Dubbelhuis PF, Ackermans M, Jonkers-Schuitema CF, Fliers E, et al. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid, or protein metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(5):1244-51.
90. Halberg N, Henriksen M, Soderhamn N, Stallknecht B, Ploug T, Schjerling P, et al. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;99(6):2128-36.
91. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014;19(2):181-92.
92. Marinho TS, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition*. 2019;65:103-12.
93. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 2002;417(6886):329-35.
94. Froy O, Miskin R. Effect of feeding regimens on circadian rhythms: implications for aging and longevity. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(1):7-27.
95. Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, Mattson MP. Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1264:49-63.
96. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab*. 2016;23(6):1048-59.
97. Marinho TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. *Int J Morphol*. 2019;37(4):1331-4.
98. Marinho TS, Borges CC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet. *J Diabetes Complications*. 2020;34:107497.

99. Spezani R, da Silva RR, Martins FF, de Souza Marinho T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. *J Nutr Biochem*. 2020;83:108419.
100. Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int*. 2003;23(5):363-70.
101. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012 Jul 30;(65):3564. doi: 10.3791/3564.
102. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet*. 1995;346(8967):120-1.
103. Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Amsterdam: Academic Press; 2013.
104. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115.
105. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289-91.
106. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
107. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. *Gene*. 1994;147(2):157-60.
108. Dunnett CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. *J Amer Statist Ass*. 1980;75:796-800.
109. Antoni R, Johnston KL, Collins AL, Robertson MD. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. *Proc Nutr Soc*. 2017;76(3):361-8.
110. Tinsley GM, La Bounty PM. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. *Nutr Rev*. 2015;73(10):661-74.
111. Ahima RS, Antwi DA. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(4):811-23.
112. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab*. 2007;5(3):181-94.
113. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998;136(1):17-24.

114. Dunn SL, Bjornholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG, Jr. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol*. 2005;19(4):925-38.
115. Engin A. Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:381-97.
116. Pedrosa JA, Silveira MA, Lima LB, Furigo IC, Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, et al. Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. *Endocrinology*. 2016;157(10):3901-14.
117. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1998;1(4):619-25.
118. Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med*. 2004;10(7):734-8.
119. Klein MO, MacKay H, Edwards A, Park SB, Kiss ACI, Felicio LF, et al. POMC and NPY mRNA expression during development is increased in rat offspring brain from mothers fed with a high fat diet. *Int J Dev Neurosci*. 2018;64:14-20.
120. Chen H, Morris MJ. Differential responses of orexigenic neuropeptides to fasting in offspring of obese mothers. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(7):1356-62.
121. Lee JH, Cha MJ, Yoo SB, Moon YW, Noh SJ, Jahng JW. Leptin blocks the fasting-induced increase of pERK1/2 in the paraventricular nucleus of rats. *Regul Pept*. 2010;162(1-3):122-8.
122. Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(3):626-33.
123. Briggs DI, Enriori PJ, Lemus MB, Cowley MA, Andrews ZB. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology*. 2010;151(10):4745-55.
124. Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ. Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Res*. 2002;936(1-2):87-90.
125. Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(4):E838-45.
126. Gali Ramamoorthy T, Begum G, Harno E, White A. Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Front Neurosci*. 2015;9:126.

127. Drouin J. 60 YEARS OF POMC: Transcriptional and epigenetic regulation of POMC gene expression. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(4):T99-T112.
128. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003;421(6925):856-9.
129. Mountjoy KG. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J*. 2010;428(3):305-24.
130. Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, et al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes*. 2006;55(9):2549-53.
131. Creemers JW, Lee YS, Oliver RL, Bahceci M, Tuzcu A, Gokalp D, et al. Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4494-9.
132. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(4):521-33.
133. Kim HR, Kim DH, Kim KK, Jeong B, Kang D, Lee TH, et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP) regulates TNF-alpha-induced hypothalamic inflammation. *FEBS Lett*. 2019;593(19):2762-70.
134. Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:131-60.
135. Nogueira PAS, Pereira MP, Soares JJG, de Assis Silva Gomes J, Ribeiro DL, Razolli DS, et al. Swimming reduces fatty acids-associated hypothalamic damage in mice. *J Chem Neuroanat*. 2020;103:101713.
136. Pereira SS, Alvarez-Leite JI. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep*. 2014;3(4):422-31.
137. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética


**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Jejum intermitente, metabolismo e fígado em camundongos C57BL/6 obesos**", registrada com o nº 40/2016, sob a responsabilidade de **Márcia B. A. Mandarin de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 27/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/09/2020
Espécie/linhagem/raça	camundongos C57BL/6
Nº de animais	135
Peso/Idade	18 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Bioterio setorial

Rio de Janeiro, 27 de Setembro de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Artigo publicado



The Journal of Nutritional Biochemistry

Volume 83, September 2020, 108419



Research Article

Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice

Renata Spezani¹, Renata Ribeiro da Silva¹, Fabiane Ferreira Martins, Thatiany de Souza Marinho, Marcia Barbosa Aguilã, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda   

Show more 

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108419>

[Get rights and content](#)