



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thatiany de Souza Marinho

Jejum intermitente em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta rica em frutose: análise do fígado, ilhota pancreática e tecido adiposo branco

Rio de Janeiro

2020

Thatiany de Souza Marinho

Jejum intermitente em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta rica em frutose: análise do fígado, ilhota pancreática e tecido adiposo branco

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS/ CB/A

M338	<p>Marinho, Thatiany de Souza Efeitos do jejum intermitente no fígado, na ilhota pancreática e no adipócito de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta rica em / Thatiany de Souza Marinho. – 2020. 115 f.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda</p> <p>Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.</p> <p>1. Dieta hiperlipídica. 2. Jejum intermitente. 3. Frutose. 4. Gorduras na dieta. 5. Inflamação. 6. Camundongos. I. Lacerda, Márcia Barbosa Águila Mandarin de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.</p> <p>CDU 616.399</p>
------	--

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB-7/5302

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

Assinatura

Data

Thatiany de Souza Marinho

Efeitos do jejum intermitente no fígado, na ilhota pancreática e no adipócito de camundongos alimentados com dieta e hiperlipídica ou dieta rica em frutose

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de março de 2020

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Sílvia Maria Custódio das Dôres
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Michele Teixeira Texeira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filhote, marido, avó, mãe e irmão pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha Dona Helena e Dona Maria Aliano (mãe e vó), meu muito obrigado por tudo.

A pessoa mais importante da minha vida, meu filhote Felipe Marinho, que eu amo muito e sofre um bocado comigo em casa, obrigado pelos vídeos e músicas que me faz assistir é sempre bom pra distrair e me divertir.

Ao meu marido Marcio (Nem), obrigado por seu apoio e companheirismo para a realização das minhas conquistas.

Ao meu irmão Thiago, por estar por perto nos bons e maus momentos.

A minha Grande Família (tias, primos e primas, sobrinhos, cunhadas e agregados) meu muito obrigada pelas festas, brigas e risadas e por fazerem parte da minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Marcia Barbosa Aguila Mandarin-de-Lacerda, por me acolher (me aturar) todos estes anos pelos ensinamentos, puxões de orelha pelos conselhos e por contribuir nas minhas conquistas enfim por ser minha Mãe científica meu muitíssimo obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, por me guiar nestes 19 anos e por ajudar nas minhas conquistas profissional e intelectual. Parafraseando Isaac Newton “Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes”.

A minha amiga e Anjo da Guarda Fernanda Ornellas, Fê obrigada por ser um exemplo como pessoa e profissional, agradeço imensamente seus conselhos, puxões de orelha e risadas além de nossas parcerias

A amiga Fran, obrigada por me aturar todos estes anos e a me perdoar até mesmo quando faço alguma besteira (apesar de achar que tô ajudando), sua amizade e muito importante.

À Prof^a. Dra. Sandra Barbosa (Sibitinha) e Prof^a. Dra. Vanessa (Vanish) meu muito obrigado por todos estes anos de convívio, amizade, ensinamentos, divãs, risadas.

Aos meus alunos de iniciação científica Octavio e Isabela e aos alunos que “roubo emprestado” dos outros pós, meu muito obrigada pelos momentos de risadas, estudos e trabalho.

Aos amigos Lipe Oliveira, Tatá Petito, Flavinha, Iarita, Veve e Heldinho, por todo carinho, risadas, brigas e conselhos ao longo desses anos, agradeço por tornar os dias mais divertidos.

À Aline Penna pelo companheirismo, aconselhamento técnico e acima de tudo por me tornar uma pessoa melhor sua frase virou um lema “um dia de cada vez”.

Aos secretários do BHEX, Carol e Zé Carlos e a secretária Isabel muito obrigada por me aturar todos estes anos, vocês são maravilhosos!

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Mesmo distante, sinto uma imensa saudade de vocês” (autor desconhecido) dedico esta frase aos amigos do LMMC, Celina (obrigada também pela parceria), Vitinho, Rayane, Patricia (a louca), Tamiris Rachid, Pedro, Thais, Fabiane, Aline, Andreia, Michele, Brenda, Camila, Carol, Daiana, Byanca, Filipe, Janaina, Luana, Pri, Raquelzita, Renata Tarevnick (R1), Renata Spezani (R2), Renata Ribeiro (R3), Jorge, Thereza e Prof. Dr. Luís Eduardo e a todos aqueles que já passaram eu algum momento pelo laboratório afinal estou perturbando as pessoas por longos 19 anos, meu muito obrigada.

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.

Um dia de cada vez.

Aline Penna

RESUMO

MARINHO, Thatiany de Souza. **Efeitos do jejum intermitente no fígado, na ilhota pancreática e no adipócito de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta rica em frutose.** 2020. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Objetivo: O estudo avalia os efeitos no jejum intermitente (JI) no fígado (estrutura, esteatose e metabolismo), no pâncreas (massa de células beta, marcadores moleculares), e no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs, formação de adipócitos bege e expressão de genes termogênicos). **Metodologia:** Camundongos machos C57BL/6, com três meses de idade, foram alimentados com dietas controle (C, 10% Kcal de gordura), hiperlipídica (HF, 50% Kcal de gordura) ou rica em frutose (HFr, 50% Kcal frutose) por oito semanas. Depois, metade de cada grupo foi submetido ao JI por quatro semanas adicionais (alimentação 24h / jejum 24h), formando seis grupos: C, C-JI, HF, HF-JI, HFr e HFr-JI. **Resultados:** Os grupos HF e HFr apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, aumento da esteatose hepática e hipertrofia das ilhotas pancreáticas com aumento da massa das células alfa e beta, bem como hipertrofia de adipócitos do TABs. A ingestão de alimentos no dia alimentado dos grupos com jejum não foi diferente entre os grupos, mas os grupos HF-JI e HFr-JI tiveram redução da massa corporal, do colesterol total e triacilglicerol. O teste oral de tolerância à glicose e a insulinemia melhoraram no JI, independentemente da dieta consumida, bem como diminuição da lipogênese hepática e aumento da beta-oxidação, resultando em redução da esteatose hepática e da inflamação. A resistência à insulina aumentou no grupo HF, e foi reduzida no grupo HF-JI. Houve diminuição da relação p-AKT/AKT (proteína quinase B) no grupo HF, e JI aumentou esta relação no grupo HF-JI. O supressor de tumor p53 aumentou no grupo HF e JI diminuiu no grupo HF-JI. O JI levou à redução do tamanho das ilhotas pancreáticas e da massa das células alfa e beta, além de melhorar a sinalização da insulina e diminuir a apoptose. O grupo HF-JI teve escurecimento do TABs e quociente respiratório (RQ) aumentado no dia alimentado. UCP1 aumentou nos grupos com JI, que também diminuiu marcadores inflamatórios e marcadores pró-apoptóticos nos adipócitos do TABs. **Conclusões:** O JI melhorou o metabolismo de carboidratos e marcadores pró-inflamatórios hepáticos, além de regular a massa de células alfa e beta e melhorar a sinalização da insulina com diminuição de a apoptose, mesmo com a ingestão continuada de dieta HF. O JI também promove o escurecimento dos adipócitos do TABs, agindo na termogênese e no eixo adipoinssular, com melhora da resposta à leptina, insulina e marcadores inflamatórios.

Palavras-chave: Dietas. Jejum intermitente. Inflamação. Esteatose. Massa de células beta. Termogênese.

ABSTRACT

MARINHO, Thatiany de Souza. **Intermittent fasting in mice feeding a hyperlipidic diet or a fructose-rich diet: analysis of liver, pancreatic islet, and white adipose tissue**. 2020. 115p. Thesis (PhD, Experimental and Human Biology) – Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, The University of the State of Rio de Janeiro, 2020.

Objective: The study aimed to evaluate the effects on intermittent fasting (IF) on the liver (structure, steatosis, and metabolism), the pancreas (mass of beta cells, molecular markers), and subcutaneous white adipose tissue (WATs, beige adipocyte formation and thermogenic gene expression). **Methodology:** Male C57BL / 6 mice, aged three months, were fed control diet (C, 10% Kcal fat), high-fat diet (HF, 50% Kcal fat) or diet high in fructose (HFr, 50% Kcal fructose) for eight weeks. Then, half of each group was submitted to IF for an additional four weeks (feeding 24 h / fasting 24 h), forming six groups: C, C-IF, HF, HF-IF, HFr and HFr-IF. **Results:** The HF and HFr groups presented hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, hypoadiponectinemia, increased hepatic steatosis, and pancreatic islet hypertrophy with increased alpha and beta-cell mass, as well as adipocyte hypertrophy of WATs. Food intake on the day fed in groups with fast were not different between groups, but HF-IF and HFr-IF groups had a reduction in body mass, total cholesterol and triacylglycerol. The oral glucose tolerance test and insulinemia improved in the IF, regardless of the diet consumed, as well as decreased liver lipogenesis and increased beta-oxidation, resulting in reduced hepatic steatosis and inflammation. Insulin resistance increased in the HF group and was reduced in the HF-IF group. There was a decrease in the p-AKT / AKT (protein kinase B) ratio in the HF group, and IF increased this ratio in the HF-IF group. The p53 tumor suppressor increased in the HF group and IF decreased it in the HF-IF group. The IF led to a reduction in the size of the pancreatic islets and the mass of alpha and beta cells, in addition to improving insulin signaling and decreasing apoptosis. There was browning in WATs in the HF-IF animals and increased respiratory quotient (RQ) on the fed day. UCP (uncoupled protein) 1 increased in the groups with IF, which also decreased inflammatory markers and pro-apoptotic markers in the adipocytes of WATs. **Conclusions:** IF improved the metabolism of carbohydrates and hepatic pro-inflammatory markers, in addition to regulating the mass of alpha and beta cells and improving insulin signaling with decreased apoptosis, even with continued intake of the HF diet. The IF also promotes browning in WATs adipocytes, acting on thermogenesis and the adipoinular axis, with improved response to leptin, insulin, and inflammatory markers.

Keywords: Diets. Intermittent fasting. Inflammation. Steatosis. Beta-cell mass. Thermogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Efeito da frutose em órgãos alvo e o desenvolvimento da Síndrome Metabólica.....	20
Figura 2 -	Mecanismos de acúmulo de gordura hepática.....	23
Figura 3 -	Representação esquemática do modelo double-hit na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	24
Figura 4 -	Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica: de dois a múltiplos fatores.....	25
Figura 5 -	Distribuição das células na ilhota pancreática.....	27
Figura 6 -	Via de sinalização AKT/FOXO1 e sua relação com PDX1.....	29
Figura 7 -	Tecido adiposo branco, marrom e bege.....	31
Figura 8 -	Efeitos do jejum intermitente nos tecidos	33
Figura 9 -	Sistema teste gerado pelo software Stepanizer, para análise de esteatose do fígado.....	40
Figura 10	Primes utilizados no fígado.....	43
Figura 11	Sistema teste gerado pelo software Stepanizer, para análise da ilhota pancreática.....	45
Figura 12 -	Tela de impressão de duas etapas da estimativa da densidade de volume das células beta por análise de imagem.....	46
Figura 13 -	Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da colagenase...	49
Figura 14 -	Primers utilizados no TABs.....	53
Figura 15 -	Evolução da massa corporal.....	56
Figura 16 -	TOTG.....	57
Figura 17 -	Esteatose hepática.....	60
Figura 18 -	Expressão da perilipina 2 (PLIN 2) e microscopia confocal no fígado.....	61
Figura 19 -	Vias de lipogênese no fígado.....	62
Figura 20 -	Lipogênese e vias de β -oxidação no fígado.....	63
Figura 21 -	Beta-oxidação e marcadores inflamatórios no fígado.....	64

Figura 22 - Vias de inflamação no fígado e bandas representativas de Western blot.....	65
Figura 23 - Massa corporal, ingestão de alimentos (no dia da alimentação) e bioquímica do plasma.....	68
Figura 24 - Testes de glicose e insulina após oito semanas de dieta.....	69
Figura 25 - Testes de glicose e insulina após quatro semanas de jejum intermitente.....	70
Figura 26 - Fotomicrografias do pâncreas e ilhotas e dados quantitativos: ilhotas, células alfa e beta.....	71
Figura 27 - Expressões de proteínas das ilhotas.....	74
Figura 28 - Fotomicrografias dos TABs coradas com hematoxilina e eosina.....	76
Figura 29 - Calorimetria indireta: gasto energético e quociente respiratório.....	77
Figura 30 - Níveis plasmáticos de adipocinas, insulina e índice de resistência à insulina em jejum.....	78
Figura 31 - Imunofluorescência em TABs.....	79
Figura 32 - Expressões de genes de adipocinas e marcadores termogênicos em TABs.....	80
Figura 33 - Expressões genica de marcadores inflamatórios em TABs.....	81
Figura 32 - Marcadores pro-apoptóticos e de proliferação celular em TABs.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição e conteúdo energético das dietas.....	37
Tabela 2 -	Comportamento alimentar e bioquímico.....	59
Tabela 3 -	<i>Two-way</i> ANOVA testando os efeitos da dieta, jejum intermitente (JI) e interação entre dieta e JI.....	66
Tabela 4 -	<i>Two-way</i> ANOVA testando os efeitos da dieta, jejum intermitente (JI) e a interação entre dieta e JI.....	74
Tabela 5 -	Massa corporal, ingestão de alimento, ingestão de energia e escurecimento do tecido adiposo subcutâneo.....	75
Tabela 6 -	<i>Two-way</i> ANOVA testando os efeitos da dieta, jejum intermitente (JI) e a interação entre dieta e JI.....	84

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A [ilhota]	Área seccional média da ilhota
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AKT	Proteína quinase b
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina sérica bovina
C	Dieta controle
C-JIL	Dieta controle, animais realizaram jejum intermitente
DAPI	4,6-diamidíno-2fenilindola, dihidroclorido
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNase	Desoxirribonuclease
EE	Gasto de energia ou gasto energético
EHNA	Esteatose hepática não-alcoólica
FOXO2	Fator de transcrição <i>forkhead 2</i> (<i>forkhead transcription factor 2</i>)
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GK	Glicoquinase
GLP1	Pepídeo similar ao glucagon 1
HE	Hematoxilina-eosina
HF	Dieta hiperlipídica
HF-JI	Dieta hiperlipídica, animais realizaram jejum intermitente
HFr	Dieta rica em frutose
HFr-JI	Dieta rica em frutose, animais realizaram jejum intermitente
HOMA	Modelo de homeostase
IL-6	Interleucina-6
Kcal	Quilocalorias
kJ	Quilojoules
LMMC	Laboratório de morfometria, metabolismo e doenças cardiovasculares
M[ilhota]	Ilhota massa de ilhotas
MC	Massa corporal

PBS	Tampão fosfato salino
PDX1	Fator homeobox pancreático-duodenal 1
PGC1-alfa	Coativador 1 alfa do ppar-gama
PI3K	Fosfatidilinositol-3- quinase
PP	Pontos parciais
PPAR	Receptor agonista proliferador de peroxisoma
PT	Pontos totais
QA [ilhota]	Densidade numérica por área das ilhotas
β 3-RA	Receptor beta 3 adrenérgico
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RQ	Quociente respiratório
q PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
TAB	Tecido adiposo branco
TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral – alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UCP1	Proteína desacopladora 1
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	OBJETIVOS	35
1.1	Objetivo Geral	35
1.2	Objetivos Específicos	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Animais e dieta	36
2.2	Teste oral de tolerância à glicose e a insulina	37
2.3	Massa Corporal, Ganho Ponderal e índice de adiposidade	38
2.4	Ingestão Alimentar e Ingestão Energética	38
2.5	Eutanásia	38
2.6	Bioquímica	39
2.7	Insulina, leptina e Adiponectina	39
2.8	Fígado	39
2.8.1	<u>Estrutura e Estereologia</u>	39
2.8.2	<u>Bioquímica Hepática</u>	41
2.8.3	<u>Microscopia confocal de varredura a laser</u>	41
2.8.4	<u>Western Blot</u>	42
2.8.5	<u>Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)</u>	43
2.9	Pâncreas	44
2.9.1	<u>Estrutura e Estereologia</u>	44
2.9.2	<u>Imunohistoquímica e Imunofluorescência das ilhotas</u>	47
2.9.3	<u>Marcação dupla de células alfa e beta</u>	47
2.9.4	<u>Isolamento das Ilhotas</u>	48
2.9.5	<u>Western Blotting das Ilhotas Isoladas</u>	49
2.10	Tecido Adiposo Subcutâneo (TABs)	51
2.10.1	<u>Calorimetria indireta</u>	51
2.10.2	<u>Índice de resistência à insulina em jejum</u>	51
2.10.3	<u>Estereologia TABs</u>	52
2.10.4	<u>Imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a laser</u>	52
2.10.5	<u>Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)</u>	52
2.11	Análise estatística	54

3	RESULTADOS	55
3.1	Fígado	55
3.1.1	<u>Jl afeta MC, glicose de jejum e índice de adiposidade, mas não a ingestão de alimentos</u>	55
3.1.2	<u>Jl diminui a intolerância à glicose devido à dieta</u>	56
3.1.3	<u>Jl afeta as concentrações plasmáticas de CT, TAG, insulina, adiponectina e leptina</u>	57
3.1.4	<u>Jl diminui o HOMA-IR atenuando a resistência à insulina</u>	58
3.1.5	<u>Jl reduz a esteatose hepática e os marcadores de lesão hepática</u>	60
3.1.6	<u>Jl diminui o PLIN2 e a formação de gotículas lipídicas no fígado</u>	61
3.1.7	<u>Jl reduz com eficiência a lipogênese no fígado</u>	61
3.1.8	<u>Jl é relevante para melhorar a β-oxidação hepática</u>	63
3.1.9	<u>Jl tem efeitos na diminuição da inflamação no fígado</u>	64
3.1.10	<u>Efeitos da dieta e Jl sozinhos ou combinados (<i>two-way ANOVA</i>)</u>	65
3.2	Pâncreas	67
3.2.1	<u>O jejum intermitente diminui a massa corporal e o ganho de massa corporal sem alterar a ingestão de alimentos no dia da refeição</u>	67
3.2.2	<u>O jejum intermitente melhorou os níveis de insulina, leptina e adiponectina</u>	67
3.2.3	<u>O jejum intermitente controlou a glicemia elevada de camundongos OID...</u>	68
3.2.4	<u>Jejum intermitente melhora a remodelação de ilhotas em camundongos OID</u>	70
3.2.5	<u>O jejum intermitente melhorou os marcadores moleculares das ilhotas</u>	72
3.2.6	<u>Efeitos únicos e combinados da dieta e jejum intermitente (ANOVA dois fatores)</u>	73
3.3	TABs	74
3.3.1	<u>Jejum intermitente, alteração da massa corporal e escurecimento no TABs</u>	74
3.3.2	<u>Termogênese modificada pelo jejum intermitente em animais</u>	76
3.3.3	<u>Adipocinas e insulina são alteradas pelo jejum intermitente</u>	77
3.3.4	<u>Imunofluorescência para Caspase 3, PCNA e UCP1 em TABs</u>	78
3.3.5	<u>O jejum intermitente altera a expressão gênica de adipocinas, receptor adrenérgico β3 e Ucp1 em TABs</u>	79

3.3.6	<u>O jejum intermitente reduz a inflamação nos TABs.....</u>	80
3.3.7	<u>O jejum intermitente diminuiu os marcadores de apoptose e aumentou os marcadores de proliferação celular nos TABs.....</u>	81
3.3.8	<u>ANOVA testando os efeitos da dieta, JI e a interação entre dieta e JI.....</u>	83
4	DISCUSSÃO.....	85
4.1	Fígado.....	85
4.2	Pâncreas.....	89
4.3	TABs.....	91
	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXO A- Comitê de ética.....	110
	ANEXO B – Comprovação do 1º artigo científico aceito	111
	ANEXO C – Comprovação do 2º artigo científico aceito	112
	ANEXO D – Comprovação do 3º artigo científico aceito	113
	ANEXO E – Comprovação de submissão do 4º artigo científico	114
	ANEXO F –Artigo científico aceito com colaboração	115

INTRODUÇÃO

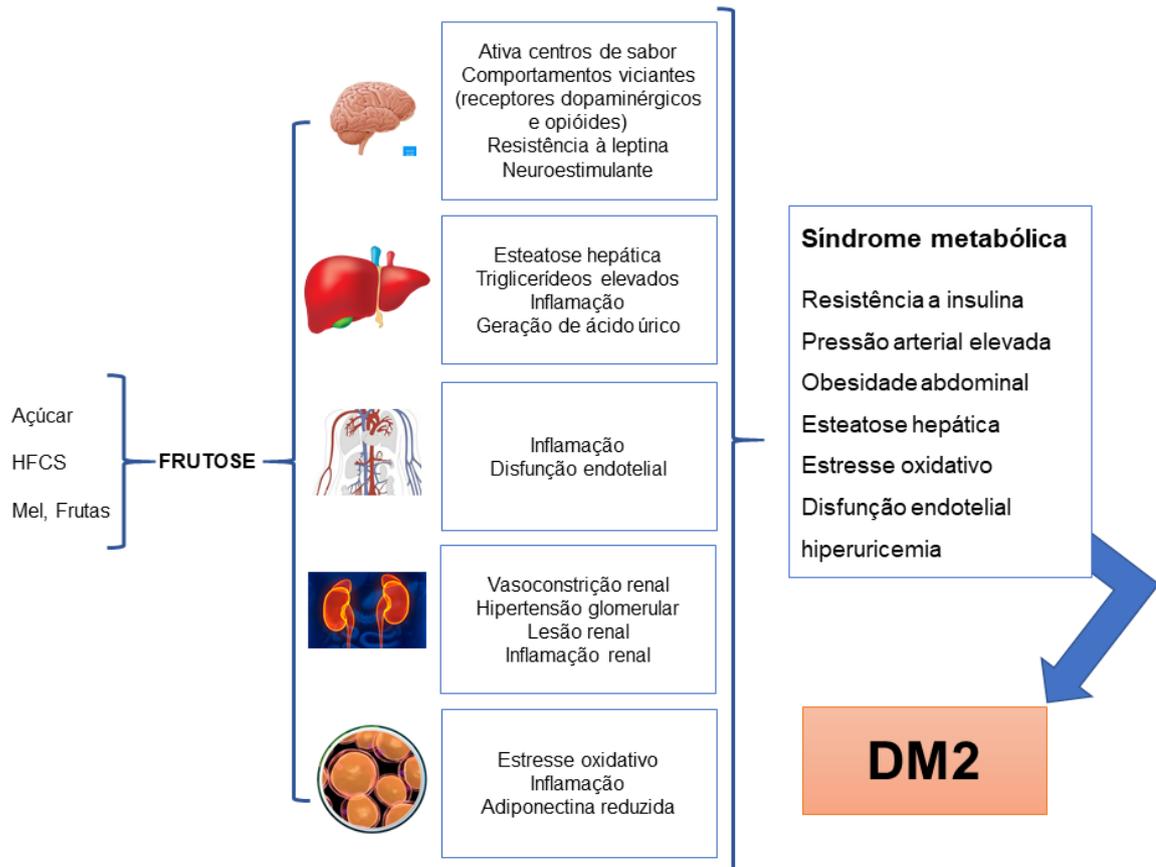
A frutose é um açúcar simples, do grupo das hexoses, que se assemelha a glicose (diferindo apenas pela posição do grupo carbonila, que na frutose encontra-se no carbono 2 e na glicose no carbono 1) A frutose é um monossacarídeo encontrado em frutas, sendo também um subproduto do xarope de milho, que tem baixo custo, e, por isso, é adicionado em alimentos e bebidas com função de adoçar (1).

Sob o ponto de vista comercial e industrial, apresenta algumas vantagens: tem o maior poder edulcorante de todos os açúcares (ou seja, maior capacidade de adoçar), poder umectante (para manter a umidade em produtos industrializados), contribui no desenvolvimento da cor, aroma, e na depressão do ponto de congelamento (2). Este monossacarídeo pode ser encontrado, predominantemente, em frutas (maças, laranjas e melões) e sob a forma de xarope de milho rico em frutose (high fructose corn syrup – HFCS); e também tem sido incorporado no preparo de frutas enlatadas, geleias, doces, pó para bebidas e refrigerantes, uma vez que é 1,4 - 1,7 vezes mais doce que a sacarose e seu custo reduzido devido à evolução no processo de obtenção (3). Assim sendo, a incorporação da frutose nos produtos industrializados em larga escala, principalmente nos refrigerantes, trouxe uma série de repercussões para a saúde, com efeitos em órgãos-alvo (Figura 1).

O intestino delgado desempenha um papel importante no metabolismo da frutose, convertendo frutose em glicose e outros metabólitos circulantes. Desta forma, o intestino delgado protege o fígado da exposição à frutose. Altas doses de frutose sobrecarregam essa capacidade de proteção do intestino delgado alterando o equilíbrio entre o consumo e a capacidade de eliminação da frutose intestinal, que leva à maior exposição do fígado à frutose da dieta e, portanto, à toxicidade da frutose (4).

A frutose, que é um monossacarídeo altamente lipogênico, sua ingestão em excesso promove resistência à insulina, comprometimento do metabolismo da glicose, dislipidemia, fibrose hepática e esteatose, além de hipertensão arterial sistêmica, gota, dislipidemias e DHGNA (5), mesmo sem causar significativo aumento da massa corporal (6).

Figura 1: Efeito da frutose em órgãos alvo e o desenvolvimento da Síndrome Metabólica



Fonte: Adaptado de Johnson, 2009 (7)

O consumo excessivo de frutose aumenta os níveis de ácidos graxos que estão associados a alterações nas vias clássicas da sinalização insulínica, podendo causar um quadro de resistência à insulina. Os ácidos graxos desencadeiam a fosforilação dos resíduos serina dos receptores de insulina, inativando-os e diminuindo a ativação da PI3-K, o que promove a diminuição no transporte de glicose para dentro da célula estimulado pela insulina (8). Essa diminuição na captação de glicose estimula ainda mais a secreção de insulina na tentativa de compensar os níveis aumentados de glicose e piora a situação de “resistência” (4, 9).

Mais do que apenas uma consequência de escolhas de estilo de vida, a obesidade é uma doença complexa, poligênica, multifatorial, crônica e resistente a muitas formas de tratamento (10). A obesidade tem aumentado significativamente nas últimas décadas, no país e no mundo. Trata-se de uma epidemia que atinge indivíduos em todos os níveis socioeconômico. As fontes de alimentos de baixo custo e com alta densidade calórica, disponíveis em formas pré-embaladas e em restaurantes *fast-*

food, em conjunto com as tecnologias, que visam poupar trabalho, promovem cada vez mais um estilo de vida sedentário e constituem importantes fatores para um aumento acelerado da prevalência da obesidade (11, 12).

Os lipídios são parte da estrutura celular e são envolvidos em funções fundamentais, como homeostase celular, comunicação célula-célula e na regulação de inflamação. Também são fonte densa de energia, e a mobilização dos lipídios para energia, onde representam a maior fonte energética, sendo 9 kcal por grama de gordura contra 4 kcal por grama de carboidrato ou proteína (13). A maior parte da gordura ingerida através da dieta está sob a forma de triglicerídeos e colesterol. Os triglicerídeos serão estocados, principalmente, no tecido adiposo bem como em outros órgão-alvo como o fígado, o tecido muscular e o pâncreas (14). O tecido adiposo não é apenas um reservatório de gordura utilizado como substrato energético, mas um órgão extremamente ativo do ponto de vista metabólico e secretório, liberando para a circulação sistêmica grande número de peptídeos ativos e citocinas (15).

Camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipíδια, que mimetiza a dieta das populações ocidentais, manifestam de forma intensa os sintomas da síndrome metabólica/obesidade e por isso representam um bom modelo para o estudo deste tema em um curto período. Estudos experimentais mostram que animais alimentados com dieta hiperlipídica cursam com resistência a insulina, a qual possui efeitos distintos sobre o tecido adiposo, hepático e pancreático. Em um período de três meses de administração de dietas contendo cerca de 40% a 60% de energia proveniente de lipídios promove alterações metabólicas, aumenta a produção de citocinas inflamatórias, induz a RI, hipertensão arterial e obesidades (16, 17), hipertrigliceridemia, e ainda, esteatoses hepática e pancreática em animais (18, 19)

A hipertrofia do tecido adiposo promove a redução do fluxo sanguíneo com resultante hipóxia do tecido, inflamação e infiltração de macrófagos. Os adipócitos hipertrofiados secretam leptina em excesso, a qual produzirá resistência à leptina e, em longo prazo, resistência à insulina por desregulação do eixo adipoinular (20, 21). Ocorre ainda limitação na capacidade do tecido adiposo de secretar uma importante adipocina anti-inflamatória, a adiponectina. Esta atua como um potente sensibilizador endógeno da insulina (22). Deste modo os adipócitos são impedidos de assimilarem os ácidos graxos e promover a liberação deles dos depósitos adiposos. Resultando

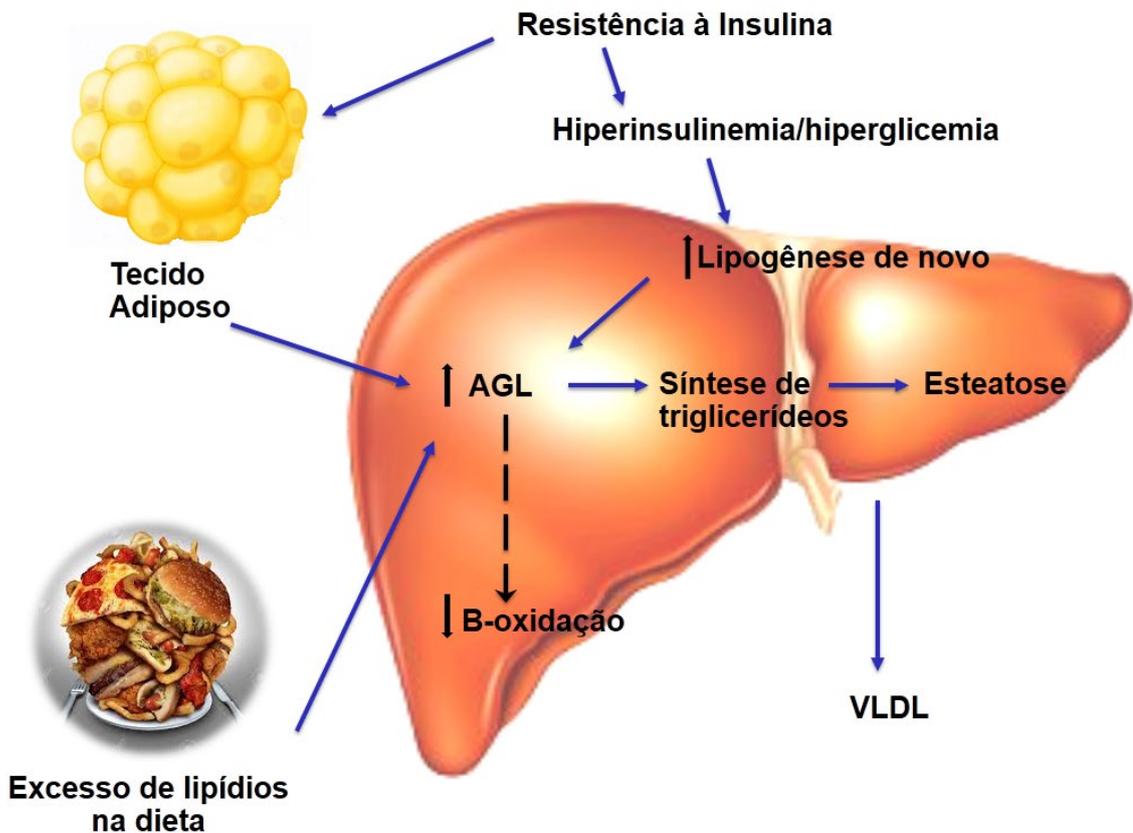
no aumento da entrega de ácidos graxos ao fígado e síntese de triglicerídeos como fonte de energia (23).

O fígado desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, na importação e fabricação de AGL, armazenamento e exportação de lipídios, sendo considerado com isso um órgão central do metabolismo. Portanto, um desequilíbrio em qualquer um destes processos pode levar ao desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (24).

A DHGNA é um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência mundial (25, 26). Atualmente é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica e fator de risco para doenças como: hipertensão arterial, Diabetes Mellitus tipo 2 e dislipidemia (24). A esteatose hepática é assintomática e pode ser detectada por meio de alterações nas enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama-glutamil transpeptidase) ou por exame de imagem como a ultrassonografia (27). A DHGNA é um termo utilizado para a esteatose hepática, com isso, a progressão da mesma pode levar a um quadro de esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), que envolve lesão hepatocelular e inflamação do fígado (28). EHNA quando não tratada progride para cirrose hepática e hepatocarcinoma (29).

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos, os quais são formados a partir da esterificação de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol no hepatócito. AGL surgem no fígado a partir de três fontes distintas; lipólise (a hidrólise de AGL a partir de glicerol e triglicerídeos) no interior do tecido adiposo, fontes alimentares, e da lipogênese *de novo* (30, 31). Em contraste, os AGL podem ser utilizados através da β -oxidação, esterificação dos triglicerídeos e de armazenagem como gotículas lipídicas ou embaladas e exportadas como lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Assim o acúmulo de gordura hepática pode ocorrer como um resultado do aumento da síntese, da entrada e da diminuição na exportação e oxidação da gordura (31), figura 2.

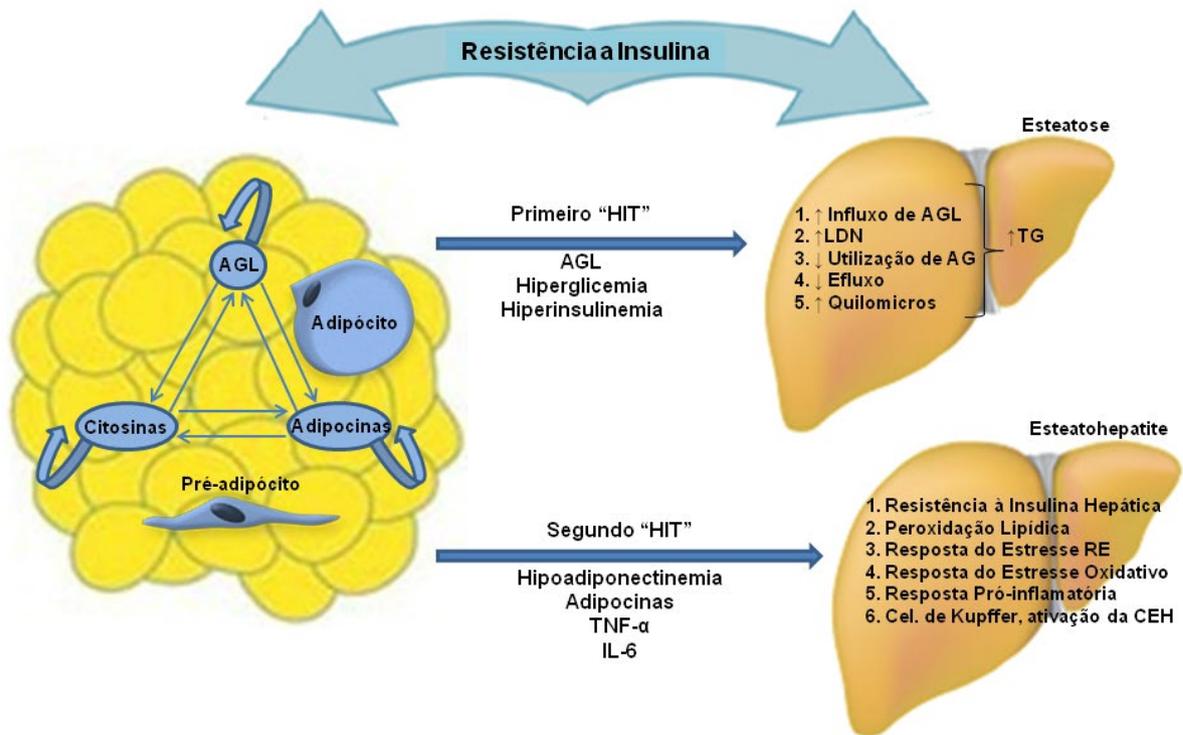
Figura 2. Mecanismos de acúmulo de gordura hepática



Fonte: Adaptado de Dowman, 2010 (30).

Existe a hipótese clássica para a patogênese da DHGNA baseada em “dois insultos” (em inglês, “*double-hit*”) (30, 32) O “primeiro insulto” consiste no desenvolvimento da esteatose hepática (acúmulo de lipídios no fígado), a qual uma vez estabelecida promove adaptações de rotas sinalizadoras celulares frente aos níveis elevados de estresse oxidativo (32), seguido por um “segundo insulto” em que mediadores pró-inflamatórios levam a inflamação, lesão hepatocelular, e fibrose (33, 34). A Figura 3 esquematiza a teoria dos *double-hit* para a EHNA.

Figura 3. Representação esquemática do modelo *double-hit* na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)



Legenda: ácidos graxos livres (AGL), célula estrelada hepática (CEH), interleucina 6 (IL-6) lipogênese de novo (LND), triacilglicerol (TAG), retículo endoplasmático (RE)

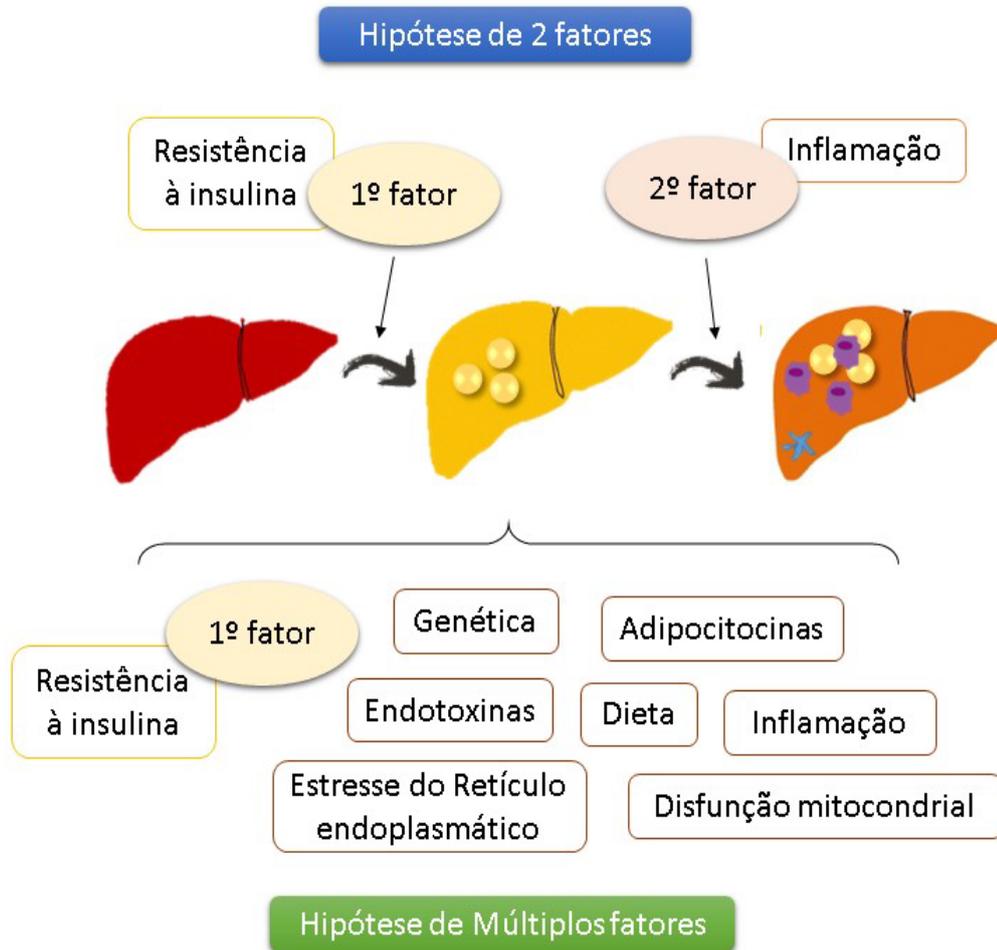
Nota: O primeiro hit induz esteatose e aumenta a suscetibilidade do fígado para o segundo hit. A esteatose hepática resultada principalmente de um amplificado influxo de AGL devido a um aumento da liberação de AGL dos depósitos de gordura. No fígado este influxo de AGL é combinado com o aumento da lipogênese de novo, danificando a oxidação de ácidos graxos e suprimido efluxo pela VLDL. Tais eventos são favorecidos pela subjacente hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência hepática à insulina.

Fonte: Adaptado de Kopelman, 2010 (35).

Uma nova hipótese tem sido considerada mais adequada para entender a patogênese da DHGNA, a hipótese de “múltiplos fatores” (em inglês, “*multiple hits*”) (36, 37), enfatizando as infinidades de vias que induz ao mesmo fenótipo hepático (38), bem como a alterações no *crossstalk* entre diferentes órgãos e tecidos, incluindo tecido adiposo, pâncreas, intestino e músculo (39-41). No entanto, o acúmulo de gordura no fígado, causado pela obesidade e resistência à insulina, ainda parece representar o “primeiro insulto” (42).

Os “múltiplos insultos” incluem a RI, lipotoxicidade, adipocinas pró-inflamatórias, fatores dietéticos, AG, lipopolissacarídeos (LPS) derivados da microbiota intestinal e fatores epigenéticos e genéticos (36, 43), figura 4.

Figure 4. Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica: de dois a múltiplos fatores



Nota: Parte superior: Antiga hipótese de "dois fatores": a esteatose, o primeiro "fator", sensibiliza o fígado para o segundo "fator": estresse oxidativo, endotoxina, depleção de ATP entre outros. Abaixo: A hipótese de "múltiplos fatores" considera vários insultos agindo juntos em indivíduos geneticamente predispostos para induzir DHGNA e fornece uma explicação mais precisa da patogênese do DHGNA. Tais acertos incluem RI, hormônios secretados no tecido adiposo, fatores nutricionais, microbiota intestinal e fatores genéticos e epigenéticos. DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica.

Fonte: Petito-da-Silva, 2019.

Alterações funcionais e estruturais de mitocôndrias hepáticas afetam a β -oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias, aumento da peroxidação lipídica em peroxissomos e microssomos e o conseqüente aumento do estresse oxidativo já foi relatado em animais portadores de esteatose microvesicular (44). Em decorrência da disfunção mitocondrial, a uma redução da β -oxidação de AGL, diminuição do citocromo C e da enzima carnitina palmitoil-CoA transferase-1 (CPT-1) no fígado, em contrapartida o excesso de lipídeos no fígado promove a formação de espécies reativas de oxigênio, levando à peroxidação lipídica, inflamação e fibrose (45, 46). A oxidação de AGL nas mitocôndrias dos hepatócitos decorre de uma gama de

substratos energéticos essenciais ao metabolismo e está via metabólica encontra-se reduzida na esteatose (47).

Evidências indicam que a esteatose hepática da resistência à insulina é causada pelo acúmulo de proteína de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP-1c), que está elevado em resposta aos altos circulantes de insulina. A homeostase de lipídios em células é regulada pela SREBP-1c e o aumento da expressão da SREBP-1c nos casos de resistência à insulina promove acréscimo da transcrição de genes de enzimas envolvidas na síntese dos AGL, entre elas a acetilCoA carboxilase, que converte a acetilCoA em malonilCoA e a ácido graxo sintetase (FAS), que converte a malonilCoA em palmitato (48, 49).

Alguns estudos associam a esteatose hepática resultante da resistência à insulina com o aumento dos níveis de SREBP-1 em resposta à hiperinsulinemia. Em indivíduos sensíveis à insulina, ela estimula a produção de SREBP-1c em períodos de pós-prandiais, quando há excesso de carboidrato circulante e níveis maiores de insulinemia (48, 50). Apesar de na resistência à insulina a maioria das ações desse hormônio ser comprometida, essa resistência à sua ação é seletiva e a capacidade da insulina em aumentar a produção de SREBP-1c é mantida. Logo, a expressão de SREBP-1c é proporcional à insulinemia, sendo maior nos casos de resistência à insulina, os quais vêm sendo associados ao aumento da lipogênese hepática, além da redução da oxidação mitocondrial de ácidos graxos (49, 51).

O pâncreas humano está localizado na parte superior do abdômen, se estende do duodeno até o baço, por trás do estômago. Anatomicamente, divide-se em quatro partes: cabeça (engloba os vasos mesentéricos superiores), pescoço, corpo e cauda. A cabeça do pâncreas é abraçada pelo duodeno, o ducto colédoco atravessa a cabeça do pâncreas e se junta com o ducto pancreático principal na ampola de hepatopancreática e se abre na papila duodenal maior. A cauda do pâncreas encontra-se no ligamento esplenorrenal e entra no hilo do baço (52). Em roedores, a anatomia do pâncreas é menos bem definida e está imerso no tecido adiposo, contudo esse modelo animal é frequentemente utilizado para estudar a estrutura e função do pâncreas.

A porção endócrina do pâncreas é constituída por um grupo de células, chamadas de ilhotas pancreáticas (ou ilhotas de “Langerhans”), que consiste em cinco tipos de células diferentes, cada uma das quais é caracterizada pela secreção distinta

Nas células betas pancreáticas, a insulina ativa a proteína quinase B (AKT) de forma dependente à ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (59). Uma vez fosforilada, a proteína AKT regula positivamente o fator de transcrição forkhead 2 (Forkhead Transcription Factor 2 – FOXO2), que por sua vez, inibe o fator de transcrição forkhead 1 (Forkhead Transcription Factor 1 - FOXO1) (60, 61). Com a expressão diminuída da proteína AKT, a expressão de FOXO2 diminui e o FOXO1 é mais expresso, com conseqüente diminuição do PDX1, caracterizando um estado de disfunção celular (62). O PDX1 é um fator de transcrição-chave expresso em diversos estágios do desenvolvimento do pâncreas e também no processo de diferenciação das células beta pancreáticas (63). A sua expressão está atrelada à preservação da função das células beta pancreáticas, pois em um ensaio clínico foi demonstrado que há diminuição na expressão PDX1 na RI e no DM2 (64).

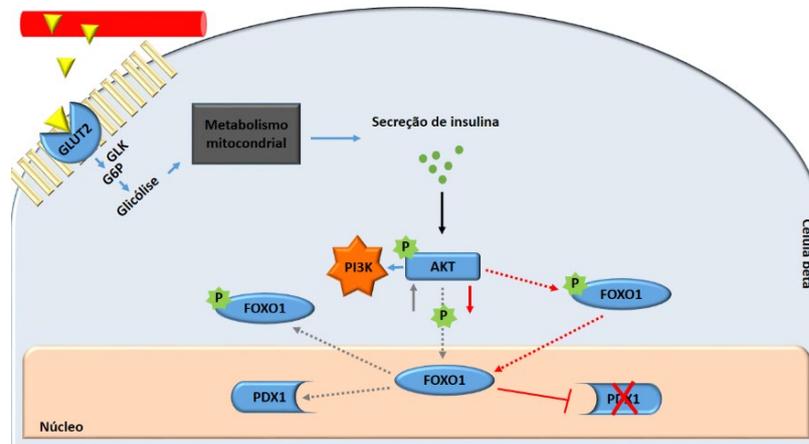
O PDX1 pode ativar nas células beta o gene da insulina, bem como outros genes envolvidos na detecção de glicose e seu metabolismo. Estes genes incluem a glicoquinase (GK) e transportador de glicose de difusão facilitada (GLUT)2, os quais têm sua transcrição aumentada através da ação do GLP1, que aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose através da ativação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (65, 66). Através do aumento da expressão do fator de transcrição PDX1, o GLP1 pode promover a expressão do gene da insulina e sua biossíntese (66).

Os GLUTs apresentam 14 isoformas descritas na literatura, contudo, o GLUT2 nas células beta pancreáticas é o principal transportador de glicose através da membrana plasmática (67). A GK serve como um sensor de glicose nas células beta pancreáticas, e, através do reconhecimento da glicose induz a secreção de insulina. Com o aumento dos níveis de glicose circulante durante a fase pós-prandial, a GK é fosforilador principal da glicose. Em oposição à GK, a enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) é inibida. Desta forma, a atividade regular da GK é primordial para a homeostase da glicose durante o período pós prandial (68).

Em suma, na via AKT/FOXO1, a fosforilação da AKT estimula a captação de glicose para membrana através do transportador GLUT2, que em condições normais inibe a FOXO1 permitindo a transcrição de PDX1. Cabe ressaltar que a FOXO1 inibe a proliferação das células beta pancreáticas através da supressão de PDX1, já que a

FOXO1 quando ativa (fosforilada) se transloca para o núcleo, silenciando o PDX1 (69, 70). Na figura 6 uma breve descrição do esquema descrito anteriormente.

Figura 6 – Via de sinalização AKT/FOXO1 e sua relação com PDX1



Legenda: GLUT2 (transportador de glicose 2), GK (glicoquinase), G6P (glicose-6-fosfato), AKT (proteína quinase B), PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), PDX1 (fator homeobox pancreático-duodenal) e FOXO1 (fator de transcrição forkhead box O1).

Nota: A seta cheia indica transporte; as setas pontilhadas indicam ações sequenciais de fosforilação/estimulação e a linha interrompida indica inibição. O GK é um dos principais sensores de glicose que levam a secreção de insulina pelas células beta. Quando a AKT fosforila a FOXO1, transloca-se do núcleo para o citoplasma, tornando-se inativa e permitindo a transcrição de PDX1 (seta pontilhada cinza). Quando a fosforilação da AKT não ocorre ou reduz, ela transloca-se do citoplasma para o núcleo, tornando-se ativa e silenciando o PDX1 (seta pontilhada vermelha).

Fonte: Franciele Graus, 2017.

Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). No TAM, adipócitos mantêm muitas e pequenas gotas de lipídios no citoplasma e o núcleo ocupa diferentes posições na célula, seja no centro ou na periferia. As mitocôndrias das células do TAM transformam a maior parte da energia dos lipídios em energia térmica. Assim, o TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal (71). Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes ou em quantidades muito pequenas em humanos adultos, mas são encontrados e maiores quantidades em fetos e recém-nascidos, na região cervical, supra clavicular, paravertebral, interescapular e perirenal e em regiões interescapular, subescapular, regiões axilar, perirrenal e periaórtica em roedores (72).

O TAB é caracterizado por um padrão unilocular (única gotícula de gordura central) e é composto pelos adipócitos e a fração vascular estromal (constituente principal de pré-adipócitos, células imunes e fibroblastos); juntos, adipócitos e fração vascular estromal produzem matriz extracelular para manter a integridade estrutural e

funcional do tecido (73, 74). O TAB tem as funções de contribuir como barreira física ao trauma, armazenamento energético e secreção de proteínas bioativas com atuação local e à distância, denominadas adipocinas, sendo as mais descritas a adiponectina, leptina, resistina e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (75).

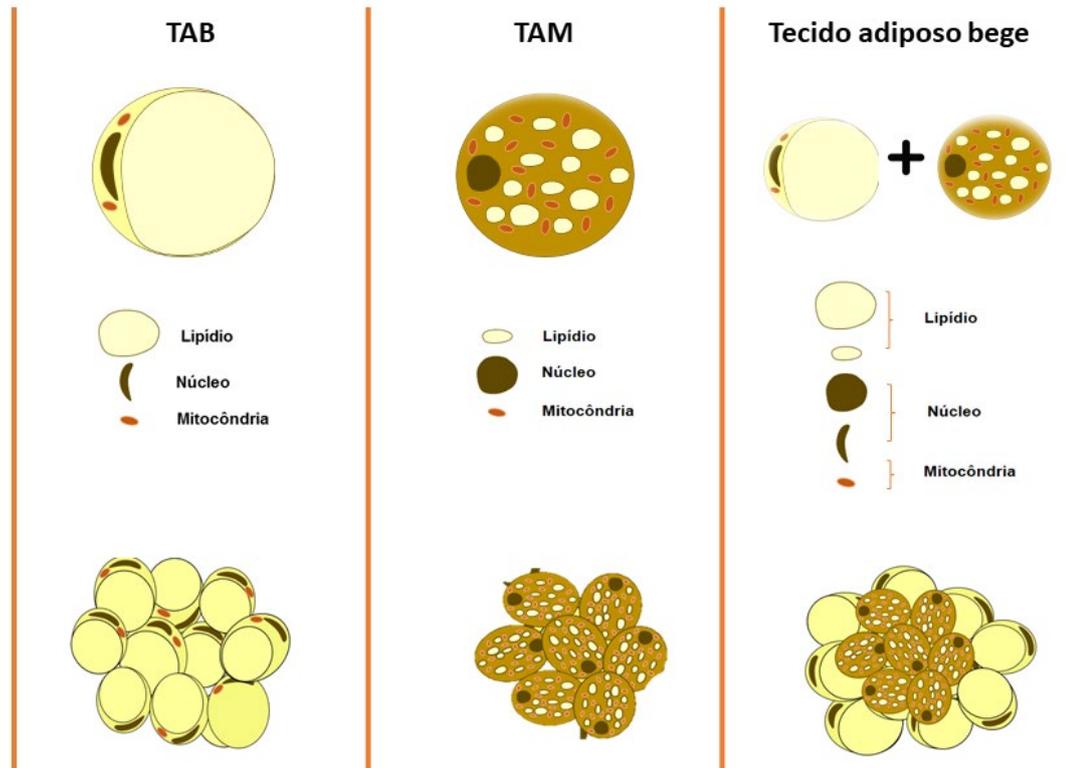
Recentemente foi evidenciado que o TAB pode sofrer diferenciação para o tecido adiposo bege, metabolicamente mais ativo, ao adquirir características termogênicas em um processo denominado *browning* (este processo de escurecimento ocorre no TAB subcutâneo – TABs) (76) caracterizado por um aumento na concentração de mitocôndrias que permitem uma maior capacidade de transformação de energia química em calor, ou seja, maior gasto energético, que pode ocorrer através de estímulos nutricionais ou farmacológicos (77).

Estudos prévios descreveram que o TABs de roedores apresentou alta expressão de UCP-1 e outros marcadores gênicos característicos do TAM quando comparado ao TAB visceral (78, 79). Este tecido é encontrado anatomicamente nos locais do TABs, contudo sua característica metabólica é semelhante ao TAM incluindo o potencial termogênico, o padrão de expressão gênica, reserva lipídica multilocular e elevado número de mitocôndrias (80-82), caracterizando a termogênese adaptativa no TABs.

O adipócito bege parece gerar efeitos benéficos sobre o metabolismo além de reduzir o risco de patologias, tais como o DM2 e a obesidade (83, 84). Um estudo atual indica que o fenômeno *browning* (processo de escurecimento do TAB em tecido adiposo bege) pode ser um novo alvo terapêutico para a redução de doenças como obesidade, porém as investigações translacionais ainda são iniciais (85).

Para identificar a célula bege no TAB basta fazer uma marcação para os genes típicos do TAM no TABs, tais como genes envolvidos na termogênese (UCP1), biogênese mitocondrial (PGC1-alfa), entre outros (86, 87). O PGC1-alfa, co-ativador transcricional envolvido na biogênese mitocondrial e na expressão de genes termogênicos, é primordialmente expresso no TAM e encontra-se aumentado na vigência de atividade termogênica (88). Sabe-se que 63g de tecido adiposo bege ativo em um adulto evitaria o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano, sendo essa observação atribuída ao gasto desse excesso de energia na via termogênica (89).

Figura 7. Tecido adiposo branco, marrom e bege



Nota: Bege - TABs de reserva lipídica após passar por um processo de transdiferenciação com foco de tecido adiposo bege termogênicamente ativo.

Fonte: a autora, 2020.

O jejum intermitente (JI) é praticado a milênios, mas apenas recentemente vem sendo utilizado como uma abordagem dietética cada vez mais popularizada devido seu potencial efeito emagrecedor (90). Muitos grupos religiosos incorporam períodos de jejum em seus rituais, incluindo muçulmanos que jejuam do amanhecer até o anoitecer durante o mês do Ramadã, e cristãos, judeus, budistas e hindus que tradicionalmente jejuam em dias determinados da semana ou no ano civil (91). Atualmente existem diversos protocolos de JI (92) o jejum em dias alternados, jejum de um dia inteiro ou alimentação com restrição de horário como uma refeição por dia são os protocolos mais usados (93). Diferentemente da dieta de restrição calórica, em que a ingestão energética diária é reduzida cronicamente em 20%-40% da energia total e se realiza diversas refeições fracionadas durante o dia, no JI o indivíduo segue diversos tipos de protocolos de acordo com sua tolerância. Durante o jejum é permitido alimentos de baixo valor calórico como café, chás e outras bebidas (94)

Diversos estudos mostraram efeitos benéficos do JI, em modelo animal e humanos (95-97), como, redução da pressão sanguínea e frequência cardíaca (98), redução da inflamação, proteção contra neuro degeneração melhora da sensibilidade

a insulina e homeostase glicêmica e a perda de peso (99-101). Uma explicação para a perda de peso através do JI seria que a enzima lipase hormônio-sensível situada nos adipócitos, faz a mobilização dos lipídios, e é regulada através da adrenalina e noradrenalina e inibida pela insulina. Na falta de insulina, por exemplo no jejum prolongado, a lipase hormônio-sensível fica intensamente ativada, e remove abundante quantidade de triglicérides dos adipócitos. Estes são lançados no plasma na forma de ácidos graxos livres e são captados pelos hepatócitos. No citoplasma dos hepatócitos são esterificados com glicerol, originando novamente triglicerídeos, ou são clivados em acetil CoA (102).

Estudos mostram que o JI está relacionado com autofagia (103), um processo catabólico celular que dá origem à degradação de componentes da própria célula onde ocorre um processo de detoxificação. Este processo pode ser estimulado em determinadas situações, como, por exemplo, durante o jejum prolongado (104). A autofagia tornou-se uma estratégia promissora a ser usada no combate a doenças vinculadas ao envelhecimento como câncer, Alzheimer e Parkinson (105-107).

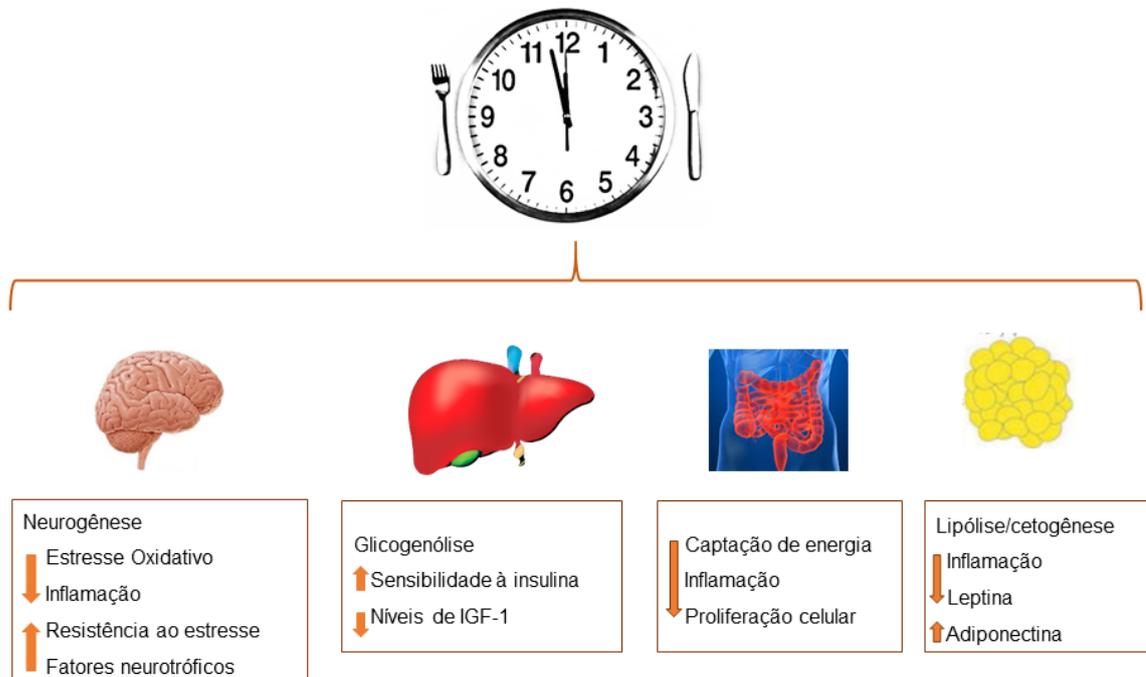
O JI também está associada ao aumento das concentrações da adiponectina (108). Este hormônio apresenta efeitos na regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos (109). A adiponectina é primariamente secretada no tecido adiposo. Os níveis no plasma são inversamente relacionados com o percentual de gordura corporal em adultos, logo indivíduos com baixo percentual de gordura, apresentam aumento significativo da concentração deste hormônio no plasma (110). Dentre outros, ela apresenta efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênico. Além disso, adiponectina atua no cérebro para aumentar o gasto de energia e causar perda de peso (111).

O jejum prolongado resulta em cetogênese, promove potentes alterações nas vias metabólicas e processos celulares, como resistência ao estresse, lipólise e autofagia, e pode ter aplicações médicas, como no controle de crises convulsivas. e melhora da artrite reumatoide (91, 112)

O JI modifica a neuroquímica cerebral e a atividade da rede neuronal de maneira a otimizar a função cerebral e o metabolismo energético periférico. Quatro regiões cerebrais que são particularmente importantes nas respostas adaptativas à JI incluem o hipocampo (processamento cognitivo), estriado (controle dos movimentos corporais), hipotálamo (controle da ingestão de alimentos e temperatura corporal) e

tronco cerebral (controle dos sistemas cardiovascular e digestivo) (113). O cérebro se comunica com todos os órgãos periféricos envolvidos no metabolismo energético. A JI melhora a atividade parassimpática (mediada pelo neurotransmissor acetilcolina) nos neurônios autonômicos que inervam o intestino, o coração e as artérias, resultando em melhor mobilidade do intestino e redução da frequência cardíaca e pressão sanguínea. Ao esgotar o glicogênio das células do fígado, o jejum resulta em lipólise e na geração de corpos cetônicos, resultando em uma redução na gordura corporal. A JI melhora a sensibilidade à insulina das células musculares e hepáticas e reduz a produção de IGF-1. Os níveis de estresse oxidativo e inflamação são reduzidos em todo o corpo e cérebro em resposta à JI (91, 114), figura 8.

Figura 8. Efeitos do jejum intermitente nos tecidos



Fonte: A Autora, 2020.

Em suma, o JI melhora a sensibilidade à insulina, com efeitos na glicemia, adiposidade e DM2 em roedores (115), e humanos (116), além de melhorar a homeostase glicêmica (117), perda de peso corporal (118), e aumento da função cognitiva (119). Os mecanismos envolvidos no JI estão relacionados a vias de sinalização de resposta celular adaptativas, melhorando a saúde mitocondrial, reparo do DNA e autofagia (120).

A obesidade é considerada uma epidemia mundial que afeta todas as idades, e esse aumento nas sociedades modernas é influenciado por fatores ambientais e comportamentais (121). O aumento da massa corporal tem sido relacionado ao consumo acentuado de lipídios saturados e carboidratos simples. A ingestão de uma dieta hiperlipídica leva a vários efeitos deletérios, como o remodelamento do tecido adiposo com adipócitos hipertrofiados e o desenvolvimento da DHGNA, RI e metabolismo de glicose prejudicado (17, 122)

Estudos investigam os efeitos da ingestão de frutose, um monossacarídeo encontrado em abundância em frutas, bebidas açucaradas, sucos e refrigerantes, e também como xarope de milho (1). Dados recentes mostraram que o consumo de frutose na população mundial aumentou em 250%, especialmente nos países desenvolvidos (123). Isso é importante porque dietas ricas em frutose podem rapidamente produzir todas as principais características da síndrome metabólica (124) além de estar associado ao DM2, à inflamação sistêmica e à hipertensão arterial, independentemente da presença de obesidade. (125, 126).

As dietas hiperlipídica e rica em frutose têm particularidades na indução de alterações no metabolismo, mesmo assim, o JI pode ser uma estratégia a ser utilizada em contraste aos efeitos adversos dessas dietas, com benefícios a saúde. Diante do exposto, o presente estudo comparou o impacto da intervenção JI em diferentes tipos de dieta experimentais. Investigamos o JI nos parâmetros metabólicos e nas alterações estruturais hepáticas e pancreática, na inflamação, termogênese e no escurecimento no TABs em animais na idade adulta alimentados com uma dieta hiperlipídica ou uma dieta rica em frutose.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Estudar o efeito do JI no fígado através do metabolismo hepático e alterações estruturais hepáticas, no pâncreas na estrutura e função da ilhota pancreática assim como na indução de células adiposas bege no tecido adiposo subcutâneo em animais adultos alimentados com uma dieta hiperlipídica ou uma dieta rica em frutose.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a evolução da massa corporal e ingestão alimentar;
- b) Avaliar o metabolismo carboidratos (glicose e insulina);
- c) Avaliar as adipocinas (adiponectina e leptina);
- d) Analisar o colesterol total e triacilglicerol hepático e plasmático e dosar as enzimas hepáticas (AST e ALT);
- e) Avaliar no fígado o remodelamento e dano hepático, via da lipogênese, da beta-oxidação e inflamação através de técnicas moleculares western blot e qPCR;
- f) Avaliar no pâncreas o remodelamento pancreático e a função das ilhotas pancreáticas através qPCR;
- g) Avaliar no tecido adiposo subcutâneo o gasto energético, inflamação, termogênese e escurecimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e dieta

O estudo foi conduzido sob os regulamentos do Comitê de Ética Local de Experimentação Animal (protocolo número CEUA/040/2016) respeitando as diretrizes para experimentação animal (NIH publicação número 84-23, revisada em 1996). Os camundongos foram mantidos sob condições controladas no sistema Nexgen (Allentown Inc., PA, EUA) com 20 ± 20 C, 12 h/12 h ciclo escuro/claro e acesso livre a comida e água.

Três grupos (n=60 cada grupo) de camundongos C47BL/6 machos com 12 semanas de idade foram mantidos por oito semanas alimentados com dieta: grupo controle (C, 10% Kcal lipídios, 14% Kcal proteínas, 76% Kcal carboidratos, 380 Kcal/100g), grupo hiperlipídico (HF – high-fat, 40% Kcal lipídios, 14% Kcal proteínas, 36% Kcal carboidratos, 400 Kcal/100g) e grupo de alta frutose (HFr – high-fructose, 10% Kcal lipídios, 14% Kcal proteínas, 76% Kcal carboidratos, 40% Kcal de carboidratos de frutose, 380Kcal/100g) (dietas foram fabricadas pela PragSoluções, Jaú, SP, Brasil, com base nas recomendações da AIN93 para roedores, Tabela 1) (127). Após as primeiras oito semanas de indução das dietas, os grupos foram divididos novamente, metade dos animais continuou a se alimentar com suas respectivas dietas (n=30), e a outra metade do grupo foi submetida a JI (n=30) por um período adicional de quatro semanas. O protocolo JI alternou 24 horas de alimentação e 24 horas de jejum. Os novos grupos foram C, C-JI, HF, HF-JI, HFr e HFr-JI.

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas

COMPOSIÇÃO (g/Kg)	Grupos		
	C	HF	HFr
Caseína (proteína 84%)	140	174	140
Amido de milho	620,7	348	146,4
Sacarose	100	100	100
Frutose	-	-	474,3
Óleo de soja	40	40	40
Banha	-	238	-
Fibra	40	40	40
Mistura de vitaminas	10	10	10
Mistura Mineral	34	34	34
Cisteína	1,8	1,8	1,8
Colina	2,4	2,4	2,4
Antioxidante	0,008	0,008	0,008
Total (g)	1,000	1,000	1,000
Energia (Kcal / Kg)	3804	4000	3804
Carboidratos (%)	76	36	76
Frutose (%)	0	0	40
Proteína (%)	14	14	14
Lipídio (%)	10	40	10

Legenda: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e Rica em Frutose (HFr).
 Fonte: A autora, 2020.

2.2 Teste oral de tolerância à glicose e a insulina

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI) foi analisado antes (8^a semana) e após o JI (12^a semana). No TOTG os animais foram privados de comida durante 6h (1 a.m. - 7 a.m.), glicose (24% em solução salina estéril, NaCl a 0,9%, 1 g / kg) foi administrada por via oral para provocar sobrecarga de glicose. O TITI foi realizado em camundongos em jejum por quatro horas, e a insulina (0,4 U / kg, Humalog Insulin Lispro, Lilly, IN, EUA) foi injetada por via intraperitoneal. Nos dois testes, as amostras de sangue foram coletadas aos 0, 14,

30, 60 e 120 min e a glicemia foi medida (glicosímetro, Accu-Chek, Roche, Alemanha). As análises foram baseadas na área sob a curva (ASC) de zero a 120 min (GraphPad Prism v. 8.2.1 para Windows; GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e na avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR), foi calculada como $(\text{insulina em jejum} \times \text{glicose}) / 22.4.(128)$

2.3 Massa Corporal, Ganho Ponderal e índice de adiposidade

O Massa Corporal (MC) foi medido semanalmente (sexta-feira, 10h). O ganho ponderal foi calculado como a diferença entre o MC inicial e final. O índice de adiposidade foi calculado dividindo-se as massas de gordura visceral (a soma de gordura epididimária, retroperitoneal e subcutânea) pelo MC total e multiplicando o resultado por 100.

2.4 Ingestão Alimentar e Ingestão Energética

A ingestão de alimentos (diferença entre os alimentos fornecidos e a quantidade de alimentos deixados na gaiola após 24 horas) foi determinada diariamente (7h). A ingestão alimentar cumulativa foi estabelecida incluindo todos os períodos (dias de jejum e dias de alimentação). A ingestão de energia foi o produto do consumo alimentar pelo conteúdo energético da dieta.

2.5 Eutanásia

Após o período de intervenção, os animais foram mantidos em jejum durante 6 h (os animais dos grupos que realizaram JI foram sacrificados durante o período alimentado), o tórax foi aberto, o sangue foi coletado por punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação (120 rpm por 20 min) em temperatura ambiente e

armazenado a -20°C até a realização das análises. Os órgãos alvos do estudo, fígado, pâncreas e tecido adiposo branco (TAB) epididimário, retroperitoneal e subcutâneo, foram cuidadosamente dissecados e pesados e serão descritos adiante em sessões separadas.

2.6 Bioquímica

Os valores plasmáticos de colesterol total (CT), triacilglicerol (TAG), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinados utilizando um método colorimétrico cinético de acordo com as instruções do fabricante (kits comerciais para espectrofotômetro automático Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil)

2.7 Insulina, leptina e adiponectina

Concentrações de insulina, leptina e adiponectina plasmáticas foram medidas em duplicatas usando kits de ensaio imunoenzimático comercialmente disponível (Millipore, Merck, Temecula, CA, EUA): adiponectina Kit ELISA (Cat. # EZMADP-60K), kit ELISA para insulina (Cat. # 13K-EZRMI) e kit ELISA para leptina (Cat. # EZML-82K) com o equipamento Termoplate (TP-READER ELX800, BiotekInstruments, USA).

2.8 Fígado

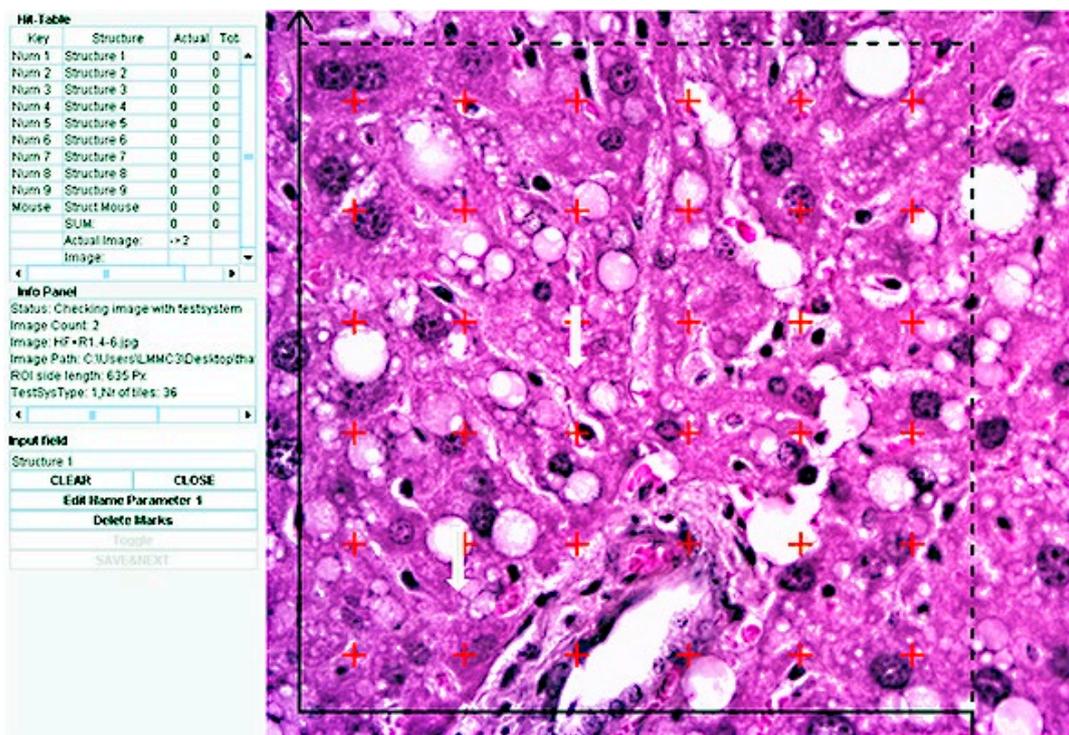
2.8.1 Estrutura e Estereologia

Fragmentos aleatórios do fígado foram mantidos em fixador recentemente preparado (formaldeído a 4% w/v, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) por 48h, em

temperatura ambiente. Depois foi incluído em Paraplast Plus (Sigma-AldrichCo, St. Louis, Mo, EUA), seccionados com espessura de cinco micrômetros e corado com hematoxilina e eosina ou por imunofluorescência conforme detalhado mais adiante. fotomicrografias foram feitas com o microscópio BX41 (Olympus Co, Tóquio, Japão) com câmera Infinity 1-4c (LumeneraCo,Ottawa, Canadá). As imagens foram obtidas em formato JPEG, 24 bits e resolução de 2492x1944 pixels. Cinco animais por grupo compõem a amostra. De cada animal adquiriu-se 10 imagens de forma aleatória, totalizando 40 imagens por grupo. As imagens foram analisadas utilizando o software STEPanizer (www.stepanizer.com) com sistema-teste de 36 pontos Figura 9, onde foram contatos os pontos-teste sobre as gotículas de gordura intra-hepatócitos. densidade de volume da esteatose no fígado (Vv [esteatose, fígado]) foi avaliada por contagem de pontos, conforme descrito (129).

Resumidamente, um sistema teste composto de pontos foi sobreposto com imagens. Vv (esteatose hepática) foi a razão entre os pontos que atingem as gotículas de gordura (PP [esteatose hepática]) e os pontos totais do sistema (PT): $Vv [esteatose hepática] = PP [esteatose hepática] / PT (130)$.

Figura 9. Sistema teste gerado pelo software Stepanizer, para análise de esteatose do fígado



Fonte: A Autora, 2020.

2.8.2 Bioquímica hepática

O colesterol e triacilglicerol hepático foram medidos em tecido hepático em conformidade com os protocolos de rotina descritos anteriormente (131). Resumidamente, as amostras congeladas (40 mg) foram colocadas num processador de ultrassons (modelo LB-130 PB, Laabormetric, Miami, FL, EUA) com 1 ml de isopropanol e o homogeneizado foi centrifugado a 2000 G. Depois, 4 uL do sobrenadante foi analisado com um analisador automático (K44, BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil), utilizando um kit para medir triacilglicerol ou colesterol. Além disso, as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram medidos no plasma, utilizando um método colorimétrico cinético (BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

2.8.3 Microscopia confocal de varredura a laser

Nos cortes de tecido hepático, para a recuperação antigênica foi utilizado o tampão citrato (pH 6,0) por 20 min, após foi realizado o bloqueio com cloreto de amônio e 2% de glicina, em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PLIN 2 (perilipina 2, CSB-PA920084, CUSABIO, College Park, MD, EUA). O anticorpo secundário foi conjugado ao fluoróforo Alexa e as seções foram montadas com slow-fade (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). As imagens digitais imunofluorescentes foram obtidas com uma microscopia confocal de varredura a laser (Modelo C2; Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

2.8.4 Western Blot

A extração de proteína foi isolada a partir de tecidos homogeneizados de fígado, e as proteínas totais foram avaliadas utilizando a técnica de transferência de Western.

Inicialmente, 100 mg de fígado congelados foram homogeneizados em tampão contendo inibidores de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 4^o C, os sobrenadantes foram recolhidos, e a proteína total foi determinada utilizando um kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Quantidades iguais de proteína total foram separadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida. A membrana foi bloqueada por incubação em 4% (peso/volume) de leite desnatado seco em solução salina tamponada com Tris (20 mmol/L de Tris/HCl pH 7,4 e 400 mmol/L NaCl). Incubou-se durante a noite a 4^o C, com os seguintes anticorpos primários:

- a) Lipogênese: proteína de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBP1) -c (68 kDa; SC367), proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos (ChREBP; 93 kDa; SC33764), sintase de ácidos graxos (FAS; 270 kDa; SC20140), proliferador de peroxissoma receptor ativado (PPAR) γ (67 kDa; SC7273);
- b) β oxidação: PPAR α (44 kDa; SC9000), acil-CoA oxidase (ACOX1; 4 kDa, SC7476);
- c) Inflamação: interleucina (IL) 1 β (17 kDa, SC42012); IL6 (21 kDa, ab7737); fator nuclear (NF) κ B (64 kDa, SC109); fator de necrose tumoral (TNF) α (26 kDa, SC1340).

As membranas foram também incubadas com anti-beta-actina (anticorpo monoclonal; 43 kDa; SC-81178; 1: 1000). Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubados com anticorpo secundário por 1h à temperatura ambiente, com agitação constante. Para a detecção das imagens foi utilizado o reagente ECL e as imagens foram obtidas pelo Bio-Rad image ChemiDoc XRS Molecular System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas de quimioluminescência foi quantificada utilizando o software ImageJ (versão 1.41, NIH imagej.nih.gov/ij, EUA).

2.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

O RNA total foi extraído a partir de cerca de 40 mg de tecido do fígado utilizando Trizol reagente (Invitrogen, CA, EUA) e o RNAm foi quantificado (GE Healthcare Life

Sciences, Piscataway, NJ, EUA) com 1 µg de RNA tratado com DNase I (Invitrogen). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada utilizando Oligo (dT) iniciadores para RNAm e Superscript III da transcriptase reversa (ambos da Invitrogen). O qPCR foi realizada utilizando um reciclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e a Mix Sybergreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Os primers foram projetados usando o software Primer3, Figura 10. A beta-actina (fígado) e GAPDH (TABs) foram utilizados para normalizar a expressão dos genes selecionados.

Figura 10. Primes utilizados no Fígado

Gene	FW	RV
Beta-actina	FW TGTTACCAACTGGGACGACA	RV GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
CHREBP1	FW CACTCAGGGAATACACGCCTAC	RV ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
FAT/CD36	FW CCCTCCAGAATCCAGACAAC	RV TGCATTGCCAATGTCTAGC
FAS	FW TCGAGGAAGGCACTACACCT	RV CACCCACTGGAAGCTGGTAT
SREBP-1c	FW AGCAGCCCCTAGAACAAACA	RV TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
PPAR-gama	FW CACAATGCCATCAGGTTTGG	RV TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
PLIN 2	FW AATATGCACAGTGCCAACCA	RV CGATGCTTCTCTCCACTCC
CPT 1	FW GCAGAGCACGGCAAAATGA	RV GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
MCP1	FW GCTGGAGAGCTACAAGAGGATCA	RV CTCTCTCTTGAGCTTGGTGACAAA
PGC1 alfa	FW AACCACACCCACAGGATCAGA	RV TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
PPAR alfa	FW CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	RV GCCGAATAGTTCGCCGAAA
IL1	FW ACGGATTCCATGGTGAAGTC	RV CTCACAAGCAGAGCACAAAGC
IL6	FW AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	RV ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
TNF alfa	FW TCAGCCGATTTGCTATCTCA	RV TGGAAGACTCCTCCAGGTA

Legenda: ChREBP, proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos; CPT, Carnitina palmitoil transferase I; FAT/CD36 translocase de ácidos graxos, FAS, sintase de ácidos graxos; IL, interleucina; PGC1, Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma; PLIN, Perelipin; PPAR, proliferador de peroxissoma receptor ativado; Mpc, Proteína de quimioatratadores de monócitos; SREBP1, proteína de ligação a elementos reguladores de esterol; TNF, fator de necrose tumoral.

Fonte: A Autora, 2020.

As reações de qPCR foram realizadas como se segue: depois de uma pré-desnaturação a ativação da polimerase foi programada para (4 min a 94°C), quarenta ciclos cada consistindo em 94°C durante 10 seg. e 60°C durante 14 seg. eram seguidos por um programa de curva de fusão (60-94 C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais cDNA foi substituído por água deionizada. A razão entre expressão de RNAm relativa (RQ) foi calculado

usando a equação $2^{-\Delta\Delta ct} - \Delta ct$ expressos como a diferença entre o número de ciclos (CT) do gene alvo endógeno e o de controle endógeno.

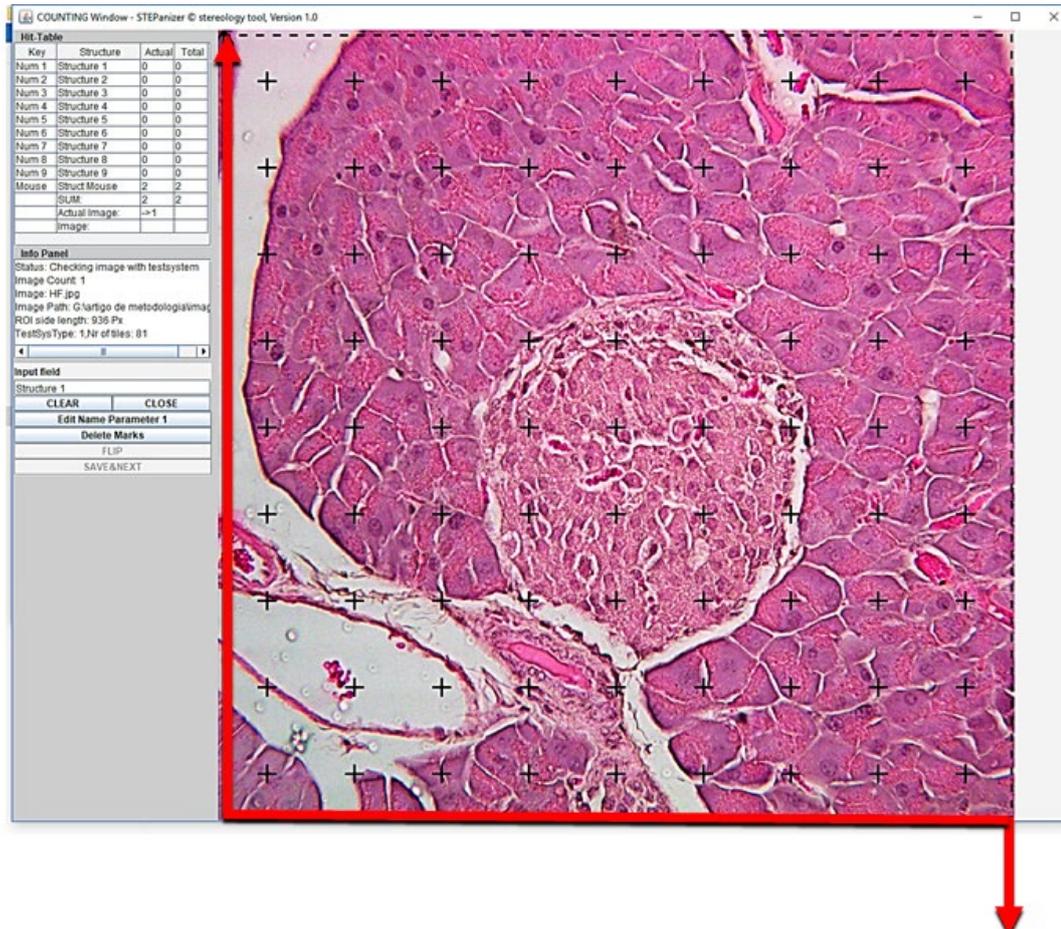
2.9 Pâncreas

Para as análises pancreáticas utilizamos os grupos que receberam dieta controle e dieta hiperlipídica e suas contrapartes que realizaram o Jejum Intermitente. O pâncreas de cinco animais de cada grupo foi dissecado, pesados e seguiram o protocolo de rotina de processamento para o pâncreas; enquanto que para a realização do isolamento de ilhotas pancreáticas foram utilizados dez animais (n=10).

2.9.1 Estrutura e estereologia

O pâncreas foi seccionado inteiramente com 4 μm de espessura. As seções foram coradas alternadamente com hematoxilina e eosina (HE) ou incubadas com anticorpos (anti-glucagon e anti-insulina) em uma proporção de 10 seções HE para uma seção imunocorada com anti-glucagon ou anti-insulina. Imagens digitais foram obtidas e campos aleatórios no pâncreas foram estudados por animal (microscópio Nikon modelo 80i e câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA). Resumidamente, a densidade de volume das ilhotas (V_v [ilhota, pâncreas]) foi estimada por contagem de pontos (a razão entre o número de pontos que atingem ilhotas, P_p [ilhota, pâncreas] e os pontos de teste do sistema de teste, PT) (132) Figura 11. Assim, a massa das ilhotas (M [ilhota, pâncreas]) foi estimada como o produto de V_v [ilhota, pâncreas] e massa do pâncreas (medido anteriormente).

Figura 11. Sistema teste gerado pelo software Stepanizer, para análise da ilhota pancreática

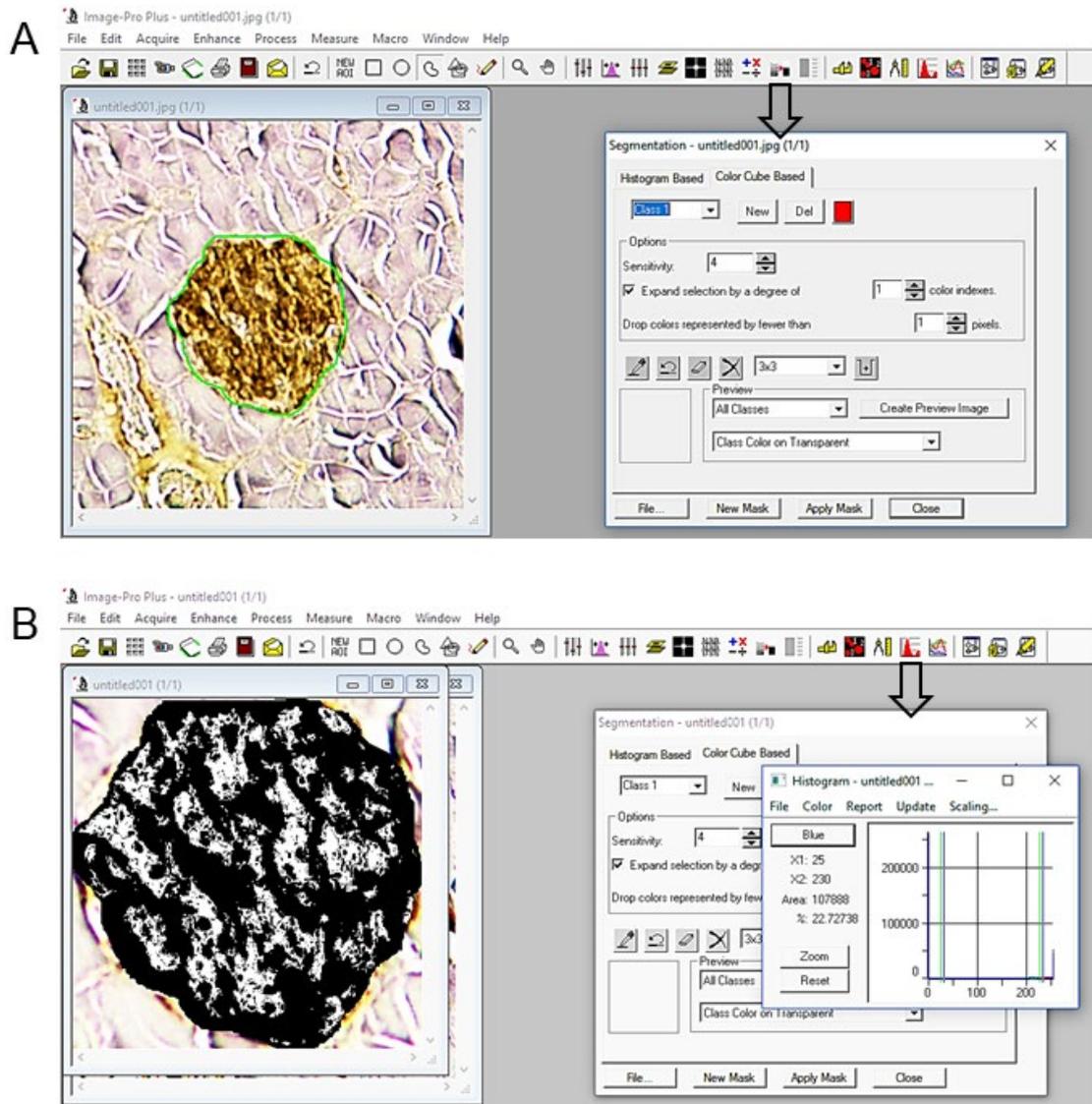


Fonte: A Autora, 2020.

A área seccional das ilhotas foi avaliada como $A [\text{ilhota, p\^ancreas}] = Vv [\text{ilhota, p\^ancreas}] / 2$. $QA [\text{ilhota, p\^ancreas}]$ (QA é a densidade numérica de ilhotas por área em uma estrutura de área conhecida, mas evitando a ilhota (133)). Além disso, as densidades de volume das células alfa e beta (Vv [célula alfa, ilhota] e Vv [célula beta, ilhota]) foram estimadas por análise de imagem em seções incubados com anti-glucagon (Ab1846, Abcam Cambridge, MA, EUA; 1: 100) e anti-insulina (sc-9168, Santa Cruz Biotech, CA, EUA; 1: 100) e depois incubados com anticorpos secundários biotinilados e conjugados estreptavidina-peroxidase. As seções foram lavadas em PBS, reveladas com diaminobenzidina líquida (DAB, Histostain Plus Kit, Invitrogen, CA, EUA) e contrastadas com hematoxilina. A ilhota com coloração imunohistoquímica foi descrita (a ferramenta 'região de interesse', ROI) e a imagem obtida na janela de deconvolução em cores foi a imagem DAB (área positiva para glucagon e área positiva para insulina) (Figura 12) medida em unidades de intensidade,

convertido em densidade óptica (%) (ImageJ v. 1.42/FIJI, <http://imagej.nih.gov/ij/>) (134).

Figura 12. Tela de impressão de duas etapas da estimativa da densidade de volume das células beta por análise de imagem



Legenda: A-delimitação da área de interesse, B - segmentação da região com imunomarcção com anticorpo anti-insulina e estimativa da densidade.

Fonte: A Autora, 2020.

Finalmente, a massa de células alfa (M [célula alfa, ilhota]) e a massa de células beta (M [célula beta, ilhota]) foram determinadas como o produto de V_v [célula alfa, ilhota] ou V_v [beta célula, ilhota] e M [ilhota, pâncreas] (130, 135).

2.9.2 Imunohistoquímica e Imunofluorescência das ilhotas

Para a técnica de imunohistoquímica, após a desparafinização, a recuperação antigênica do pâncreas foi realizada com tampão citrato (60°C, pH 6.0, por 20 minutos) a fim de facilitar a localização de proteínas intracelulares. Após isso, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpos primários: anti-insulina (insulina [H-86], sc-9168, Santa Cruz) e anti-glucagon (AB 36232, ABCAM ambos foram diluídos em 1:100. As reações foram amplificadas pelo amplificador (944D-31), seguido por incubação com detector de polímero HRP (944D-32) (HiDef Detecção HRP Polímero Sistema, Marque Celular, CA, EUA). Os cortes foram lavados em PBS, reveladas com 3'3'diaminobenzidine líquida (DAB Substrate Kit, Marque Celular, CA, EUA), e contrastadas com hematoxilina. As imagens digitais foram obtidas em um microscópio Leica DMRBE (Wetzlar, Alemanha) e câmera digital Lumenera Infinito (Ottawa, ON, Canadá).

2.9.3 Marcação dupla de células alfa e beta

A dupla marcação por imunofluorescência das expressões de insulina e glucagon permitiu observar a distribuição das células alfa e beta. As seções foram desparafinizadas e a recuperação antigênica utilizou tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos, bloqueando-o com cloreto de amônio e glicina a 2%. A ligação inespecífica dos anticorpos policlonais foi bloqueada por incubação em PBS / BSA a 4% e as seções foram incubadas com os anticorpos primários durante a noite a 4 ° C (anti-glucagon de coelho Ab1846, Abcam Cambridge, MA, EUA, 1:40 e porquinho-da-índia anti-insulina Ab7842, Abcam, 1:40). Os anticorpos secundários foram conjugados aos Alexa 446 e Alexa 488 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), Após lavagem em PBS, todas as lâminas foram montadas com DAPI para visualização dos núcleos celulares e slow-fade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) a fim de manter a fluorescência. Os controles negativos foram obtidos, omitindo os

anticorpos primários. As imagens digitais imunofluorescentes foram adquiridas com o microscópio confocal de varredura a laser Nikon (Modelo C2, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

Para imunofluorescência, após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada utilizando um tampão de citrato (60°C, pH 6.0, durante 20 minutos) e bloqueio com glicina a 2% em tampão de bloqueio (PBS/4%BSA). Os cortes foram simultaneamente incubados com anticorpo anti-insulina (ab7842, ABCAM) e anti-glucagon (ab36232, ABCAM). Os anticorpos primários foram diluídos a 1:40 em tampão de bloqueio (PBS/BSA a 1%) e incubados durante a noite a 4°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo: Alexa-488 (ovelha) para glucagon e Alexa - 446 (porquinho da índia) para insulina (Invitrogen , Molecular Probes , Carlsbad , CA , EUA), ambos diluídos a 1:40 em PBS / BSA a 1%.

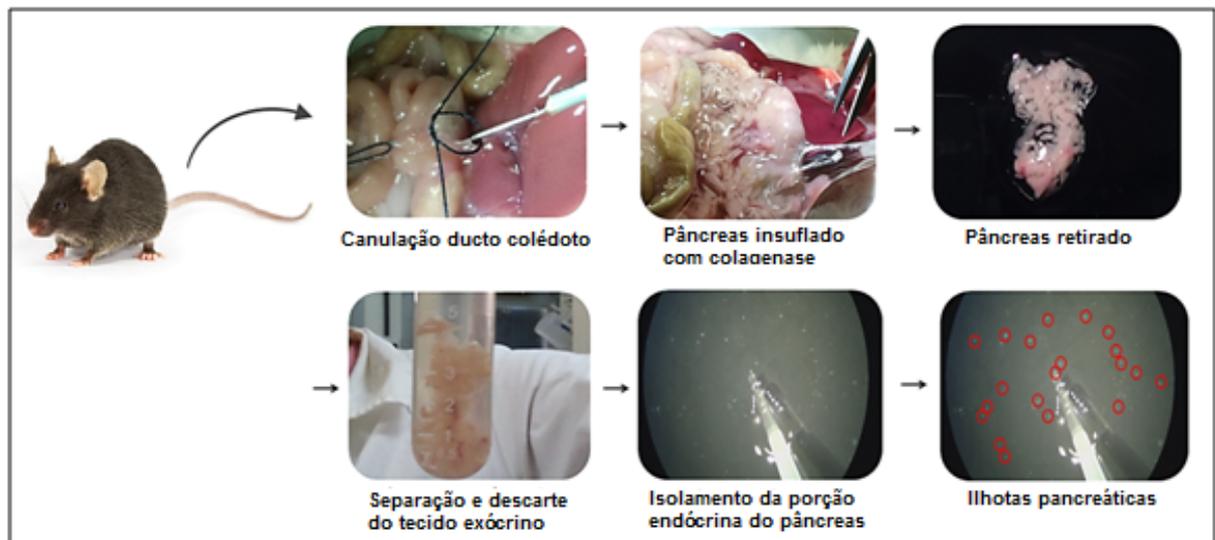
2.9.4 Isolamento das Ilhotas

Em outro grupo de animais, as ilhotas foram isoladas por digestão com colagenase (n = 4) (136), que consiste na destruição seletiva do parênquima exócrino pancreático. Para tanto, após incisão abdominal, o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar. O ducto biliar foi localizado e suas porções cranial (fígado e vesícula biliar) e caudal (duodeno) foram amarradas para evitar a saída de solução de colagenase. Introduziu-se uma cânula no interior do ducto biliar para que o pâncreas pudesse ser inflado através do ducto pancreático com solução de Hanks (suplementado com albumina sérica bovina – BSA 1,0 mg/mL) contendo 0,8 mg/mL de colagenase tipo V (C9263, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Foi injetado um volume inicial de três mL, completando-se para um volume final de cinco mL.

Posteriormente, o pâncreas foi removido, colocado em um tubo Falcon de 14 mL e submergido em banho-maria a 37 °C durante 14 minutos, para permitir a digestão do tecido exócrino pela colagenase. Em seguida, o tubo foi agitado vigorosamente durante 14 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático e, imediatamente, foi adicionado 10 mL de solução de Hanks resfriada (4 °C), com

objetivo de interromper a digestão pela collagenase. O digerido foi lavado três vezes com solução de Hanks resfriada e centrifugado a fim de desprezar o tecido exócrino. As ilhotas foram coletadas manualmente em placa de Petri com fundo preto, com auxílio de um microscópio estereoscópico com câmera (Luxeo 4D, LABOMED, CA, EUA) através da pipeta de Pasteur e imediatamente congeladas em freezer -80°C (Figura 13) e destinadas à técnica de Western blot.

Figura 13. Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da collagenase



Nota: Foi introduzida uma cânula no interior do ducto colédoco para que o pâncreas pudesse ser insuflado com solução de Hanks suplementada com BSA. O pâncreas então foi removido, colocado em tubo Falcon e incubado para permitir a digestão do tecido exócrino, seguida por sucessivas lavagens para a eliminação do tecido digerido. As ilhotas pancreáticas, preservadas pela digestão com collagenase, foram então isoladas e recolhidas.

Fonte: Adaptada de Borges, 2015 (137).

2.9.5 Western Blotting das Ilhotas Isoladas

As ilhotas foram centrifugadas (11.000 rpm a 4°C durante 10 minutos), o sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteína foi determinada utilizando um kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A mesma concentração de proteínas ($\sim 20\ \mu\text{g}$) por amostra foram desnaturadas (4 minutos a 100°C), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8-10%, SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de PVDF (polyvinylidifluoride, Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Sequencialmente, a membrana foi incubada com anticorpo primário (3% BSA) e anticorpo secundário (4% leite em pó desnatado Molico®), ambos diluídos em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 400 mmol/L de NaCl em temperatura ambiente, durante duas horas para evitar ligações inespecíficas.

As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários:

- a) AKT total (Akt / PKB, anti-coelho, 44-609G, Invitrogen; 1: 400 / 60 kDa);
- b) pAKT (Akt / PKB [pS473], anti-coelho, 44-621G, Invitrogen; 1: 400 / 64 kDa);
- c) β -actina (Beta actina anti-camundongo, SC81178, Santa Cruz, 1:1000/43KDa);
- d) IL6 (anti-coelho, interleucina-6, AB7737 Abcam; 1:400/21KDa);
- e) PDX1 (anti-cabra, homeobox duodenal pancreática 1, AB3403 Abcam, 1:400/46kDa);
- f) NF κ B (anti-coelho, fator nuclear kappa B, SC-109, Santa Cruz, 1:400/64KDa);
- g) p43 (anti-camundongo, supressor de tumor p43, Nb200-103 Novus Biologicals, 1:400/43KDa).

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico para a origem do anticorpo primário, durante uma hora à temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o Sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o software ImageJ, versão 1.41 (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA).

Após esta etapa, os anticorpos foram retirados das membranas por solução stripping e remarcados com beta-actina (anti-camundongo, SC81178, Santa Cruz Biotecnologia, 1:1000), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos.

2.10 Tecido Adiposo Subcutâneo (TBAs)

2.10.1 Calorimetria indireta

Os animais foram colocados nas gaiolas metabólicas do sistema de módulo de calorimetria por 72 h (as primeiras 24 h foram consideradas um período de aclimação e descartados da análise), uma semana antes do sacrifício (Oxylet System, Panlab Havard Apparatus, Barcelona, Espanha). Os grupos C e HF tiveram livre acesso a alimentos e água, mas os grupos C-IF e HF-IF seguiram o protocolo IF. A taxa de troca respiratória foi calculada pela taxa de produção de dióxido de carbono e captação de oxigênio medida pelo sistema. O estudo concentrou-se no gasto energético (EE) e quociente respiratório (QR) comparando os grupos nos dias de alimentação e jejum.

2.10.2 Índice de resistência à insulina em jejum

O índice de resistência à insulina em jejum foi avaliado: $FIRi = \text{glicemia de jejum} \times \text{insulina em jejum} / 24$ (138).

2.10.3 Estereologia TBAs

Os TBAs (entre a parte inferior da caixa torácica e a coxa) foram separados para microscopia ou congelados em nitrogênio líquido para análise molecular.

Os TBAs foram fixados com formaldeído incorporadas no Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seccionados em série com 4 μm de espessura, as seções foram coradas alternadamente com hematoxilina e eosina ou foi realizada imuno-histoquímica (ver descrição abaixo) As imagens das seções HE foram tiradas

com o microscópio BX41 e a câmera digital DP71 (Olympus Co., Tóquio, Japão), e a densidade do volume de adipócitos multiloculares nos TABs foi estimada pelo método de contagem de pontos em seções aleatórias ao longo dos TABs em um quadro contendo 49 pontos de teste (a significância do total de pontos contados foi determinada previamente usando um nomograma baseado na fórmula de Hally) (130, 139).

2.10.4 Imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a laser

A recuperação antigênica (tampão de citrato de pH 6,0 por 20 min) foi seguida por bloqueio de ligação não específica com cloreto de amônio, glicina a 2% e PBS/BSA a 4%. As seções foram incubadas com anticorpos primários anti-UCP1 (anti-cabra, SC-6429, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), PCNA (anti-coelho, CSB-PA01467A0Rb, Cusabio, Houston, TX, EUA) e CASP3 clivado (anti-coelho, CSB-PA000004, Cusabio). Os anticorpos Alexa Fluor 488 (UCP1 e CASP3 clivado) e 446 (PCNA) secundários anti-cabra ou anti-coelho foram utilizados para imunofluorescência. As lâminas foram montadas com SlowFade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) para manter a fluorescência, e os controles negativos foram obtidos pela omissão de anticorpos primários. As imagens digitais imunofluorescentes foram tiradas no microscópio Nikon Confocal Laser Scanning (Modelo C2, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

2.10.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)

O RNA total da amostra de TABs foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). A quantidade de RNA foi medida com espectroscopia Nano Vue (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) com 1 µg de RNA, tratado com DNase I (Invitrogen). A síntese do cDNA da primeira fita foi realizada utilizando um primer oligo (dT) para

o mRNA e a Transcriptase Reversa Superscript III (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). O qPCR foi realizado com o StepOne plus Cyclor e SYBR (Invitrogen). A expressão de cada gene alvo foi normalizada usando GAPDH. As intensidades de expressão dos genes foram analisadas por qPCR e os primers foram projetados usando o software Prime3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.3.0/>) (Figura 14). A proporção da expressão relativa de mRNA foi calculada usando $2^{-\Delta\Delta CT} - \Delta CT$ como a diferença entre o número de ciclos (CT) do gene alvo e o controle endógeno (140).

Figura 14. Primers utilizados no TABs.

Gene	FW	RV
<i>Adiponectina</i>	GGAACCTGTGCAGGTTGGAT	TCTCTCCAGGAGTGCCATCT
<i>Caspase 3</i>	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	CAGAGCGAGATGACATTCCA
<i>Cide a</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAACCTGTCCCGTCATCTGT
<i>Il 1</i>	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
<i>Il 6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Leptina</i>	CCTGTGGCTTTGGTCCTATC	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
<i>Mcp 1</i>	GCTGGAGAGCTACAAGAGGATCA	CTCTCTCTTGAGCTTGGTGACAAA
<i>Pcna</i>	TAGCCACATTGGAGATGCTG	GGTTACCGCCTCCTCTTCTT
<i>Tnf α</i>	TCAGCCGATTTGCTATCTCA;	TGGAAGACTCCTCCAGGTA
<i>Ucp 1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>Vegf α</i>	ATCTTCAAGCCGCTCTGTGT	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG
<i>$\beta 3ar$</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG
<i>β-actin</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

Legenda: $\beta 3ar$, adrenoceptor beta3; Cidea, ativador de morte celular a; Il, interleucina; Mcp, Proteína de quimioatratores de monócitos; Pcna, antígeno nuclear de célula em proliferação; Tnf, fator de necrose tumoral; Ucp, proteína de desacoplamento; Vegf, fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: A autora, 2020.

2.11 Análise estatística

Os dados foram as médias e desvios-padrão (DP) e foram analisados com a análise de variância de Brown-Forsythe e Welch (ANOVA, que não assume DP igual entre os grupos) e com o teste de comparações múltiplas de Dunnett T3 (recomendado para amostras pequenas) (141). O efeito da dieta e do JI e a interação entre esses dois fatores foram analisados com o teste ANOVA de duas vias e o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.

Nas primeiras oito semanas, tendo apenas dois grupos (C e HF), as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student com correção de Welch. Depois disso, as diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância de Brown-Forsythe e Welch já mencionados. Além disso, o efeito da dieta e do JI, e a interação entre esses fatores, foram testados com o teste ANOVA de dois fatores. O valor de $P < 0,05$ foi consistente com um nível estatisticamente significativo (GraphPad Prism v. 8.3 para Windows, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1 FÍGADO

A variação percentual nos dados foi calculada como a razão entre a variação do grupo que queremos conhecer (por exemplo, grupo HF) em relação a outro grupo (por exemplo, grupo controle) menos 1 (a unidade), e o resultado é apresentado como uma porcentagem.

3.1.1 JI afeta MC, glicose de jejum e índice de adiposidade, mas não a ingestão de alimentos

MC não foi diferente entre os grupos quando o estudo começou. Na oitava semana, o grupo HF apresentou a MC significativamente maior do que os grupos C (+12%) e HFr (+17%) (Tabela 2 e Figura 15). Os animais que realizaram JI apresentaram menor MC do que suas contrapartes: HF-JI vs. HF, -11%; HFr-JI vs. HFr, -16%; C-JI vs. C, -12%. No entanto, ao analisarmos o JI, os animais do grupo HF-JI apresentaram maior MC quando comparado ao HFr-JI, +23% (Tabela 2 e Figura 15).

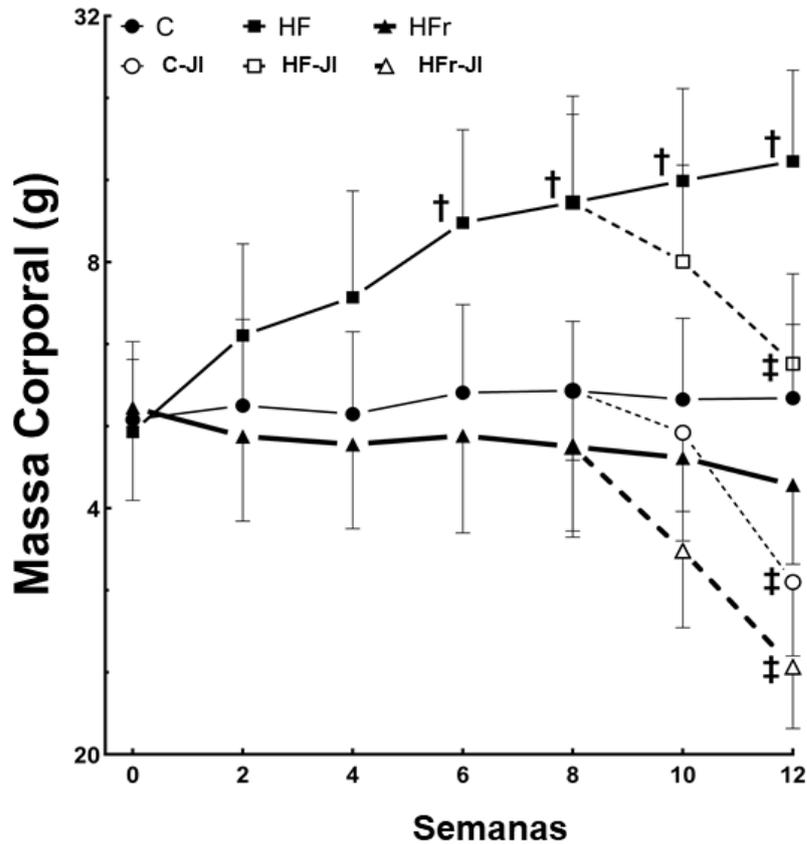
A glicemia de jejum aumentou 19% no grupo HF em comparação com o grupo C e 32% no grupo HFr em comparação com o controle (Tabela 2).

O índice de adiposidade foi 104% maior no grupo com HF quando comparado ao grupo C, mas diminuiu por causa do JI. C-IF versus C (-26%), HF-IF versus HF (-47%), HFr-IF versus HFr (-44%). O grupo HF-IF permaneceu maior que o grupo C-IF (+47%; Tabela 2).

Não houve diferença na ingestão alimentar nos dias que os animais foram alimentados. A ingestão cumulativa de alimentos diminuiu nos camundongos que fizeram JI em comparação com os seus homólogos: grupo C-JI vs C -41%; grupo HF-

JI vs. HF, -43% e grupo HFr-JI vs. HFr, -46%. No entanto, não houve diferenças entre os grupos que realizaram JI (Tabela 2).

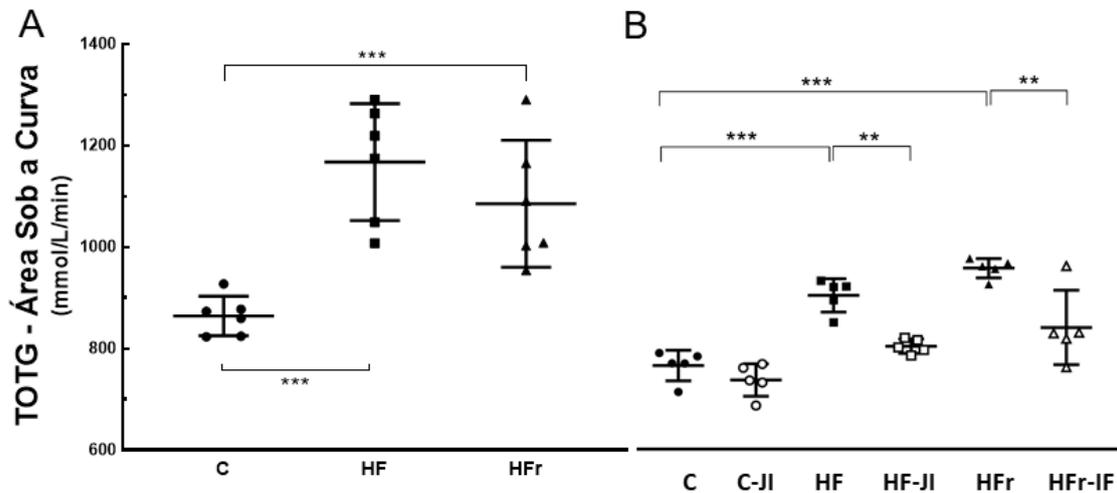
Figura 15. Evolução da massa corporal



Legenda: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).
 Nota: Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.
 Fonte: A autora, 2020.

3.1.2 JI diminui a intolerância à glicose devido à dieta

Tanto o grupo HF como o grupo HFr mostraram intolerância à glicose antes do JI (ASC foi elevada em comparação ao grupo C: HF +34%; HFr +26%. Houve melhora da tolerância à glicose nos grupos JI quando comparando a seus homólogos: HF-JI vs. HF, -11%; HFr-JI vs. HFr, -12%. O grupo HFr-JI continuou a apresentar a ASC elevada quando comparado ao grupo C-JI (+14%) (Figura 16).

Figura. 16. TOTG (com base na área sob a curva)

Legenda: (A) Antes do jejum intermitente. (B) Após jejum intermitente. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.1.3 JI afeta as concentrações plasmáticas de CT, TAG, insulina, adiponectina e leptina

Os níveis de CT foram maiores nos grupos HF e HFr do que no grupo C (HF, +31%; HFr, +44%). Os grupos JI apresentaram CT menor do que suas contrapartes: HF-JI vs. HF (-20%), HFr-JI vs. HFr (-20%). No entanto, em comparação com C-JI, os níveis de CT foram mais elevados no grupo HFr-JI (+31%), mas não no grupo HF-JI (Tabela 2).

Os níveis de TAG foram aumentados tanto no grupo HF quanto no grupo HFr em comparação com C (HF, +43%; HFr, +63%), mas os grupos JI apresentaram níveis de TAG menores que seus homólogos: HF-JI vs. HF (-22%); HFr-JI vs. HFr (-17%). Os níveis de TAG permaneceram elevados no grupo HFr-JI em comparação com C-JI (+33%) (Tabela 2).

Os níveis de insulina foram maiores nos grupos HF e HFr em comparação com C (+34% para ambos os grupos). Níveis mais baixos de insulina foram observados nos grupos JI comparados aos seus homólogos: HF-JI vs. HF (-27%); HFr-JI vs. HFr (-31%) (Tabela 2).

Os grupos HF e HFr mostraram níveis mais baixos de adiponectina em comparação com o grupo C (HF, -46%; HFr, -48%). O JI melhorou os níveis de adiponectina no grupo HFr-JI vs. HFr (+71%), mas não no grupo HF-JI. Além disso, tanto o grupo HF-JI quanto o grupo HFr-JI apresentaram níveis mais baixos de adiponectina que o grupo C-JI (HF-JI, -44%; HFr-JI, -29%) (Tabela 2).

Os níveis de leptina foram elevados nos grupos HF e HFr em comparação com o grupo C (HF, +141%; HFr, +34%). Entretanto, os níveis de leptina diminuíram no grupo HF-JI vs. HF (-29%) (Tabela 2).

3.1.4 JI diminui o HOMA-IR atenuando a resistência à insulina

O HOMA-IR foi maior no grupo HF (+ 81%) e no grupo HFr (+ 91%) em comparação com C. O grupo HF-JI apresentou um menor HOMA-IR que o grupo HF (31%), e o grupo HFr-JI apresentou HOMA-IR menor que o grupo HFr (38%; Tabela 2).

Tabela 2 - Comportamento alimentar e bioquímico

Pré JI	C		HF		HFr	
8ª semana						
Glicose jejum (mmol/L)	4,3±0,4		6,3±0,4‡		7,0±0,6‡†	
Massa corporal (g)	24,9±1,7		29,1±2,3‡		24,0±1,6†	
Pós JI	C	C-JI	HF	HF-JI	HFr	HFr-JI
12ª semana						
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	11,7±2,6	11,7±2,3	4,1±0,4‡	6,4±0,8#	4,9±0,9‡	8,4±1,0§#
ALT (U/L)	42,2±6,7	36,0±10,1	114,4±16,8‡	78,4±6,8†#	80,0±11,1‡†	46,4±10,1§†#*
AST (U/L)	67,6±8,2	69,6±4,4	130,2±16,6‡	94,8±9,3†	134,4±27,9‡	106,8±14,8#
CT hepático [(mg/dL)/g]	0,8±0,04	0,8±0,04	1,0±0,09‡	0,9±0,04	1,2±0,13‡†	0,9±0,06§
CT Plasma (mg/dL)	118,9±14,0	112,8±13,4	146,0±18,6‡	124,6±11,8†	183,9±20,2‡†	147,4±12,6§#
Glicose jejum (mmol/L)	4,4±0,2	4,4±0,2	7,3±0,4‡	7,0±0,4#	7,7±0,3‡	6,8±0,8#
HOMA-IR	2,04 ± 0,3	2,00 ± 0,3	3,71 ± 0,3‡	2,49 ± 0,6†	3,92 ± 0,1‡	2,41 ± 0,7§
Índice de Adiposidade	2,69 ± 0,4	1,98 ± 0,1‡	4,43 ± 0,8‡	2,92 ± 0,4†	2,81 ± 0,6	1,44 ± 0,6§‡
Ingestão Alimentar (g/c/jejum)	2,3 ± 0,1		2,2 ± 0,2		2,3 ± 0,06	
Ingestão Alimentar (g/c/alimentado)	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,06	2,3 ± 0,2
Ingestão Alimentar cumulativa (g/c/mês)	69,4 ± 4,6	34 ± 3,43 ‡	64,0 ± 8	30,7 ± 6,8 †	70,4 ± 1,3	30,8 ± 4,7 §
Insulina (IU/L)	8,4±1,2	8,2±1,2	11,4±0,3‡	8,4±1,8†	11,4±0,3‡	7,9±2,1§
Leptina (10 ² pg/mL)	14,0±2,2	14,3±3,2	36,1±4,2‡	24,7±2,4†#	20,2±2,4†	19,4±4,2
Massa corporal (g)	24,8±2,2	22,8±2,0‡	29,6±2,6‡	26,4±2,0†	24,4±1,6†	21,4±2,3§*
Massa do fígado (g)	1,0±0,02	0,8±0,14	1,3±0,10‡	1,1±0,17	1,3±0,21‡	1,1±0,07
TAG hepático [(mg/dL)/g]	1,6±0,14	1,4±0,3	2,4±0,28‡	1,8±0,13†	2,2±0,37‡	1,6±0,14§
TG Plasma (mg/dL)	63,6±12,3	64,4±9,3	91,0±8,1‡	71,2±6,9†	103,6±3,4‡	84,8±6,7§#

Legenda: † ≠ controle. ‡ ≠ grupo pareado sem JI. Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

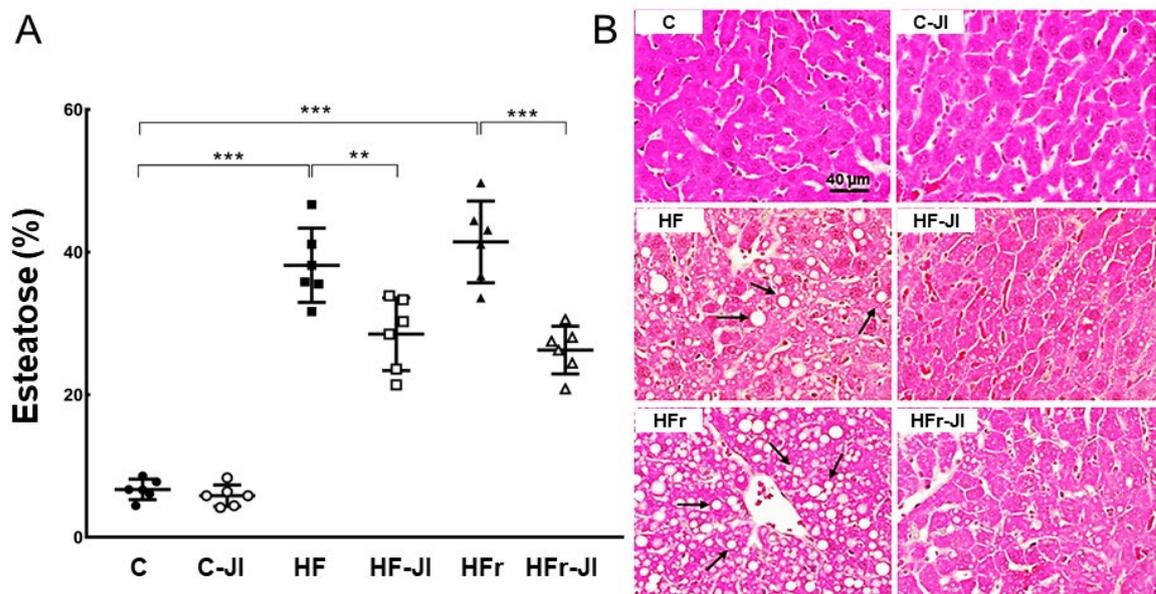
Nota: Dados apresentados como média ± DP. Significância estatística (P < 0,05).

Fonte: A autora, 2020.

3.1.5 JI reduz a esteatose hepática e os marcadores de lesão hepática

A massa hepática foi maior nos grupos HF e HFr em comparação com o grupo C (27% maior em ambos os grupos). O JI não reduziu a massa hepática (Tabela 2). Os níveis de CT hepáticos foram aumentados nos grupos HF e HFr do que no grupo C (HF, +17%; HFr, +40%) e houve diminuição no grupo HFr-JI vs. HFr (-24%). O TAG hepático foi maior nos grupos HF e HFr em comparação com grupo C (HF, +46%; HFr, +36%). O JI levou a uma redução dos níveis de TAG: HF-JI vs. HF (-28%); HFR-JI vs. HFr (-26%). Da mesma forma, ALT e AST foram aumentados nos grupos HF e HFR e diminuídos em suas contrapartes JI (Tabela 2). A esteatose hepática foi pronunciada nos grupos HF e HFr em comparação com o grupo C (HF, +468%; HFr, +416%). O JI levou a uma redução na esteatose: HF-JI vs. HF (-24%); HFR-JI vs. HFr (-37%). No entanto, os grupos HF-JI e HFr-JI ainda apresentaram maior grau de esteatose que o grupo C-JI (HF-JI, +390%; HFR-JI, +340%) (Figura 17A e B).

Figura 17. Esteatose hepática



Legenda: (A) Vv (esteatose, fígado) e (B) Fotomicrografias do tecido hepático. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

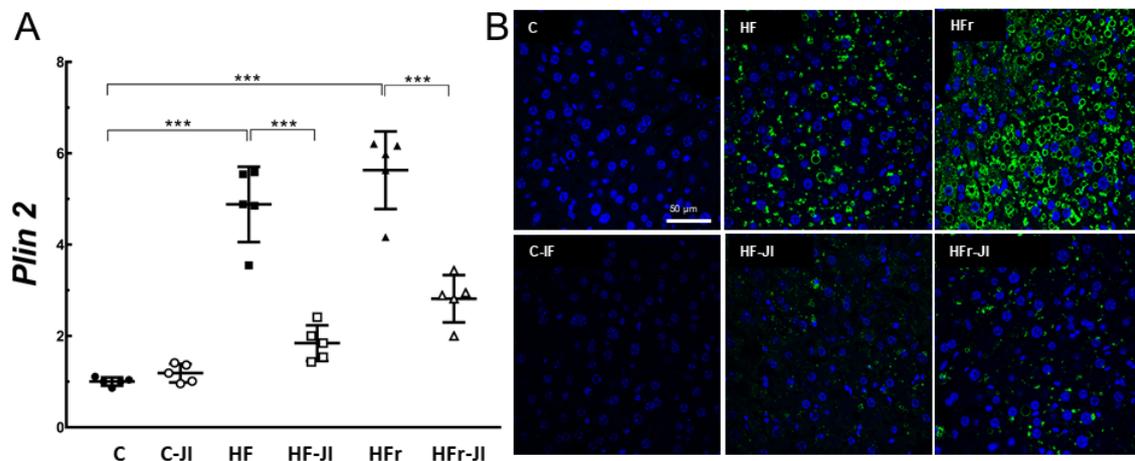
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.1.6 JI diminui o PLIN2 e a formação de gotículas lipídicas no fígado

O PLIN2 é a proteína que envolve a gotícula lipídica juntamente com os fosfolípidios e está envolvida na assistência ao armazenamento de lipídios neutros nas gotículas lipídicas. Tanto o grupo HF (+386%) quanto o grupo HFr (+461%) apresentaram maior PLIN2 em relação ao grupo C, e o JI reduziu o PLIN2 (HF-JI, -62%; HFr-JI, -40%) em comparação com suas contrapartes. No entanto, a expressão da proteína PLIN2 no grupo HFr-JI foi ainda maior do que no grupo C-JI (+134%) (Figura 18A). A imunofluorescência hepática de PLIN2 concordou com nosso achado. A marcação verde intensa indicou a presença de PLIN2 na membrana da superfície das gotículas lipídicas, especialmente nos grupos HF e HFr, enquanto os grupos que fizeram JI mostraram marcação verde menos intensa (Figura. 18B).

Figura 18. Expressão da perilipina 2 (PLIN 2) e microscopia confocal no fígado



Legenda: (A) Expressão proteica e (B) Microscopia confocal de varredura a laser. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

Nota: Em azul: núcleos celulares, DAPI; verde: PLIN2, Alexa 488. Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

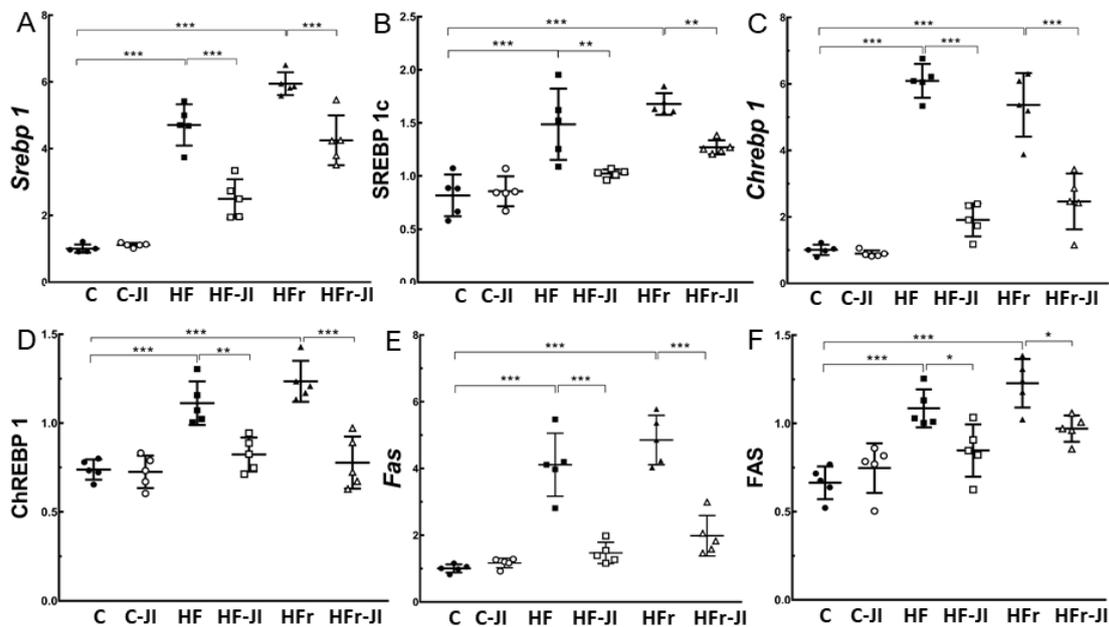
Fonte: A autora, 2020.

3.1.7 JI reduz com eficiência a lipogênese no fígado

A expressão da proteína SREBP1c foi maior nos grupos HF (+80%) e HFr (+104%) em comparação com o grupo C. O JI atenuou SREBP1c nos grupos HF-JI (-30%) e HFr-JI (-24%) em comparação com suas contrapartes. No entanto, o SREBP1c foi ainda mais elevado no grupo HFr-JI do que no grupo C-JI (+48%) (Figura 19A e B). Além disso, as expressões proteicas de ChREBP1, FAS e PPAR γ foram aumentadas nos grupos HF e HFr comparados com o grupo C e, nos grupos que fizeram JI houve redução desses parâmetros nos grupos HF-JI e HFr-JI em comparação com suas contrapartes (Figura 19D, F e 20C). As expressões gênicas de SREBP1c, ChREBP1, FAS e PPAR γ corroboraram com a expressão proteica (Figura 19A, C, E e 20A). Além disso, a expressão do gene CD36 foi maior nos grupos HF e HFr em comparação com o grupo C, e o JI diminuiu esses parâmetros nos grupos HF-JI e HFr-JI em comparação com suas contrapartes (Figura 20A).

Estudamos nove marcadores de lipogênese hepática e todos foram afetados pela dieta e FI como fatores independentes. Somente a expressão proteica do PPAR γ não mostrou efeito da interação entre dieta e JI (Tabela 3).

Figura 19. Vias de lipogênese no fígado.



Legenda: (A) expressão de RNA e (B) expressão proteica da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c; (C) expressão de RNA e (D) expressão proteica da proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos; (E) expressão de RNA e (F) expressão de proteínas da ácidos graxos sintase. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

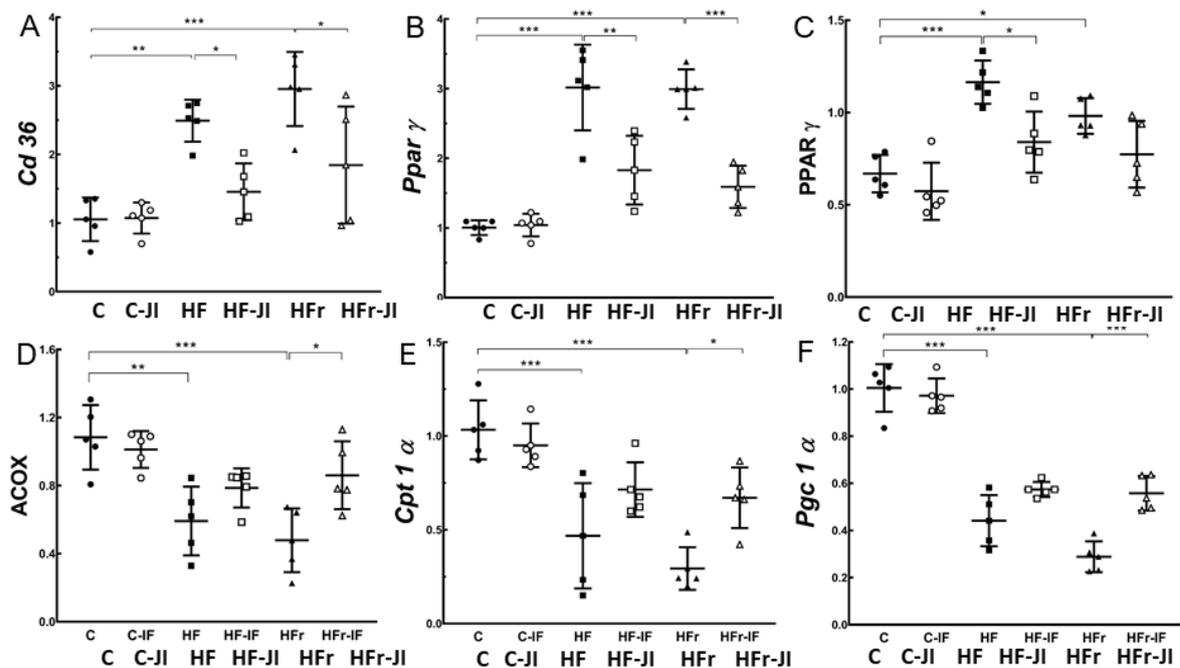
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.1.8 JI é relevante para melhorar a β -oxidação hepática

Com os marcadores de β -oxidação no fígado (gene e proteína), os resultados foram alguns diferentes dos observados na lipogênese. A β -oxidação diminuiu nos grupos HF e HFr em comparação com C, mas aqui o IF foi benéfico apenas para o grupo HFr (não no grupo HF; Figura 20D, F), exceto para PPAR α (Figura 21A, B). Todos os cinco marcadores de β -oxidação hepática foram afetados pela dieta ou JI como um fator independente, exceto o PPAR α (expressão proteica), que não foi afetado pelo JI. Dieta e JI não interagiram com os resultados de ACOX e PPAR α (gene e proteína; Tabela 3).

Figura 20. Lipogênese e vias de β -oxidação no fígado.



Legenda: A) expressões de RNAm do cluster de diferenciação (Cd) 36; (B) expressão de RNAm e (C) expressão de proteína do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo); (D) expressão proteica da acil-coenzima A oxidase (ACOX) 1; (E) a expressão de RNAm de palmitoil carnitina transferase (Cpt) 1 alfa; (F) expressão do RNAm do co-ativador do receptor g ativado por proliferador de peroxissomo (Pgc). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI). Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

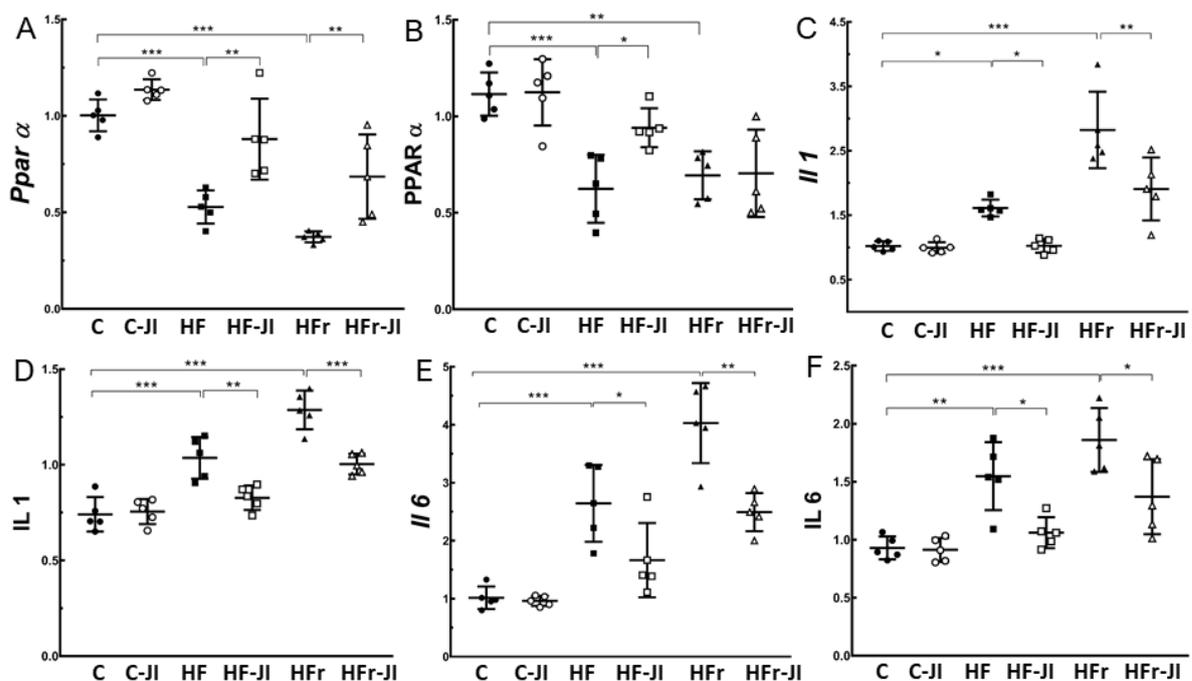
Fonte: A autora, 2020

3.1.9 JI tem efeitos na diminuição da inflamação no fígado

Constatou-se que os grupos HF e HFr tinham marcadores inflamatórios (gene e proteína) mais altos que C (Figuras 21C, F, 22A C), e IF reduziu a inflamação nos grupos HF e HFr, exceto TNF- α , que foi reduzido pelo JI apenas no grupo HFr (Figuras 22A, B).

Todos os sete marcadores de inflamação hepática foram afetados pela dieta ou pela JI como fator independente, o que também mostrou interação nos resultados observados (Tabela 3).

Figura 21. Beta-oxidação e marcadores inflamatórios no fígado.

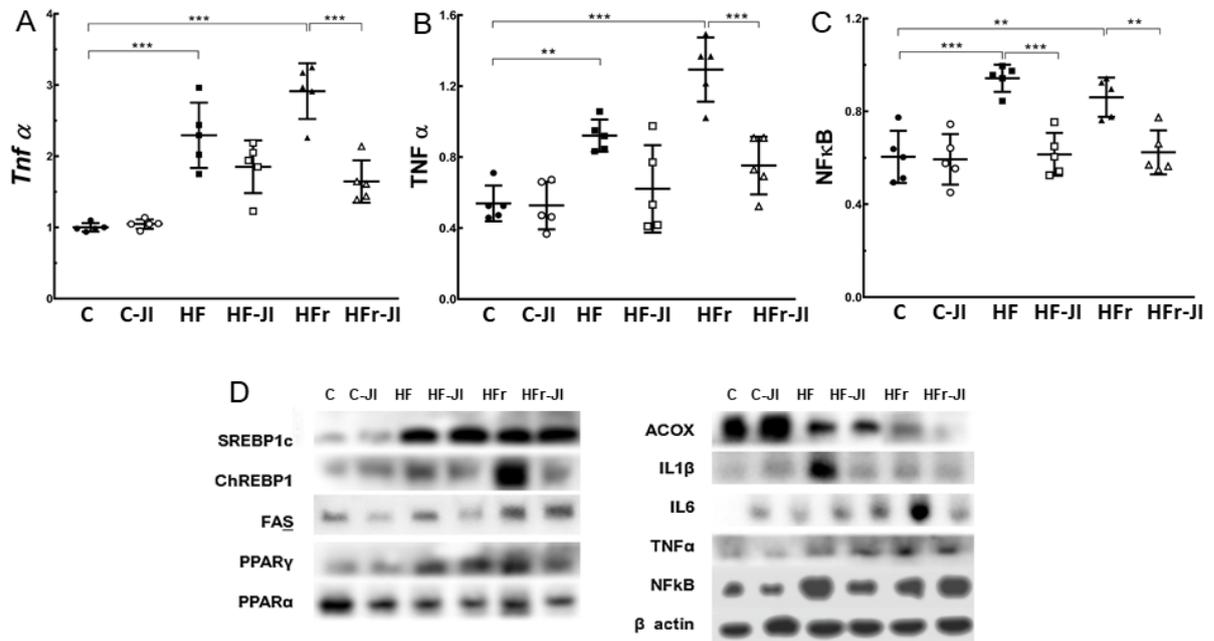


Legenda: (A) expressão do mRNA e (B) expressão proteica do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) alfa; (C) expressão de mRNA e (D) expressão de proteína da interleucina 1 beta; (E) expressão do mRNA e (F) expressão da proteína da interleucina 6. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

Figura. 22. Vias de inflamação no fígado e bandas representativas de Western blot.



Legenda: A) expressão de RNAm e (B) expressão proteica do fator de necrose tumoral (TNF) α ; (C) expressão proteica do fator nuclear kappa (NF) κ B; (D) imunotransferência representativa com bandas. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF), rica em frutose (HFr) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.1.10 Efeitos da dieta e JI sozinhos ou combinados (two-way ANOVA)

Individualmente, os dados foram afetados pela dieta e pelo JI (exceto o PPAR alfa que não foi afetado pelo JI). No entanto, nem sempre houve interação entre dieta e JI alterando os resultados (Tabela 3).

Tabela 3 - Two-way ANOVA testando os efeitos da dieta, JI e interação entre dieta e JI.

Dados	% do teste de variação e significância					
	Efeito dieta		Efeito JI		Dieta x JI	
	%	P	%	P	%	P
Massa corporal	37,43	0,0001	27,63	0,0002	0,3899	Ns
TOTG	44,14	<0,0001	23,71	<0,0001	4,214	0,0399
Colesterol total	41,4	<0,0001	18,91	0,0002	4,493	Ns
TG	48,76	<0,0001	13,94	0,0003	8,064	0,0149
Glicose	73,88	<0,0001	3,487	0,0422	3,832	ns
Insulina	12,8	0,0278	36,46	<0,0001	13,94	0,0212
Leptina	70,93	<0,0001	6,146	0,0044	7,941	0,0061
Adiponectina	68,72	<0,0001	6,639	0,0084	4,234	ns
Massa hepática	37,48	<0,0001	32,24	<0,0001	2,603	ns
Esteatose	76,84	<0,0001	9,348	<0,0001	4,766	0,0062
ALT	62,84	<0,0001	21,96	<0,0001	2,294	ns
AST	48,74	<0,0001	11,64	0,0017	7,304	0,0334
Colesterol hepático	33,34	<0,0001	33,34	<0,0001	18,43	0,0014
TG hepático	38,84	<0,0001	31,64	<0,0001	4,1	ns
Western blots						
SREBP1-c	44,13	<0,0001	14,23	0,0002	9,97	0,0073
ChREBP	30,32	<0,0001	32,98	<0,0001	17,34	0,0004
FAS	44,47	<0,0001	9,643	0,0044	12,42	0,0061
PPARgama	46,48	<0,0001	20,27	0,0004	4,088	ns
PPARalfa	43,79	<0,0001	4,148	ns	8,463	ns
ACOX	44,1	<0,0001	11,48	0,0107	7,046	ns
IL1 β	62,44	<0,0001	14,99	<0,0001	9,468	0,0014
IL6	40,14	<0,0001	17	0,0004	7,641	0,0416
TNF α	43,17	<0,0001	21,78	<0,0001	12,64	0,0046
NFkB	22,48	0,0006	34,49	<0,0001	16,64	0,0028
PLIN 2	40,89	<0,0001	26,07	<0,0001	14,76	<0,0001
PCR						
SREBP1-c	76,84	<0,0001	11,09	<0,0001	6,84	<0,0001
ChREBP	44,09	<0,0001	32,3	<0,0001	44,09	<0,0001
FAS	38,82	<0,0001	31,78	<0,0001	19,03	<0,0001
PPARgama	41,48	<0,0001	21,73	0,0001	11,99	0,0088
CD36	40,69	<0,0001	19,62	0,0004	10,46	0,0244
PPARalfa	49,77	<0,0001	18,46	<0,0001	2,011	ns
CPT1 α	43,87	<0,0001	9,107	0,0084	10,44	0,0179
PGC1 α	83	<0,0001	4,068	0,0003	4,124	0,0012
IL1 β	64,88	<0,0001	12,44	0,0002	6,498	0,0173
IL6	64,48	<0,0001	13,74	<0,0001	7,002	0,0094
TNF α	46,76	<0,0001	14,49	<0,0001	13,84	0,0004

Legenda: ChREBP, proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos; CPT, Carnitina palmitoil transferase I; FAT/CD36 translocase de ácidos graxos, FAS, sintase de ácidos graxos; IL, interleucina; JI, jejum intermitente; ns, não significativo; PGC1, Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma; PLIN, Perelipin; PPAR, proliferador de peroxissoma receptor ativado; Mcp, Proteína de quimioatratores de monócitos; SREBP1, proteína de ligação a elementos reguladores de esteroil; TNF, fator de necrose tumoral.

Fonte: A autora, 2020.

3.2 PÂNCREAS

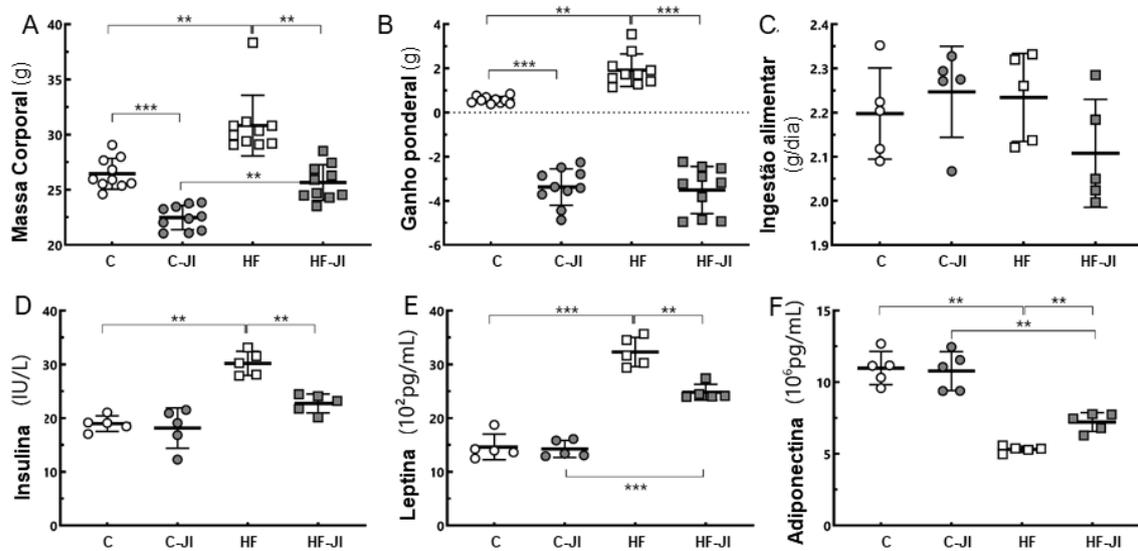
3.2.1 O jejum intermitente diminui a massa corporal e o ganho de massa corporal sem alterar a ingestão de alimentos no dia da refeição

No início do experimento os animais não apresentavam diferença quanto a MC. O grupo com HF apresentou MC final aumentada quando comparado ao grupo C (+17%) como esperado. O JI reduziu significativamente o MC no grupo C (-14%) e no grupo HF (-17%), mas o MC final ainda era alta no grupo HF-JI do que no grupo C-JI (+14%) (Fig. 23A). Portanto, o ganho de MC foi negativo em ambos os grupos JI (Fig. 23B). A ingestão de alimentos nos dias de alimentação (nos dias que se alternaram com os dias de JI quando os animais foram alimentados livremente) não indicaram diferença entre os grupos (Fig. 23C).

3.2.2 O jejum intermitente melhorou os níveis de insulina, leptina e adiponectina

As concentrações plasmáticas de insulina (Fig. 23D) e leptina (Fig. 23E) repetiram o mesmo resultado, um aumento no grupo HF em comparação ao grupo C e uma redução no grupo HF-JI em comparação ao grupo HF. No entanto, a leptina permaneceu mais alta no grupo HF-JI do que no grupo C-JI (Fig. 23E). A adiponectina era geralmente o inverso da leptina (Fig. 23F). A adiponectina foi menor no grupo HF que no grupo C, mas a HF-JI apresentou maior concentração de adiponectina que o grupo HF. No entanto, a adiponectina permaneceu mais deprimida no grupo HF-JI do que no grupo C-JI (Fig. 23F).

Figura. 23. Massa corporal, ingestão de alimentos e bioquímica do plasma



Legenda: (A) massa corporal final; (B) ganho de massa corporal; (C) ingestão de alimentos no dia alimentado; (D) insulina plasmática; (E) leptina plasmática; (F) adiponectina plasmática. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

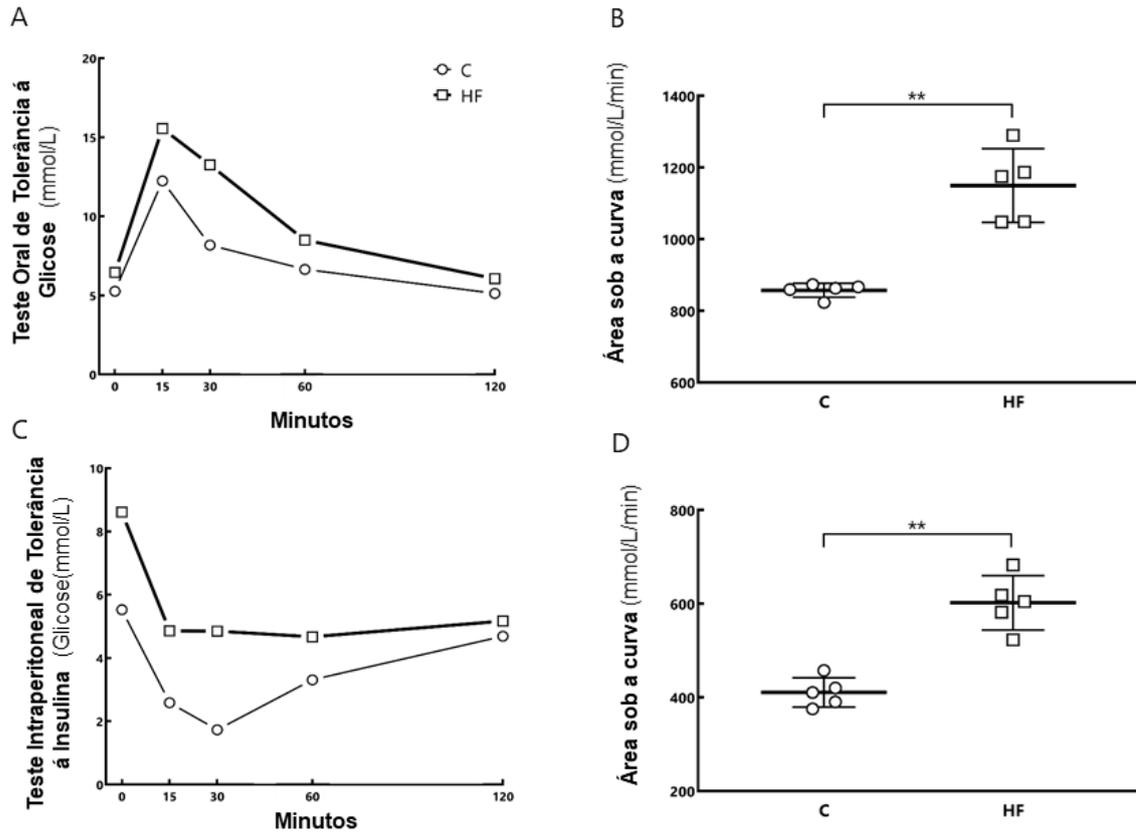
3.2.3 O jejum intermitente controlou a glicemia elevada de camundongos OID

O resultado é mostrado nas Figuras 24 e 25 (teste oral de tolerância à glicose, TOTG e teste intraperitoneal de tolerância à insulina, TITI - primeiro as curvas de evolução da glicose no sangue, seguidas da análise da área sob a curva, ASC em mmol / L / min, e a análise estatística). A Figura 24 mostra os achados após oito semanas de intervenção alimentar. A Figura 25 mostra os resultados após quatro semanas de jejum intermitente.

Ao final de oito semanas de dieta, os animais com HF apresentam ASC da glicose no sangue maior que nos animais controle, tanto no TOTG quanto no TITI o que confirma que os animais com HF apresentaram intolerância à glicose/ resistência à insulina. Após quatro semanas de JI, a análise ASC da glicose no sangue mostrou que o JI não teve ação nos animais controle, mas teve um efeito significativo nos animais com HF, embora o ASC da TOTG do animal HF-JI ainda permanecesse maior que o C-JI.

O HOMA-IR calculado no final do experimento corrobora esta análise. O HOMA-IR não mostrou diferença nos grupos C e C-JI, mas foi significativamente maior ($P < 0,04$) comparando C vs. HF (+120%) e C-JI vs. HF-JI (+60%) e menor comparando HF-JI vs. HF (-30%) (dados não mostrados).

Figura 24. Testes de glicose e insulina após oito semanas de dieta

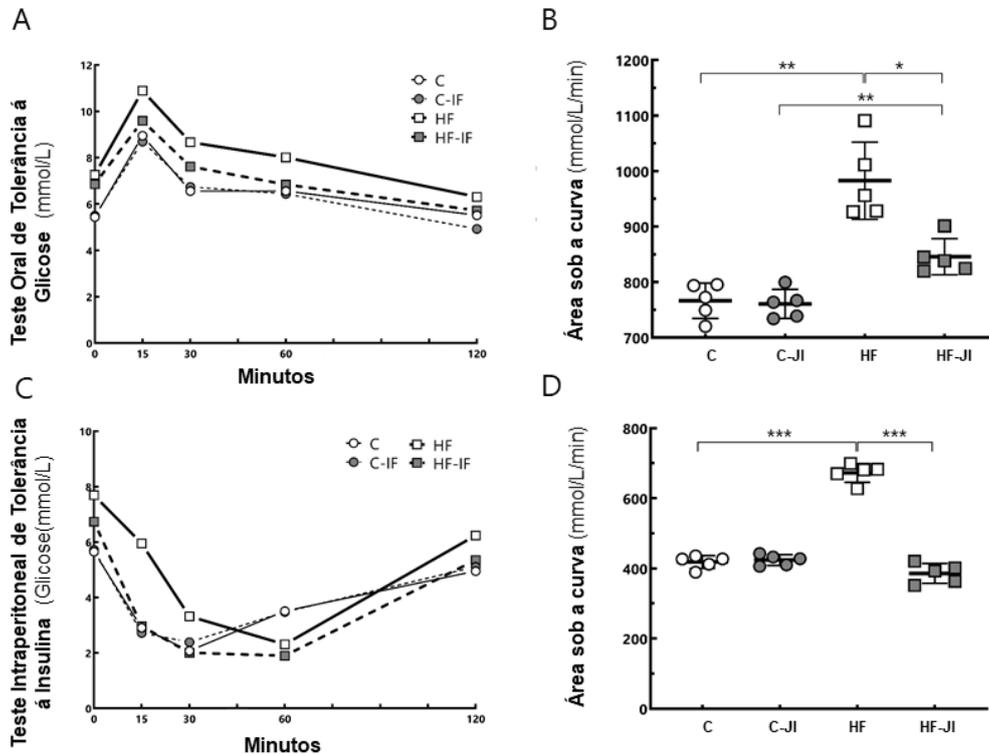


Legenda: (A) curva de evolução do teste oral de tolerância à glicose (glicemia, mmol / L); (B) área sob a curva (mmol / L / min); (C) curva de evolução do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (glicose no sangue, mmol / L); (D) Área sob as curvas (mmol / L / min). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 25. Testes de glicose e insulina após quatro semanas de jejum intermitente



Legenda: (A) curva de evolução do teste oral de tolerância à glicose (glicemia, mmol / L); (B) área sob a curva (mmol / L / min); (C) curva de evolução do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (glicose no sangue, mmol / L); (D) Área sob a curva (mmol / L / min). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

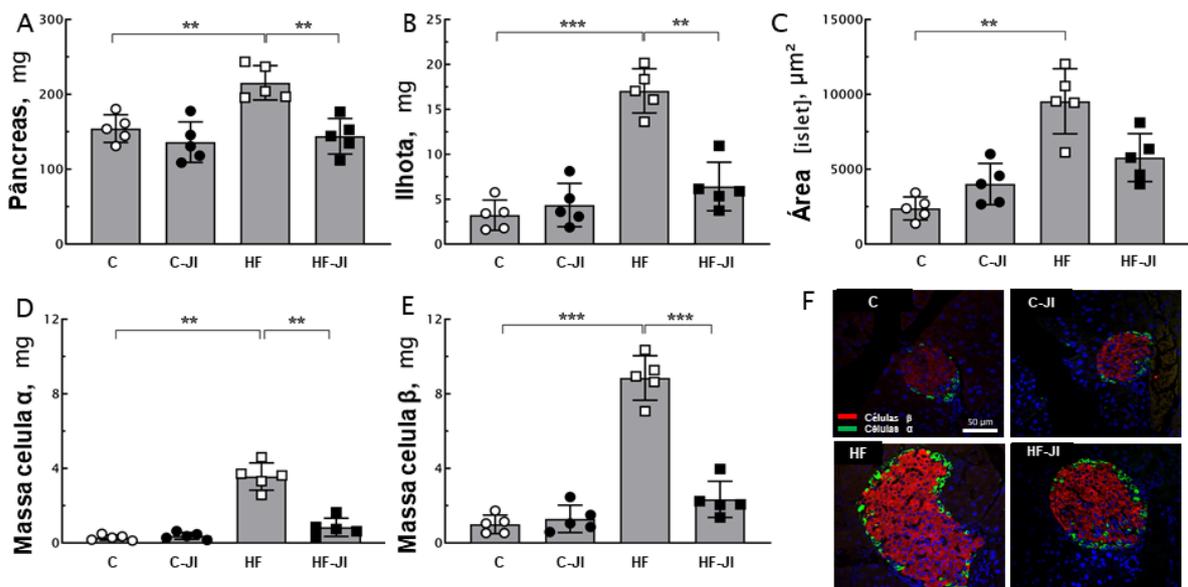
3.2.4 Jejum intermitente melhora a remodelação de ilhotas em camundongos OID

A massa do pâncreas foi maior no grupo com HF em comparação ao grupo C (+40%), e o JI reduziu em 33% no grupo com HF-JI em comparação ao grupo com HF (Fig. 26A). Comparativamente, a massa das ilhotas também foi maior no grupo HF do que no grupo C (+428%), e a JI diminuiu em 62% no grupo HF-JI em comparação ao grupo HF (Fig. 26B). A massa das ilhotas representou 2% de todo o pâncreas no grupo C, 3% no grupo C-JI, 9% no grupo HF e 4% no grupo HF-JI. A área seccional da ilhota no plano equatorial foi 300% maior no grupo com HF do que no grupo C (Fig. 26C). As Figuras 26D-E foram desenhadas na mesma escala para permitir a comparação e mostrar um resultado semelhante: maior massa de células das ilhotas no grupo HF

em comparação com o grupo C (célula alfa, + 1130%; célula beta, +782%). O JI reduziu a massa de células das ilhotas no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF (célula alfa, -76%; célula beta, -74%).

A massa de células alfa corresponde a 9% e a massa de células beta corresponde a 31% da massa de ilhotas nos grupos C e C-JI e 19% (célula alfa) e 42% (célula beta) no grupo HF e 13% (célula alfa) e 36% (célula beta) no grupo HF-JI. A Figura 26F ilustra representativamente as ilhotas com dupla marcação de imunofluorescência para glucagon (célula alfa em verde) e insulina (célula beta em vermelho) observadas no microscópio confocal de varredura a laser.

Figura 26. Fotomicrografias do pâncreas e ilhotas e dados quantitativos: ilhotas, células alfa e beta



Legenda: (A) Massa do Pâncreas, (B) massa da ilhota, (C) área transversal das ilhotas; (D) massa de células alfa; (E) massa de células beta e (F) Imunofluorescência para distribuição das células das ilhotas. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Dupla marcação para glucagon, célula alfa em verde e insulina, célula beta em vermelho; mesma ampliação para todas as figuras. A identificação dos grupos é indicada no canto superior esquerdo. Os dados são expressos como media e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.2.5 O jejum intermitente melhorou os marcadores moleculares das ilhotas

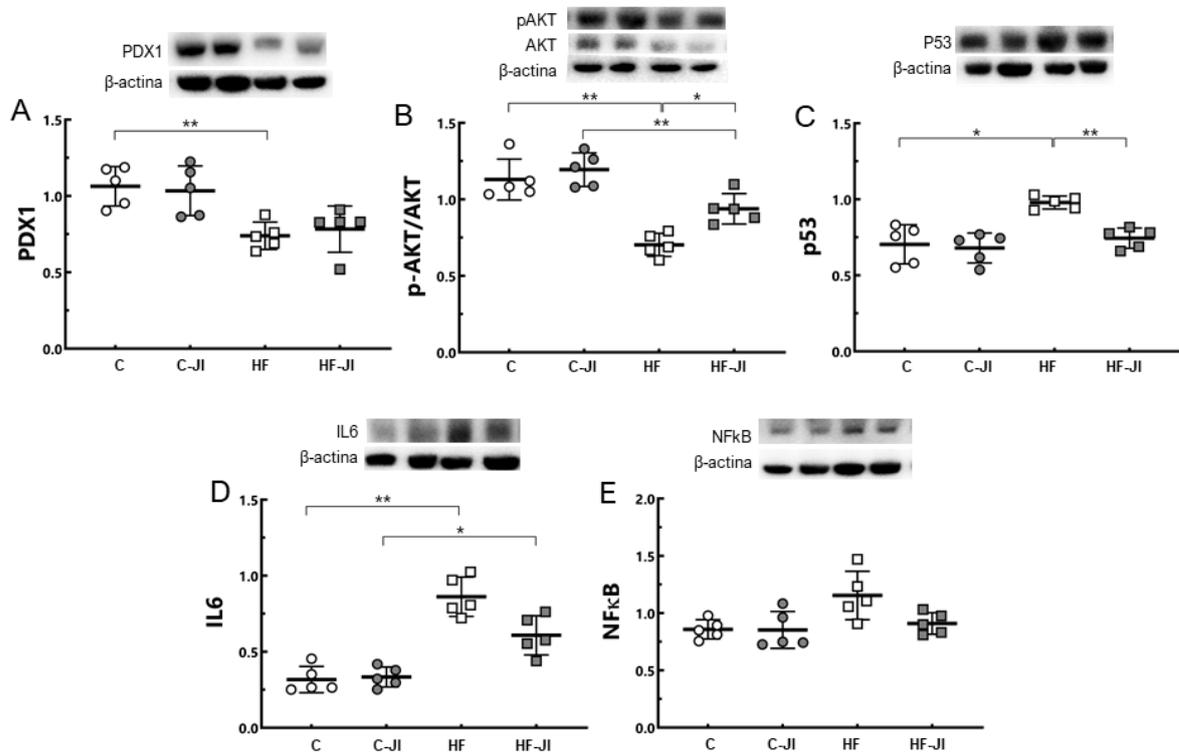
PDX1 (homeobox pancreática e duodenal 1) é um fator de transcrição de homeobox necessário para o desenvolvimento embrionário do pâncreas e um ativador transcricional de vários genes, incluindo insulina, somatostatina, glucocinase, polipeptídeo amilóide da ilhota e transportador de glicose tipo 2. Em nosso estudo, O PDX1 foi diminuído no grupo com HF comparado ao grupo C, e o JI não o alterou (Fig. 27A).

A serina/treonina quinase (AKT) tem um papel crítico na regulação de diversas funções celulares, incluindo metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, transcrição e síntese de proteínas. Em nosso estudo, a relação p-AKT / AKT diminuiu devido à dieta com IC e o JI aumentou a relação p-AKT / AKT comparando HF-JI versus IC. No entanto, a relação p-AKT / AKT permaneceu mais baixa no grupo HF-JI em comparação com o grupo C-JI (Fig. 27B).

O p53 (um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína nuclear) desempenha um papel no controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. Nosso estudo demonstrou que o p53 aumentou no grupo HF em comparação ao grupo C, e o JI diminuiu o p43 no grupo HF-JI em comparação ao grupo HF (Fig. 27C).

A IL6 é um mediador solúvel com efeito pleiotrópico na inflamação, resposta imune e hematopoiese. Aqui, a IL6 foi aumentada em HF vs. C e HF-JI vs. C-JI (Fig. 27D).

NFkB é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de vários genes ligados à resposta inflamatória. Nosso estudo não mostrou nenhuma mudança significativa na NFkB (Fig. 27E).

Figura 27. Expressões de proteínas das ilhotas

Legenda: (A) homeobox pancreática duodenal 1 (PDX1); (B) proteína cinase B fosforilada (pAkt) / Akt; (C) supressor de tumor 43 (p43); (D) interleucina-6 (IL6); (E) fator nuclear kappa B (NFkB). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como media e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020

3.2.6 Efeitos únicos e combinados da dieta e jejum intermitente (ANOVA dois fatores)

A Tabela 4 mostra os resultados de ANOVA de dois fatores (efeito da dieta, efeito da JI e interação entre dieta e JI). A dieta foi significativa em todas as análises de bioquímica plasmática, massa e pâncreas e expressões proteicas. A JI não foi substancial para adiponectina, área de ilhota e PDX1. Houve uma interação entre dieta e JI para inúmeras análises, mas não houve interação entre dieta e JI para insulina, massa corporal, área de ilhotas, p-AKT/AKT e PDX1. Quando a dieta e o JI foram significativas, a dieta teve um impacto relativo maior que a JI, exceto na massa corporal e na massa pancreática.

Tabela 4 - *Two-way* ANOVA testando os efeitos da dieta, jejum intermitente (JI) e a interação entre dieta e JI

Dados	Teste de porcentagem de variação e significância					
	Efeito da dieta		Efeito JI		Dieta vs. JI	
	%	<i>P</i> -valor	%	<i>P</i> -valor	%	<i>P</i> -valor
Bioquímica Plasmática						
Adiponectina	81.79	<0.0001	2.73	ns	3.26	0.0243
HOMA-IR	71.49	<0.0001	11.08	0.0003	9.10	0.0007
Insulina	46.74	<0.0001	14.62	0.0017	9.99	ns
Leptina	82.94	<0.0001	4.44	0.0013	4.90	0.0009
Massas e Pâncreas						
Massa de célula alfa	43.24	<0.0001	21.94	<0.0001	24.20	<0.0001
Massa de célula beta	42.62	<0.0001	22.26	<0.0001	26.14	<0.0001
Massa corporal	30.94	0.0003	44.24	<0.0001	0.76	ns
Área de ilhota	33.17	0.0418	0.63	ns	13.10	ns
Massa da ilhota	42.27	<0.0001	17.22	0.0004	24.07	<0.0001
Massa do pâncreas	21.11	0.0044	34.43	0.0006	12.64	0.0209
Expressão proteica						
IL6	71.03	<0.0001	4.98	0.0233	7.74	0.0114
p43	33.84	0.0007	20.19	0.0046	12.41	0.0190
p-AKT/AKT	62.73	<0.0001	12.37	0.0061	2.99	ns
PDX1	47.63	<0.0001	0.03	ns	0.91	ns

Legenda: HOMA-IR, homeostase para resistência à insulina; IL, interleucina; JI, jejum intermitente; ns, não significativo; P43, supressor de tumor 43; p-AKT/AKT, proteína cinase B fosforilada; PDX1, homeobox pancreática duodenal 1.

Fonte: A autora, 2020.

3.3 TABS

3.3.1 Jejum intermitente, alteração da massa corporal e escurecimento no TABs

Este resultado é mostrado na Tabela 5. Os camundongos iniciaram o experimento sem diferença no MC. Após oito semanas em sua dieta específica, o grupo HF apresentou um MC 14% maior que o grupo C ($P = 0,004$). Após JI (semana

12), o MC foi 16% maior no grupo com HF do que no grupo C ($P = 0,01$), e o JI diminuiu o MC em -13% comparando os grupos C e C-JI ($P = 0,009$) e -14% entre os grupos HF e HF-JI ($P = 0,008$). No entanto, persistiu uma diferença comparando HF-IF e C-JI ($+14\%$, $P = 0,02$). Embora não exista diferença na ingestão de alimentos entre os grupos em dias de jejum e dias de alimentação, a ingestão de energia foi maior no grupo HF ($+28\%$, $P = 0,01$) e HF-JI ($+31\%$, $P = 0,006$) do que seus pares. A JI aumentou o escurecimento nas TABs (figura 28) em $+3740\%$ em C-JI vs. C ($P = 0,002$), $+13420\%$ em HF-JI vs. HF ($P = 0,01$). No entanto, o escurecimento nos TABs foi reduzido em -44% em HF-JI vs. C-JI ($P = 0,02$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa corporal, ingestão de alimentos, ingestão de energia e escurecimento no tecido adiposo subcutâneo (TABs)

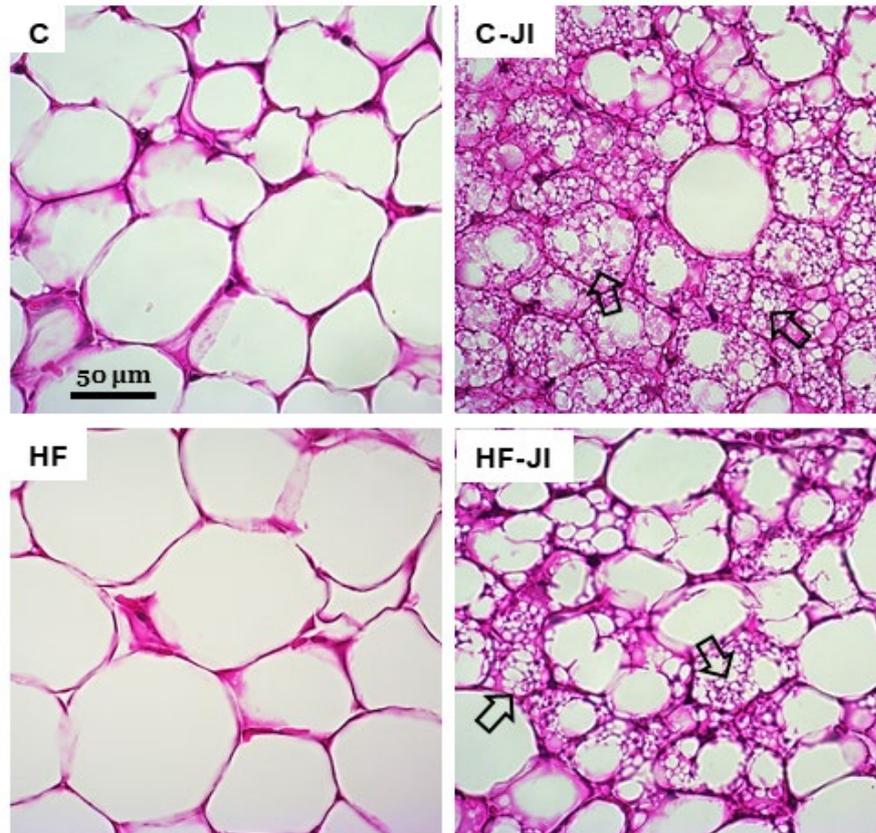
Dados	C	HF		
Antes de 'JI'				
Massa corporal (g, 1ª semana)	20,40±0,32	19,64±0,23		
Massa corporal (g, 8ª semana)	24,74±0,44	29,3±1,48†		
	C	C-JI	HF	HF-JI
Após 'JI' (12ª semana)				
Massa corporal (g)	26,36±0,91	22,84±1,30†	30,69±1,62†	26,09±1,24‡
Consumo de energia (kJ)	14480±4604	14420±4810	19860±8600†	20400±8144§
Ingestão de alimentos (g/c / jejum)	2,3±0,1	-	2,3±0,2	-
Ingestão de alimentos (g/c / alimentado)	2,3±0,1	2,2±0,1	2,3±0,2	2,4±0,1
TABs (% de escurecimento)	1,1±0,7	42,8±8,4†	0,3±0,2	22,6±7,8‡§

Legenda: Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP. Significância estatística quando comparado ao grupo C (†), comparado ao grupo HF (‡) e comparado ao grupo C-IF (§) $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2020

Figura 28. Fotomicrografias dos TABs coradas com hematoxilina e eosina



Legenda: Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

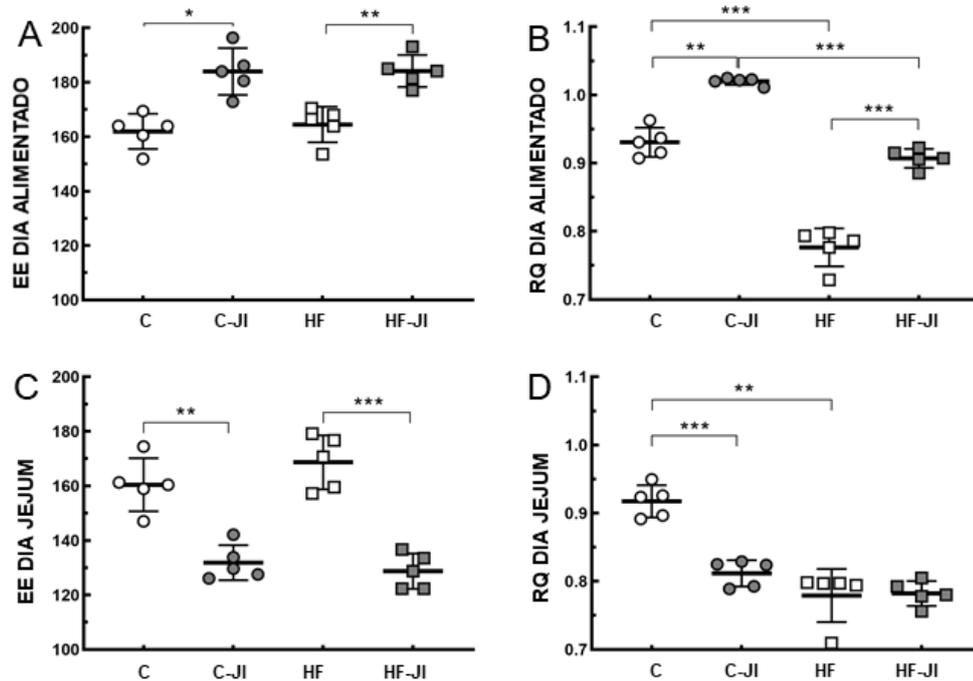
Nota: Nos campos representativos das TABs, os adipócitos são maiores no grupo HF do que no grupo C, e no grupo JI observamos adipócitos multiloculares nos dois grupos C-JI e HF-JI (setas abertas) (mesma ampliação para todas as imagens). Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020

3.3.2 Termogênese modificada pelo jejum intermitente em animais

Esta análise considerou os animais separadamente nos dias de alimentação e jejum. A Figura 29 ilustra a análise de EE e RQ. Nos dias alimentados, a JI aumentou o EE e o RQ nos dois grupos C-JI (+ 10%) e HF-JI (+ 17%) do que em suas contrapartes sem JI (figuras. 29A-B). Pelo contrário, nos dias de jejum, a JI diminuiu EE (-18%) e RQ (-12%) no grupo C-JI em comparação com o grupo C. Apenas EE foi reduzida (-24%) no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF (figuras. 29C-D).

Figura 29. Calorimetria indireta: gasto energético e quociente respiratório



Legenda: (A) EE no dia alimentado; (B) RQ no dia alimentado; (C) EE em dia de jejum; (D) RQ em dia de jejum), gasto energético (EE) e quociente respiratório (RQ). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

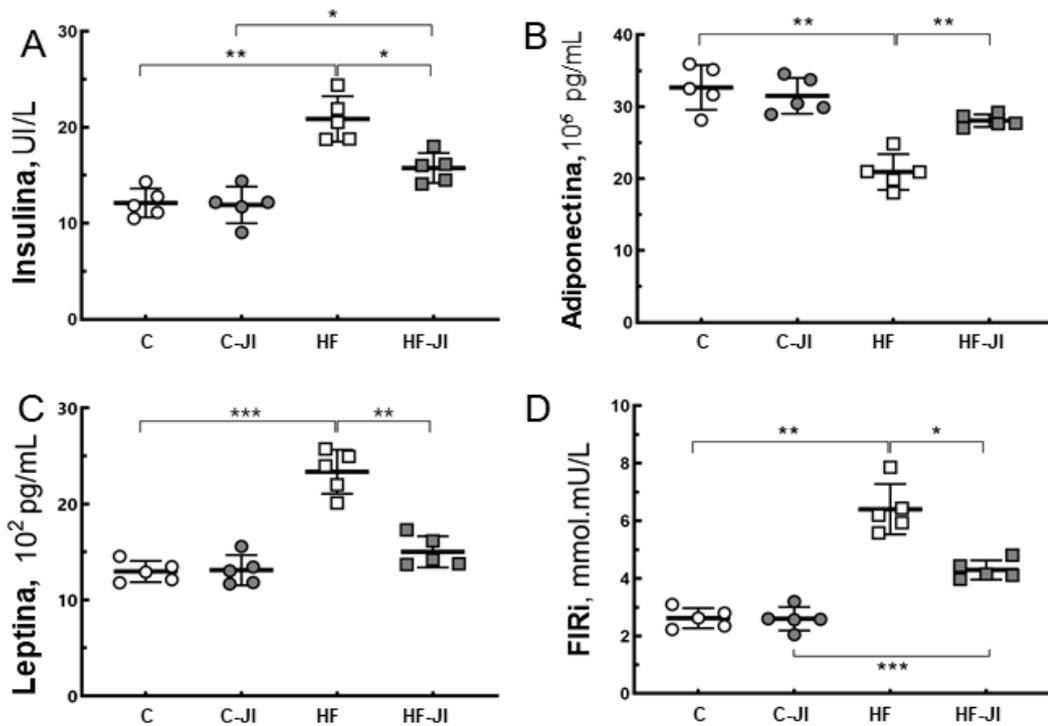
Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.3.3 Adipocinas e insulina são alteradas pelo jejum intermitente

A Figura 30 resume como a JI modifica os níveis plasmáticos de insulina, adiponectina, leptina e índice de resistência à insulina em jejum (FIRi). Os níveis de insulina (+ 70%) e leptina (+ 80%) foram maiores e a adiponectina foi menor (-34%) no grupo com HF quando comparado ao grupo C. Embora no grupo C, a JI não alterou os níveis de adipocinas e insulina, no grupo HF-JI a insulina (-24%) e a leptina (-34%) foram menores, e a adiponectina (+ 34%) foi maior que no grupo HF. Os níveis de insulina continuaram mais altos no grupo HF-JI em comparação ao grupo C-JI (+ 32%). Como esperado, o FIRi foi aumentado no grupo HF (+ 144%) do que no grupo C e aumentado no grupo HF-JI (+ 64%) do que no grupo C-JI. No entanto, a JI reduziu o FIRi no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF (Fig. 30D).

Figura 30. Níveis plasmáticos de adipocinas, insulina e índice de resistência à insulina em jejum

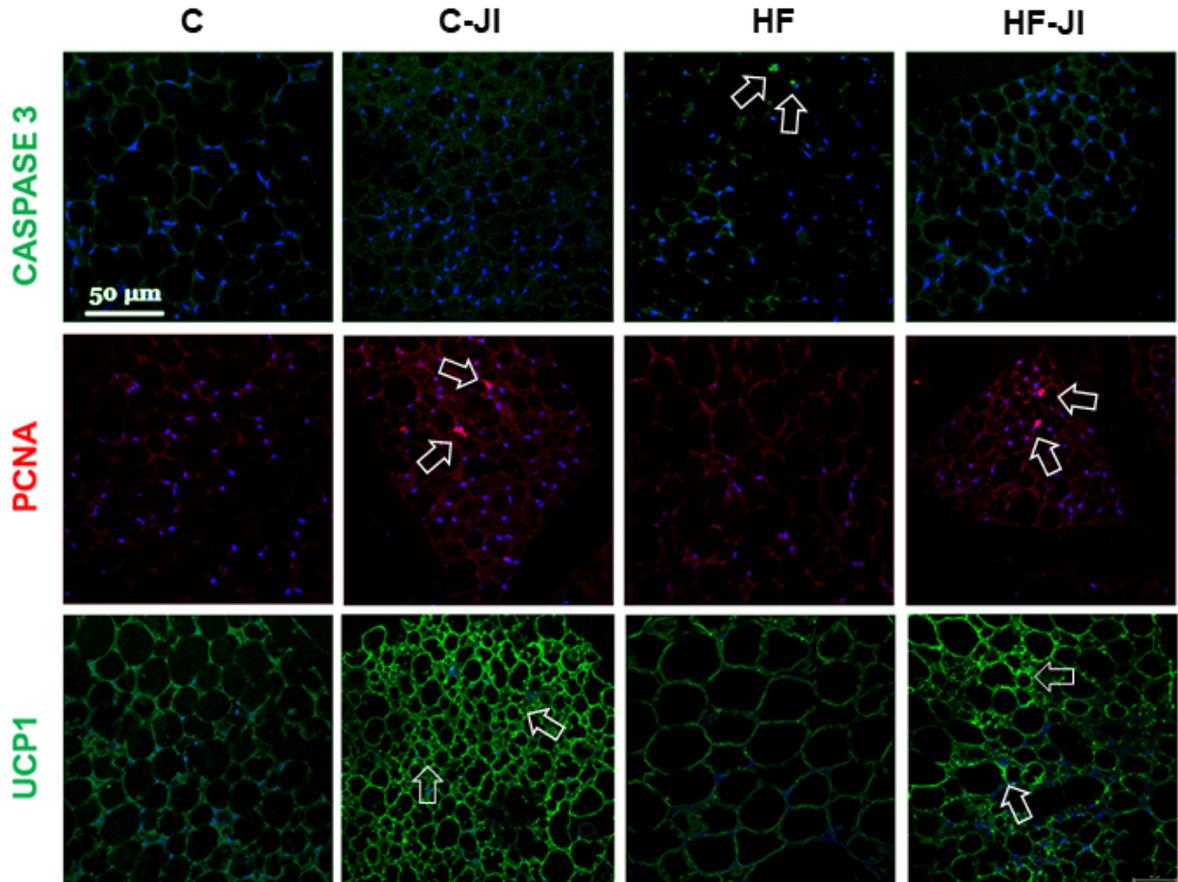


Legenda: (A) insulina; (B) adiponectina; (C) leptina; (D) FIRi (índice de resistência à insulina em jejum). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).
 Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.
 Fonte: A autora, 2020.

3.3.4 Imunofluorescência para Caspase 3, PCNA e UCP1 em TABs

Este resultado é exemplificado na Figura 31 (microscopia confocal de varredura a laser). A caspase 3 pertence às endoproteases ligadas à inflamação e apoptose. A fluorescência da Caspase 3 é observada no grupo HF, mas não no grupo HF-JI ou nos outros grupos. O PCNA é considerado um marcador da proliferação celular e foi fluorescente nos grupos C-JI e HF-JI. A UCP1 desempenha um papel no equilíbrio metabólico e energético e na regulação, termogênese induzida por dieta e frio, os mecanismos associados à patogênese da obesidade (UCP1 é uma proteína transmembranar encontrada nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom). A fluorescência da UCP1 foi aumentada nos grupos JI.

Figura 31. Imunofluorescência em TABs



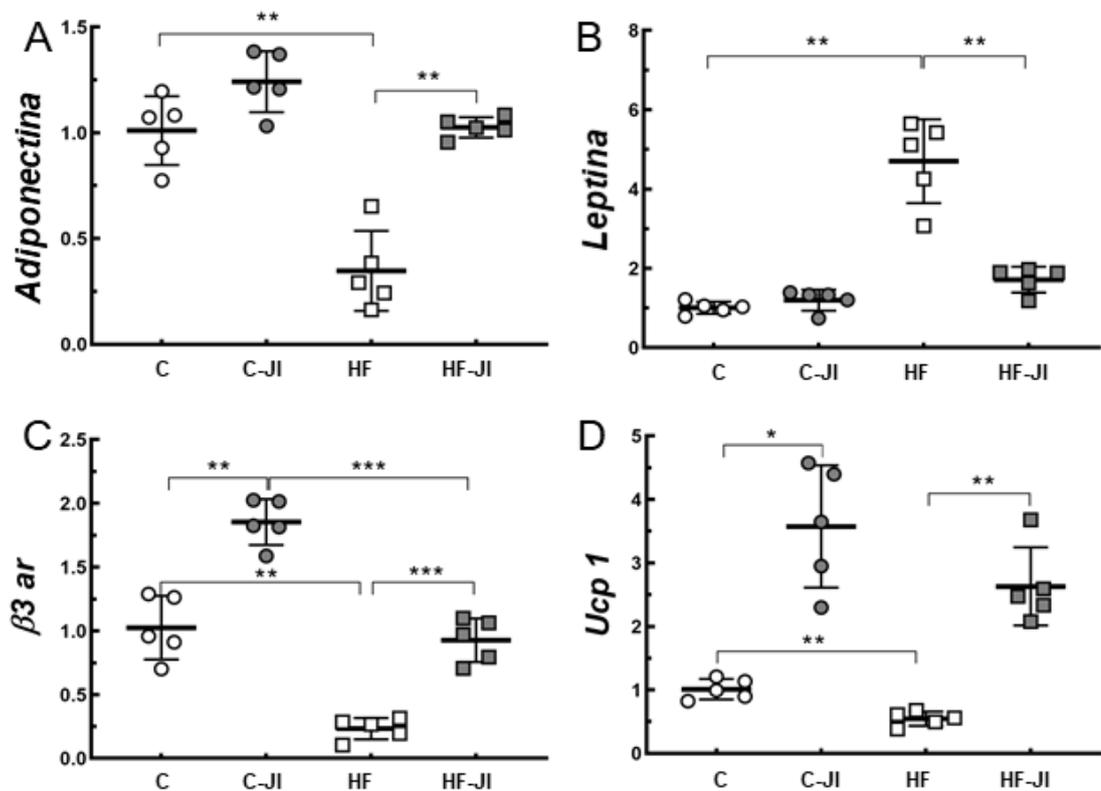
Legenda: antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e Tecido Adiposo Branco subcutâneo (TABs). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).
 Nota: Microscopia confocal de varredura a laser, mesma ampliação para todas as imagens. Visualizamos a coloração da CASPASE 3 no grupo HF (setas abertas), mas o PCNA foi melhor observado nos grupos JI (C-JI e HF-JI, setas abertas). UCP1 também foi melhor detectável nos grupos JI (setas abertas).
 Fonte: A autora, 2020

3.3.5 O jejum intermitente altera a expressão gênica de adipocinas, receptor adrenérgico β 3 e Ucp1 em TABs

Como o que vimos no plasma, a JI pode reduzir a expressão do gene da leptina (-64%) e aumentar a adiponectina (+ 1970%) no grupo HF-JI em comparação ao grupo HF. (Figura 32A-B). O β 3ar é vital para o processo de escurecimento e geralmente é reduzido na obesidade (aqui foi menos expresso no grupo com HF, -80%, do que no grupo C). No entanto, JI aumentou a expressão de β 3ar (+ 80% no

grupo C-JI em comparação com o grupo C; + 300% no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF) (Fig. 32C). A expressão do gene Ucp1 na TABs também foi reduzida na obesidade (-44% no grupo com HF do que no grupo C). No entanto, a JI foi eficaz no aumento da Ucp1 (+ 240% no grupo C-JI em comparação com o grupo C; + 380% no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF) (Fig. 32D).

Figura 32. Expressões de genes de adipocinas e marcadores termogênicos em TABs



Legenda: A) Adiponectina; (B) leptina; (C) $\beta 3$ -ar; (D) Ucp 1. Receptor adrenérgico $\beta 3$ ($\beta 3$ -ar, Tecido Adiposo Branco subcutâneo (TABs) e proteína desacopladora (Ucp1). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como media e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P <0,05, ** P <0,001 e *** P <0,0001.

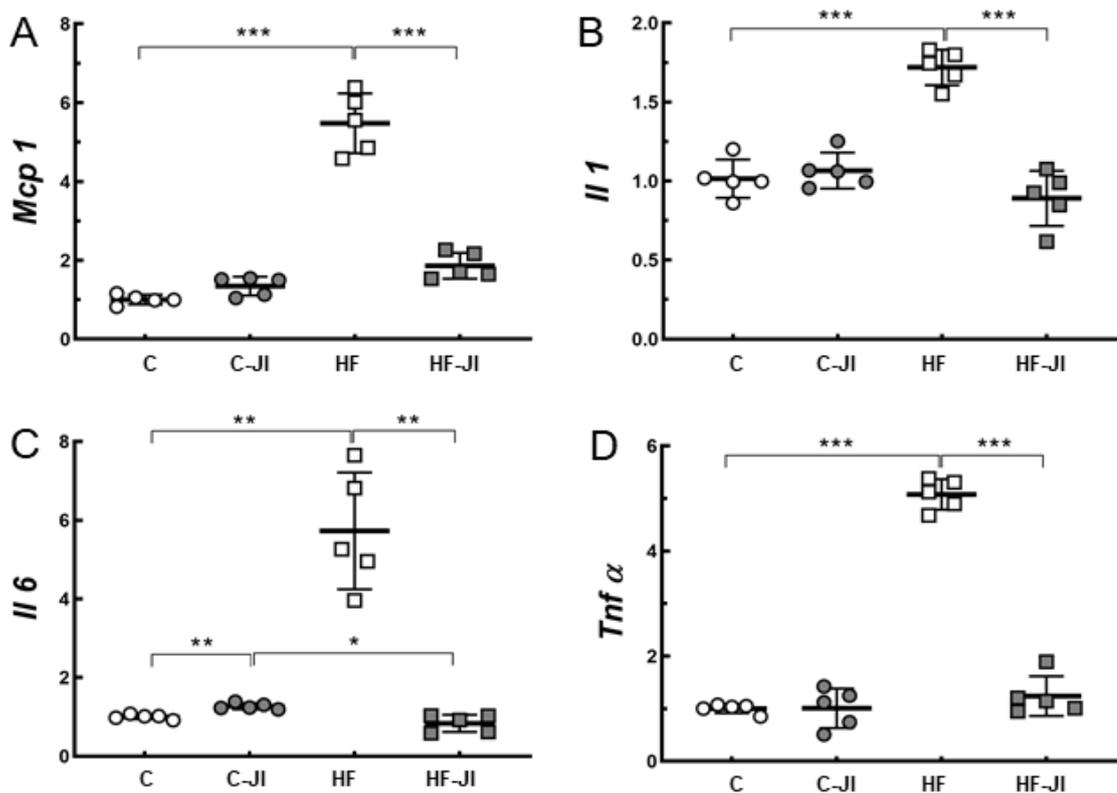
Fonte: A autora, 2020.

3.3.6 O jejum intermitente reduz a inflamação nos TABs

A Figura 33 é notória por mostrar como JI reduziu a expressão gênica de marcadores inflamatórios em TABs (todos esses marcadores foram aumentados no grupo HF em comparação ao grupo C). Comparando o grupo HF-IF com o grupo HF,

Mcp1 diminuiu -64% (Fig. 33A), Il1 diminuiu -40% (Fig. 33B), Il6 reduziu -84% (Fig. 31C) e Tnf α reduziu -74 % (Fig. 33D).

Figura 33. Expressões gênicas de marcadores inflamatórios (RNAm) em TABs



Legenda: (A) Mcp1; (B) Il1; (C) Il6; (D) Tnf alfa. Interleucina (Il); Proteína quimioatrativa de monócitos (Mcp); Tecido Adiposo Branco subcutâneo (TABs) e fator de necrose tumoral (Tnf). Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

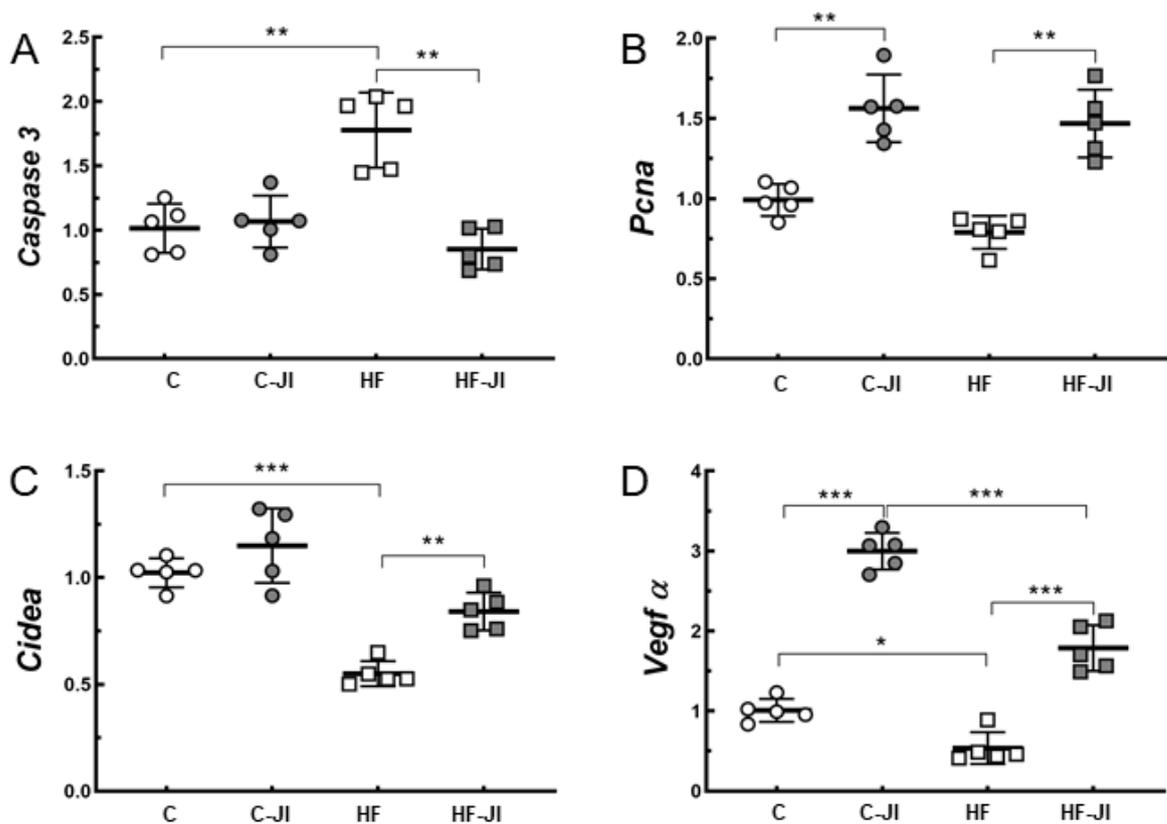
Fonte: A autora, 2020.

3.3.7 O jejum intermitente diminuiu os marcadores de apoptose e aumentou os marcadores de proliferação celular nos TABs

A Figura 32 contém a análise de marcadores de apoptose (Caspase 3 e Cidea) e proliferação celular (Pcna e Vegf) em TABs. Caspase 3 (Fig. 34A) e Pcna (Fig. 34B) agem de maneira oposta, e a JI reduziu a Caspase 3 (-40% no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF) enquanto aumenta a Pcna (um efeito benéfico, + 60%

no grupo C-JI comparado ao grupo C; + 84% no grupo HF-JI comparado ao grupo HF). Além disso, o ativador da morte celular (Cidea) ativa a apoptose, enquanto o fator de crescimento endotelial vascular (Vegf) medeia o aumento da permeabilidade vascular (angiogênese, vasculogênese e crescimento celular endotelial), essencial para promover a proliferação celular e o processo de cicatrização. O Cidea é normalmente reduzido em animais obesos (−44% no grupo HF em comparação ao grupo C), mas a JI aumentou o Cidea (+ 44% no grupo HF-JI em comparação com o grupo HF) (Fig. 34C). Vegf foi melhorado por JI (Fig. 34D). A expressão do gene Vegf nos TABs foi maior nos animais C-JI do que no grupo C (+ 200%) e no grupo HF-JI que no grupo HF (+ 230%).

Figura 34. Marcadores pro-apoptóticos e de proliferação celular (RNAm) em TABs



Legenda: (A) Caspase 3; (B) Pcnα; (C) Cidea; (D) Vegf, Indutor de morte celular (Cidea); antígeno nuclear de célula em proliferação (Pcnα); Tecido Adiposo Branco subcutâneo (TABs) e Vegf, fator de crescimento endotelial vascular. Grupos: Controle (C), Hiperlipídica (HF) e jejum intermitente (JI).

Nota: Os dados são expressos como média e DP (n=5/grupo). Significância estatística * P < 0,05, ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

Fonte: A autora, 2020.

3.3.8 ANOVA testando os efeitos da dieta, JI e a interação entre dieta e JI

A Tabela 6 detalha como a dieta e o jejum intermitente afetaram os resultados, bem como a interação desses dois fatores. A Tabela 8 é dividida em três segmentos (biometria e medidas plasmáticas; calorimetria indireta e expressões gênicas ou qPCR). No primeiro segmento, a dieta afetou todos os dados (6/6 ou 100%), a JI afetou cinco dos seis dados (83%) e a dieta e a JI interagiram em quatro dos seis dados (67%). No segundo segmento, a dieta afetou o RQ, mas não o EE, enquanto o JI afetou os dados de EE e RQ (100%). No entanto, dieta e JI interagiram apenas para dados de RQ. O último segmento da Tabela 8 mostrou uma análise de 12 marcadores: a dieta foi essencial para 11 marcadores (92%) e a JI afetou todos os marcadores (100%). No entanto, dieta e JI interagiram em apenas nove marcadores (74%).

Tabela 6. Two-way ANOVA estava testando os efeitos da dieta, jejum intermitente (JI) e a interação entre dieta e JI (ns, não significativo).

Dados	% do teste de variação e significância					
	Efeito dieta		Efeito JI		Dieta vs. JI	
	%	P	%	P	%	P
% TABs	8,4	0,0006	77,2	<0,0001	7,0	0,001
Adiponectina	46,6	<0,0001	8,7	0,01	16,8	0,001
Massa corporal	39,4	<0,0001	44,2	<0,0001	0,8	ns
Consumo de energia	77,9	<0,0001	0,6	ns	0,7	ns
Insulina	62,0	<0,0001	11,1	0,006	9,4	0,01
Leptina	46,2	<0,0001	20,4	<0,0001	21,9	<0,0001
Calorimetria indireta						
EE dia de jejum	0,4	ns	81,9	0,0107	2,3	ns
EE dia alimentado	0,3	ns	73,4	<0,0001	0,3	ns
RQ dia de jejum	47,4	<0,0001	17,7	0,0004	19,9	0,0003
RQ dia alimentado	46,6	<0,0001	38,4	<0,0001	1,4	0,03
qPCR						
Adiponectina	37,3	<0,0001	39,9	<0,0001	9,7	0,003
β 3ar	41,7	<0,0001	40,6	<0,0001	0,3	ns
Caspase	11,6	0,01	29,1	0,0004	36,4	0,0001
Cidea	63,6	<0,0001	18,2	<0,0001	2,8	<0,0001
Il 1	14,9	0,0004	32,1	<0,0001	41,0	<0,0001
Il 6	24,0	<0,0001	29,0	<0,0001	36,1	<0,0001
Leptina	24,4	0,0004	24,2	0,0004	29,9	0,0002
Mcp 1	46,4	<0,0001	19,9	<0,0001	29,2	<0,0001
Pcna	4,3	ns	77,7	<0,0001	0,6	ns
Tnf α	37,7	<0,0001	29,8	<0,0001	30,1	<0,0001
Ucp 1	7,0	<0,0001	76,9	<0,0001	0,8	ns
Vegf	19,4	<0,0001	72,4	<0,0001	3,8	0,002

Legenda: β 3ar, receptor adrenérgico β 3; Cidea, efetora do tipo DFFA indutor de morte celular; EE, gasto de energia; Il, interleucina; Mcp, proteína quimioatrativa de monócitos; Pcna, antígeno nuclear de célula em proliferação; RQ, quociente respiratório; sWAT, tecido adiposo branco subcutâneo; Tnf, fator de necrose tumoral; Ucp, proteína desacopladora; Vegf, fator de crescimento endotelial vascular.

4. DISCUSSÃO

Investigamos os efeitos do JI em um modelo que imita a síndrome metabólica humana quando estressado nutricionalmente (142). Nossos resultados mostraram que o consumo crônico das dietas experimentais resultou, como esperado, em aumento da massa corporal e da adiposidade (apenas nos grupos HF), intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, resistência à insulina, aumento do perfil lipídico, aumento das vias pró-inflamatórias p53 e IL6 e diminuição de PDX1 e pAKT na ilhota pancreática e superexpressão de marcadores inflamatórios e proapoptóticos em TABs.

Houve aumento da lipogênese e diminuição da beta-oxidação no fígado, acompanhado por aumento de citocinas pró-inflamatórias. Ao contrário dos animais que se alimentaram com dieta hiperlipídica, aqueles que consumiram dieta rica em frutose não apresentaram alteração significativa na massa corporal e na adiposidade, indicando que os danos que aconteceram no grupo HF foram independentes do ganho de massa corporal. Nos animais que fizeram JI, a esteatose hepática e os parâmetros bioquímicos e moleculares foram, na sua maioria, melhorados.

Mesmo mantendo a dieta hiperlipídica ao longo do experimento, o JI melhorou o remodelamento e a função das ilhotas pancreáticas, considerando principalmente a regulação da massa de células alfa e beta, além de melhorar a sinalização de insulina (pAKT) e diminuir a apoptose (p53). O JI, no grupo CJI, diminuiu a massa corporal apenas quando comparada ao grupo C, sem mais nenhuma diferença nos demais parâmetros estudados.

Nos animais obesos houve diminuição de adiponectina, Cidea, adipócitos uniloculares e diminuição do RQ em dias nos alimentação e nos dias de jejum. Os animais HF submetidos ao JI (grupo HF-JI) apresentaram melhora ou mesmo normalização desses marcadores, bem como adipócitos multiloculares expressando Ucp1 no TABs.

4.1 Fígado

Além dos efeitos conhecidos provocados pela dieta HF (rica em gordura saturada) na epidemia de obesidade (143), o aumento relatado do consumo mundial de frutose induz efeitos adversos na população (144). É importante ressaltar que os grupos C e HFru consumiram quantidades de calorias similares durante todo o experimento. Quando a frutose é adicionada na ração em grande quantidade (145) ou na água de beber no caso de trabalhos com roedores (146), pode ocorrer aumento de peso corporal pelo simples fato de se aumentar o consumo energético. No entanto, no nosso caso, os animais do grupo HFru não ganharam peso porque este grupo recebeu uma dieta isoenergética em comparação com a dieta controle. A base para o cálculo da dieta rica em frutose foi a AIN-93M (127), em que alteramos apenas o tipo de carboidrato. Na dieta rica em frutose (HFru) adicionamos 474,3g de frutose e removemos, concomitantemente, esta mesma quantidade de amido de milho e, assim, mantivemos o valor energético exatamente igual nas duas dietas experimentais, só variando o tipo de carboidrato entre elas. A composição desta dieta rica em frutose já foi usada com sucesso na indução de parâmetros associados a síndrome metabólica (147, 148).

O JI tem sido sugerido como uma intervenção nutricional para o tratamento da obesidade. Diferentes mecanismos podem explicar os efeitos do JI no metabolismo. O organismo utiliza depósitos de gordura para energia durante o JI, diminuindo o tecido adiposo e suavizando o perfil inflamatório (149). Além disso, a restrição calórica afeta positivamente o metabolismo, ajudando pacientes especialmente pré-diabéticos e resistentes à insulina sem nenhuma abordagem farmacológica (150), possivelmente por causa dos genes de Forkhead Box A (151).

A literatura tem relatos às vezes conflitantes sobre a ação do JI no metabolismo. O JI pode aumentar a resistência celular a doenças usando diferentes vias de sinalização e cetonas circulantes durante o jejum, esgotando o glicogênio dos hepatócitos enquanto o jejum resulta em lipólise e formação de corpos cetônicos (91). No entanto, os padrões de refeição parecem ser alterados apenas transitoriamente durante o JI em ratos machos obesos (152). Na ingestão continuada de HF, o JI pode restaurar o fluxo autofágico nas ilhotas, melhorando a tolerância à glicose, a sobrevivência das células β e a expressão nuclear de um marcador pancreático (153).

Assim, o JI diminuiu a resistência à insulina com a dieta HF, possivelmente atenuando a sinalização hepática de insulina e diminuindo a expressão de glicogênio fosforilase, apesar da diminuição da massa de gordura em ratos machos jovens. (154).

O JI pode prevenir (ou melhorar) o DM2 aumentando a sensibilidade da sinalização do receptor de insulina, de modo que a insulina estimulou mais prontamente a captação de glicose pelas células musculares e hepáticas (155). Nossos resultados mostraram que o JI melhorou a glicemia de jejum, tolerância à glicose e a resistência à insulina, o que vem de acordo com relatos anteriores na literatura (115, 156).

Sabe-se que o a JI regulariza os níveis de tolerância à insulina e à glicose (115), em associação com um aumento da sensibilidade à insulina sinalização do receptor e uma estimulação mais significativa da captação de glicose pelas células musculares e hepáticas pela insulina (157). Em nosso estudo utilizando duas dietas experimentais diferentes, hiperlipídica e dieta rica em frutose, foram observados efeitos benéficos do JI mesmo com a continuidade das respectivas dietas. O JI melhorou o perfil lipídico, com diminuição do TAG e do CT plasmático e da diminuição do TAG hepático e da esteatose hepática, independentemente do tipo da dieta, concordando com um trabalho recente (158). Além de todos esses efeitos benéficos do JI, também observamos diminuição das enzimas hepáticas, ALT e ST, principalmente no grupo HF-JI.

Um elegante estudo demonstrou que o intestino delgado protege o fígado de uma exposição tóxica à frutose. O intestino é capaz de converter a frutose em glicose e outros metabólitos; entretanto, grandes quantidades de frutose podem superar essa capacidade de proteção. Doses baixas de frutose são depuradas em aproximadamente 90% pelo intestino, enquanto altas doses sobrecarregam a absorção e a depuração intestinal da frutose, resultando em exposição do fígado à frutose não metabolizada pelo intestino delgado (4). Depois de consumida, a frutose é rapidamente fosforilada no carbono 1 (mediado por frutose-1-fosfato ou carbono 6 (mediado por uma hexoquinase) para formar frutose-6-fosfato) (159). A fosforilação da frutose no frutose-1-fosfato é capaz de ativar o SREBP1c via PGC1 alfa (160). Além disso, pela conversão em frutose-6-fosfato, ocorre a ativação do ChREBP. Tanto o SREBP1c quanto o ChREBP são fatores de transcrição que ativam enzimas lipogênicas, como acetil-CoA carboxilase e FAS (161). Como consequência, a

concentração de malonil-CoA é aumentada no hepatócito, inibindo a CPT1, PPAR alfa e a beta-oxidação (162, 163).

O PPAR-gama é um fator de transcrição que medeia o desenvolvimento de DHGNA no camundongo, aumentando a transcrição de genes envolvido na síntese de ácidos graxos hepáticos e na captação de ácidos graxos (incluindo FAT/CD36) (164). Tais vias podem explicar o aumento da lipogênese com comprometimento da β oxidação, resultando em esteatose hepática nos animais alimentados com dieta rica em frutose. Da mesma forma, observamos as mesmas alterações nas expressões de genes e proteínas em animais HF e HFr, sugerindo que tanto a dieta hiperlipídica, como a dieta rica em frutose influenciaram as mesmas vias de sinalização no fígado.

Também observamos maior expressão gênica de *Srebp1-c* nos animais HF e HFr. Além disso, ambas as dietas diminuíram a PGC1a no fígado e não foram revertidas pelo JI. Isso é relevante porque o PGC1 aumenta a biogênese mitocondrial e a taxa de respiração e coativa diretamente múltiplos fatores de transcrição, como o PPAR alfa (165). Além disso, a ativação do PPAR alfa não mediou a adaptação metabólica ao jejum, pelo menos na prevenção da esteatose induzida por jejum agudo (166). Nossos resultados demonstraram uma expressão gênica reduzida e imunocoloração de PLIN2 nos grupos JI, independentemente da dieta, o que é relevante porque o PLIN2 está ligado à proteína citoplasmática de revestimento de gotículas lipídicas encontrada em hepatócitos de humanos e roedores (167, 168).

Na sequência de nossos resultados, avaliamos a adiponectina. A adiponectina é um potente agente anti-inflamatório, um hormônio protéico secretado no tecido adiposo que modula vários processos metabólicos, incluindo a regulação da glicose e a oxidação de ácidos graxos e é um fator de risco independente para a síndrome metabólica (109, 169). Os níveis de adiponectina foram baixos em animais com HF e HFr e o aumento da JI adiponectina corroborou com outro relato (170).

Outro resultado importante, foi a leptina. Sabe que a hiperleptinemia está ligada à resistência à insulina e inflamação (171, 172). E, por outro lado, o aumento de marcadores inflamatórios, como a IL6 e TNF-alfa, estão associados à diminuição da adiponectina (173). Observamos que nos animais do grupo HF que fizeram JI, houve uma diminuição significativa da leptina plasmática, provavelmente relacionada à melhora do metabolismo dos carboidratos e à melhora da expressão de marcadores inflamatórios nesse grupo. O efeito da diminuição do dano hepático nos animais que

fizeram JI também pode ser devido à diminuição da proteína NF-kB no fígado e à inibição dos genes da via inflamatória IL-1 e IL-6. Em nosso estudo, só o TNF-alfa, no grupo HF-JI, não teve uma diminuição estatisticamente significativa (embora tenhamos observado uma tendência na redução deste marcador). De qualquer maneira, o JI teve um papel importante na diminuição marcadores de inflamação hepática nos animais dos grupos HF e HFr.

4.2. Pâncreas

Dados da literatura demonstraram que camundongos obesos induzidos por dieta apresentam gradualmente desenvolvimento de hiperinsulinemia e, se os mecanismos compensatórios falharem, podem apresentar hiperglicemia, hipertrofia das ilhotas, diminuição da função das células beta das ilhotas, resistência à insulina e modulação das proteínas da via de insulina como PDX1 (174). Alterações na estrutura pancreática estão associadas à lipotoxicidade causada pelo aumento da lipólise característica do estado de hiperinsulinemia, podendo comprometer as funções pancreáticas normais, levando ao remodelamento pancreático (175). Além disso, os ácidos graxos circulantes comprometem a função das células beta, incluindo alterações na sinalização celular, secreção de insulina, metabolismo das mitocôndrias e composição da membrana (176).

Em nosso estudo, o protocolo de JI diminuiu a massa corporal dos animais em todos os grupos que realizaram essa intervenção, corroborando com os dados já descritos na literatura (156, 177). O tecido adiposo secreta moduladores do metabolismo da glicose, as adipocinas que têm efeitos nos órgãos-alvo, incluindo o cérebro, fígado, coração e nas células beta das ilhotas (178). A remodelação do tecido adiposo na obesidade altera o padrão da secreção de adipocinas, e os baixos níveis de adiponectina na obesidade estão negativamente relacionados à insulina plasmática e positivamente associados ao aumento da resistência insulina (179), o que concorda com nossos achados.

A leptina inibe a liberação de insulina da célula beta das ilhotas no estado alimentado, prevenindo a hiperinsulinemia (180). Por outro lado, o aumento da

concentração de leptina é produzida por uma maior quantidade de massa de gordura que acontece na obesidade, e, com o tempo, promove a perda da capacidade supressora de leptina na secreção de insulina, além do efeito anorexigênico da leptina (181), contribuindo para o desenvolvimento de hiperinsulinemia e resistência à insulina (182). Os camundongos do grupo HF apresentaram valores aumentados de leptina e da insulina sérica, corroborando com os resultados da literatura. Nos animais do grupo HF-JI, houve diminuição dos níveis de insulina e leptina e aumento do nível de adiponectina por causa do JI, melhorando a sensibilidade à insulina e à leptina. Nossos achados estão de acordo com os relatados na literatura (183).

Os hormônios insulina e glucagon são secretados pelas células das ilhotas pancreáticas e ambos participam da regulação da homeostase energética e da sensibilidade à insulina. O resultado foi que a imunocoloração das células beta aumentou no grupo com HF. Nas células alfa, a resistência à insulina se traduz em um aumento da liberação de glucagon e nas células beta, na secreção de insulina (184). É importante destacar que o conteúdo de insulina pancreática foi influenciado pela composição dos alimentos, aumentando em consequência dos ácidos graxos livres da dieta rica em gordura (185). Além disso, o peptídeo intra-ilhota glucagon tipo 1 (GLP-1) pode exercer efeitos insulíntrópicos e glucagonostáticos localmente via ações parácrinas e / ou autócrinas, tanto em condições normais quanto diabéticas (186). A desregulação da secreção de insulina, com um aumento na renovação das células alfa e beta, resulta em mais liberação de insulina na circulação (59).

Os camundongos do grupo HF apresentaram aumento da massa pancreática acompanhada de ilhotas mais proeminentes (maior área transversal). Além disso, observamos aumento da imunomarcagem para glucagon e insulina (e hiperinsulinemia). Provavelmente, o aumento do tamanho das ilhotas pancreáticas associado à maior imunomarcagem de células alfa e beta corresponde a um estado de adaptação à hiperglicemia, que culmina com hiperplasia, hipertrofia e hiperinsulinemia antes de progredir para a exaustão das células beta e, posteriormente, a morte de células beta(187). Nossos dados demonstraram que o JI melhorou o remodelamento e a função das ilhotas pancreáticas nos animais do grupo HF-JI, o que concorda com um trabalho recente da literatura(153).

Uma diminuição na expressão de PDX1 está ligada à resistência à insulina e no desenvolvimento de T2D (188) uma vez que o PDX1 promove um estado de

“senescência prematura” das células beta. No presente estudo, observamos uma diminuição na expressão de PDX1 no grupo HF corroborando com os estados de resistência à insulina, conforme descrito na literatura (62). Anteriormente, identificamos que a dieta restrita à vitamina D materna pode modificar o desenvolvimento do pâncreas da prole, levando à remodelação das ilhotas e à via de sinalização da insulina, onde a diminuição do PDX-1 é provavelmente significativa para as alterações na massa de células beta e secreção de insulina na idade adulta..(189). Entretanto, no nosso estudo, o JI não teve efeito na redução da expressão do PDX1 nos animais do grupo HF-JI.

A obesidade, como observado nos camundongos do grupo HF, parece estar ligada à inibição da via de sinalização pAkt, que contribui para o bloqueio da sinalização de insulina (190). Outro ponto importante é sobre a ativação do supressor de tumor p43 causa apoptose associada a quebras de fita dupla de DNA e causa deficiência de células beta após hiperglicemia (191). Assim, a redução da expressão de p43 por causa da JI é um resultado notável, além mais pelo fato de que a pratica do JI está conectado com a diminuição das concentrações de marcadores pró-inflamatórios (192).

4.3 TABs

Nos animais do grupo HF, observamos elevada concentração de leptina, causada pelo aumento da massa gorda. A hiperinsulinemia compromete a função das ilhotas pancreáticas em longo prazo(193), estimulando a lipogênese e, portanto, a hipertrofia dos adipócitos, inibindo a hiperplasia dos adipócitos e a plasticidade das células brancas / bege (182, 194), a diminuição da termogênese e o acúmulo de gordura corporal, conforme observado no grupo com HF, mas a prática do JI teve um efeito benéfico pois houve significativa melhora desses parâmetros no grupo HF-JI.

O perfil termogênico tem sido alvo de muitos estudos, visto a possibilidade de novas perspectivas no tratamento da obesidade e conseqüentemente de doenças associadas, como o DM2. Uma das estratégias para combater a obesidade e suas

alterações metabólicas é aumentar o gasto energético (EE,) estimulando a termogênese adaptativa(195). O EE consiste em três ações: taxa metabólica basal (necessária para manter o funcionamento normal do organismo), atividade física (realizando atividade extra-trabalho) e termogênese adaptativa (causada por tremores e não tremores) (196, 197). O β 3-ar é o receptor mais relevante para a ativação aguda da termogênese (198), atuando como um gatilho que inicia a termogênese (199) (a termogênese adaptativa libera noradrenalina, que ativa receptores adrenérgicos localizados na membrana plasmática do adipócito marrom). Sem estimulação simpática, não há termogênese adaptativa e, portanto, os adipócitos bege dependem do acoplamento adequado entre a atividade de β 3-ar e Ucp1 (efetor de termogênese) para aumentar a EE, consumindo energia química e produzindo calor em vez de gerar ATP (77). Assim, observamos nos nossos resultados que a termogênese foi ativada pelo JI, o que estimulou o β 3-ar, Cidea e Ucp1 no TABs no grupo HF-JI.

O adipócito bege tem características fenotípicas e padrões de expressão de genes termogênicos semelhantes ao TAM, mas essas células estão em locais TAB (200). A identificação da célula bege no TAB pode ser confirmada pela marcação de genes TAM típicos no TAB, como genes envolvidos na termogênese (Ucp1) ue foram superexpressos em nosso grupo HF-JI. Vale ressaltar que Ucp1 é uma proteína da membrana interna mitocondrial, regulada por sinalização adrenérgica simpática, desencadeando uma dissociação da cadeia respiratória entre a captação de oxigênio e a síntese de ATP, levando à dissipação de calor na forma de calor (201). Além disso, o Cidea é uma proteína / reguladora de adipócitos associada a gotículas de lipídios, essencial para o ajuste da EE, aumentando a termogênese em adipócitos com efeitos positivos na expressão da Ucp1 (202). Nosso grupo HF mostrou a menor expressão de Cidea, mas HF-JI teve uma expressão Cidea como o grupo C. No entanto, as descobertas atuais em camundongos contrastaram com um relatório recente em mulheres, onde os níveis de RNAm de Ucp1 não foram alterados nos TABs (203).JI melhorou a expressão de Vegf nos grupos C-JI e HF-JI. A sinalização de Vegf é necessária para a indução fisiológica do escurecimento dos adipócitos, precedendo a ativação da Ucp1(204). Vegf e Adiponectina aumentaram e a leptina diminuiu em nossos animais com HF-JI, reforçando o relatório anterior que indica uma ação de Vegf em animais obesos mediando a termogênese gerada por JI (205).

CONCLUSÃO

Os achados presentes nos permitem a concluir que o JI tem efeitos benéficos, no controle da massa corporal, mesmo com a continuidade de uma dieta obesogênica e pró-inflamatória em camundongos. Os efeitos benéficos do JI no metabolismo da glicose e inflamação do fígado mostram a potencialidade do JI como fator coadjuvante no tratamento de problemas metabólicos hepáticos e da esteatose.

A adaptação das ilhotas pancreáticas para enfrentar as alterações metabólicas causadas pelo consumo crônico da dieta hiperlipídica modifica a estrutura e a função das ilhotas significativamente. O estudo mostra que o JI diminuiu o tamanho das ilhotas pancreáticas, principalmente considerando a relação da massa das células alfa e beta, além de melhorar a sinalização da insulina e diminuir a apoptose. O JI leva igualmente ao escurecimento dos adipócitos do TABs e, portanto, a melhora da termogênese e o EE, o que, contribui para a perda de peso e reparo do eixo adipoinsular, devido à melhora da resposta à leptina e insulina. A melhora no perfil inflamatório também é evidente nos animais do grupo HF-JI. Pesquisas futuras devem explorar se a prática do JI pode manter os benefícios observados em longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Jeyapal S, Putcha UK, Mullapudi VS, Ghosh S, Sakamuri A, Kona SR, et al. Chronic consumption of fructose in combination with trans fatty acids but not with saturated fatty acids induces nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *European journal of nutrition*. 2017.
2. Choi Y, Abdelmegeed MA, Song BJ. Diet high in fructose promotes liver steatosis and hepatocyte apoptosis in C57BL/6J female mice: Role of disturbed lipid homeostasis and increased oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2017;103:111-21.
3. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition*. 2010;26(11-12):1044-9.
4. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*. 2018;27(2):351-61 e3.
5. Barriere DA, Noll C, Roussy G, Lizotte F, Kessai A, Kirby K, et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Sci Rep*. 2018;8(1):424.
6. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21873-86.
7. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*. 2009;30(1):96-116.
8. Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;57(6):2525-31.
9. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*. 2013;62(10):3307-15.
10. Garvey WT. New tools for weight-loss therapy enable a more robust medical model for obesity treatment: rationale for a complications-centric approach. *Endocr Pract*. 2013;19(5):864-74.
11. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23(5):469-80.
12. Cantiello F, Cicione A, Salonia A, Autorino R, De Nunzio C, Briganti A, et al. Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review. *Int J Urol*. 2015;22(1):22-32.

13. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of hepatology*. 2018;68(2):280-95.
14. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(4):273-82.
15. Faria TS, Pereira-Silva DC, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, CA. M-d-L. Adipocytes: biology, regulation and health impact. In: Weber MJ, Hoffmann JM, editors. Nova Science Publisher.: New York; 2013. p. 188.
16. Catta-Preta M. Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2011.
17. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e39837.
18. Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res*. 2013.
19. Graus-Nunes F, Marinho TS, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential effects of angiotensin receptor blockers on pancreatic islet remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;439:54-64.
20. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*. 2008;94(2):206-18.
21. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol*. 2001;170(2):323-32.
22. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(2):84-9.
23. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1769-77.
24. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:221-39.
25. Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 2):S57-63.
26. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):339-50.

27. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(5):525-40.
28. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):386-95.
29. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2008;75(10):721-8.
30. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM.* 2010;103(2):71-83.
31. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):829-38.
32. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
33. Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol.* 2011;55(1):227-8.
34. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;36(1):4-12.
35. Kopelman P. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions. *Foresight Report: the obesity challenge ahead. Proc Nutr Soc.* 2010;69(1):80-5.
36. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5):1836-46.
37. Su Q, Kumar V, Sud N, Mahato RI. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis. *Advanced drug delivery reviews.* 2018;129:54-63.
38. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2016;31(5):936-44.
39. Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular Pathogenesis of NASH. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(9).
40. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of hepatology.* 2010;53(2):372-84.

41. Ayonrinde OT, Olynyk JK, Marsh JA, Beilin LJ, Mori TA, Oddy WH, et al. Childhood adiposity trajectories and risk of nonalcoholic fatty liver disease in adolescents. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(1):163-71.
42. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World journal of gastroenterology*. 2018;24(27):2974-83.
43. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1038-48.
44. Rao MS, Reddy JK. PPARAlpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*. 2004;40(4):783-6.
45. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;38(4):999-1007.
46. Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med*. 2008;29(1-2):22-35.
47. Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B, et al. Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem*. 2012;68(3):335-44.
48. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(1):176-83.
49. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(24):13656-61.
50. Zhang X, Liu J, Su W, Wu J, Wang C, Kong X, et al. Liver X receptor activation increases hepatic fatty acid desaturation by the induction of SCD1 expression through an LXRAalpha-SREBP1c-dependent mechanism. *J Diabetes*. 2014;6(3):212-20.
51. Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;48(3):97-113.
52. Eliete Dalla Corte Frantz, Souza-Mello Vd, Mandarim-de-Lacerda* aCA. PANCREAS: ANATOMY, DISEASES AND HEALTH IMPLICATIONS. 2015.
53. Mandarim-de-Lacerda CA. L'îlot pancréatique : ce que nous savons 150 ans après Langerhans. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 2019;203(8):670-82.

54. Valtat B, Dupuis C, Zenaty D, Singh-Estivalet A, Tronche F, Breant B, et al. Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice. *Diabetologia*. 2011;54(2):350-9.
55. Ahren B, Pacini G. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7(1):2-8.
56. Cohen G, Shamni O, Avrahami Y, Cohen O, Broner EC, Filippov-Levy N, et al. Beta cell response to nutrient overload involves phospholipid remodelling and lipid peroxidation. *Diabetologia*. 2015.
57. Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, Gabriel R, Mitrakou A, Flyvbjerg A, et al. Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia*. 2007;50(11):2342-7.
58. Ahren B. Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetes*. 2009;58(3):726-31.
59. Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E192-8.
60. Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol*. 2004;25(5):1495-500.
61. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
62. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, 3rd, Wright CV, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest*. 2002;110(12):1839-47.
63. Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, et al. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4398-406.
64. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*. 2012;26(7):1203-12.
65. Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes*. 1996;45(11):1478-88.
66. Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab*. 2008;34 Suppl 2:S73-7.

67. Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015;58(2):221-32.
68. Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem*. 2014;289(18):12189-94.
69. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1697(1-2):3-16.
70. Kitamura T, Ido Kitamura Y. Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells. *Endocr J*. 2007;54(4):507-15.
71. Brito FNBeMdN. TECIDO ADIPOSO MARROM E OBESIDADE EM HUMANOS. *Revista saúde e pesquisa*. 2012;5:121-35.
72. Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):33-42.
73. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;205(2):194-208.
74. Divoux A, Clement K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*. 2011;12(5):e494-503.
75. Pradol WLd. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. 2009;15.
76. Castro E, Silva TEO, Festuccia WT. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(2).
77. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013;62(6):1774-82.
78. Loncar D, Afzelius BA, Cannon B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*. 1988;101(2-3):199-209.
79. Cousin B, Cinti S, Morrioni M, Raimbault S, Ricquier D, Penicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of cell science*. 1992;103 (Pt 4):931-42.
80. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
81. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Bioscience reports*. 2013;33(5).

82. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Brighenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;402:86-94.
83. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science.* 2010;328(5982):1113-4.
84. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(1):24-36.
85. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1837(7):1075-82.
86. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-8.
87. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 2013;27(3):234-50.
88. Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, et al. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(24):9635-40.
89. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1518-25.
90. 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.
91. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 2014;19(2):181-92.
92. Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr.* 2017.
93. Johnstone A. Fasting for weight loss: an effective strategy or latest dieting trend? *Int J Obes (Lond).* 2015;39(5):727-33.
94. Cherif A, Roelands B, Meeusen R, Chamari K. Effects of Intermittent Fasting, Caloric Restriction, and Ramadan Intermittent Fasting on Cognitive Performance at Rest and During Exercise in Adults. *Sports Med.* 2016;46(1):35-47.
95. Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *The Journal of nutrition.* 2003;133(6):1921-9.

96. Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3):361-9.
97. Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J.* 2006;20(6):631-7.
98. Mzoughi K, Zairi I, Jabeur M, Kraiem S. The effects of fasting on heart rate variability in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens.* 2018:1-4.
99. Michalsen A, Li C. Fasting therapy for treating and preventing disease - current state of evidence. *Forsch Komplementmed.* 2013;20(6):444-53.
100. Chung H, Chou W, Sears DD, Patterson RE, Webster NJ, Ellies LG. Time-restricted feeding improves insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of postmenopausal obesity. *Metabolism.* 2016;65(12):1743-54.
101. Antoni R, Johnston KL, Collins AL, Robertson MD. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. *Proc Nutr Soc.* 2017:1-8.
102. Bertholdt L, Gudiksen A, Stankiewicz T, Villesen I, Tybirk J, van Hall G, et al. Impact of training state on fasting-induced regulation of adipose tissue metabolism in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2017:jap 00664 2017.
103. Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF, Laher I. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Curr Diab Rep.* 2017;17(12):123.
104. Martinez-Lopez N, Tarabra E, Toledo M, Garcia-Macia M, Sahu S, Coletto L, et al. System-wide Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy. *Cell Metab.* 2017;26(6):856-71 e5.
105. Karabiyik C, Lee MJ, Rubinsztein DC. Autophagy impairment in Parkinson's disease. *Essays Biochem.* 2017;61(6):711-20.
106. Mowers EE, Sharifi MN, MacLeod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J.* 2018.
107. Nabavi SF, Sureda A, Dehpour AR, Shirooie S, Silva AS, Devi KP, et al. Regulation of autophagy by polyphenols: Paving the road for treatment of neurodegeneration. *Biotechnol Adv.* 2017.
108. Moro T, Tinsley G, Bianco A, Marcolin G, Pacelli QF, Battaglia G, et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *J Transl Med.* 2016;14(1):290.
109. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(3):293-300.

110. Coppola A, Marfella R, Coppola L, Tagliamonte E, Fontana D, Liguori E, et al. Effect of weight loss on coronary circulation and adiponectin levels in obese women. *Int J Cardiol.* 2009;134(3):414-6.
111. Gulcelik NE, Halil M, Ariogul S, Usman A. Adipocytokines and aging: adiponectin and leptin. *Minerva Endocrinol.* 2013;38(2):203-10.
112. Hartman AL, Rubenstein JE, Kossoff EH. Intermittent fasting: a "new" historical strategy for controlling seizures? *Epilepsy Res.* 2013;104(3):275-9.
113. Singh R, Lakhanpal D, Kumar S, Sharma S, Kataria H, Kaur M, et al. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *Age (Dordr).* 2012;34(4):917-33.
114. Yang W, Cao M, Mao X, Wei X, Li X, Chen G, et al. Alternate-day fasting protects the livers of mice against high-fat diet-induced inflammation associated with the suppression of Toll-like receptor 4/nuclear factor kappaB signaling. *Nutr Res.* 2016;36(6):586-93.
115. Baumeier C, Kaiser D, Heeren J, Scheja L, John C, Weise C, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(5):566-76.
116. Corley BT, Carroll RW, Hall RM, Weatherall M, Parry-Strong A, Krebs JD. Intermittent fasting in Type 2 diabetes mellitus and the risk of hypoglycaemia: a randomized controlled trial. *Diabet Med.* 2018.
117. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab.* 2016;23(6):1048-59.
118. Harris L, Hamilton S, Azevedo LB, Olajide J, De Brun C, Waller G, et al. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review and meta-analysis. *JBI Database System Rev Implement Rep.* 2018;16(2):507-47.
119. Shin BK, Kang S, Kim DS, Park S. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(4):334-43.
120. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017;39:46-58.
121. Boutant M, Kulkarni SS, Joffraud M, Raymond F, Metairon S, Descombes P, et al. SIRT1 Gain of Function Does Not Mimic or Enhance the Adaptations to Intermittent Fasting. *Cell reports.* 2016;14(9):2068-75.
122. Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilu MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of

adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition*. 2012;28(2):212-9.

123. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism*. 2005;2(1):5.

124. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018;128(2):545-55.

125. Ouelaa W, Jegatheesan P, M'Bouyou-Boungou J, Vicente C, Nakib S, Nubret E, et al. Citrulline decreases hepatic endotoxin-induced injury in fructose-induced non-alcoholic liver disease: an ex vivo study in the isolated perfused rat liver. *The British journal of nutrition*. 2017:1-8.

126. Lanaspá MA, Ishimoto T, Li N, Cicerchi C, Orlicky DJ, Ruzycki P, et al. Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome. *Nature communications*. 2013;4:2434.

127. 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.

128. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.

129. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch*. 2011;459(5):477-85.

130. Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). *Int J Morphol*. 2017;35(4):1482-94.

131. Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Woods JA. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine*. 2009;46(3):339-45.

132. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2003;75(4):469-86.

133. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc*. 1977;111:219-23.

134. Mandarim-de-Lacerda CA, Santos CF, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol*. 2010;611:211-25.

135. Marinho TdS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. *Int J Morphol*. 2019;37(4):1331-4.

136. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967;16(1):35-9.
137. Borges C. Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2015.
138. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alagband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet*. 1995;346(8967):120-1.
139. Hally AD. A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. *Journal of cell science*. 1964;105(S3):503-17.
140. Cui X, Yu S, Tamhane A, Causey ZL, Steg A, Danila MI, et al. Simple regression for correcting DeltaCt bias in RT-qPCR low-density array data normalization. *BMC Genomics*. 2015;16:82.
141. Dunnett CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. *J Amer Statist Ass*. 1980;75(372):796-800.
142. 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.
143. Johnson AR, Wilkerson MD, Sampey BP, Troester MA, Hayes DN, Makowski L. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;473(2):545-50.
144. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lucan SC. Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(3):372-81.
145. Rippe JM, Sievenpiper JL, Le KA, White JS, Clemens R, Angelopoulos TJ. What is the appropriate upper limit for added sugars consumption? *Nutr Rev*. 2017;75(1):18-36.
146. Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology*. 2007;45(3):778-88.
147. Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2017;123(4):699-709.
148. Guimaraes J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2019;140:64-71.

149. Harvie M, Howell A. Potential Benefits and Harms of Intermittent Energy Restriction and Intermittent Fasting Amongst Obese, Overweight and Normal Weight Subjects-A Narrative Review of Human and Animal Evidence. *Behavioral sciences*. 2017;7(1).
150. Aksungar FB, Sarikaya M, Coskun A, Serteser M, Unsal I. Comparison of Intermittent Fasting Versus Caloric Restriction in Obese Subjects: A Two Year Follow-Up. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(6):681-5.
151. Zhang L, Rubins NE, Ahima RS, Greenbaum LE, Kaestner KH. Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *Cell Metab*. 2005;2(2):141-8.
152. Gotthardt JD, Bello NT. Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding. *Physiol Behav*. 2017;174:49-56.
153. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, Murphy J, Ma X, Rohatgi N, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*. 2017;13(11):1952-68.
154. Park S, Yoo KM, Hyun JS, Kang S. Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets. *J Nutr Biochem*. 2017;40:14-22.
155. Sequea DA, Sharma N, Arias EB, Cartee GD. Calorie restriction enhances insulin-stimulated glucose uptake and Akt phosphorylation in both fast-twitch and slow-twitch skeletal muscle of 24-month-old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(12):1279-85.
156. Joslin PMN, Bell RK, Swoap SJ. Obese mice on a high-fat alternate-day fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017;101(5):1036-45.
157. Sharma N, Arias EB, Sequea DA, Cartee GD. Preventing the calorie restriction-induced increase in insulin-stimulated Akt2 phosphorylation eliminates calorie restriction's effect on glucose uptake in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(11):1735-40.
158. Antoni R, Johnston KL, Collins AL, Robertson MD. Intermittent v. continuous energy restriction: differential effects on postprandial glucose and lipid metabolism following matched weight loss in overweight/obese participants. *Br J Nutr*. 2018;119(5):507-16.
159. Douard V, Ferraris RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J Physiol*. 2013;591(Pt 2):401-14.
160. Caton PW, Nayuni NK, Khan NQ, Wood EG, Corder R. Fructose induces gluconeogenesis and lipogenesis through a SIRT1-dependent mechanism. *J Endocrinol*. 2011;208(3):273-83.

161. Gaccioli F, Lager S, Powell TL, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis*. 2013;4(2):101-15.
162. Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, Millatt L, Staels B, Girard J, et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest*. 2008;118(3):956-64.
163. Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):285-9.
164. Kim KH, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ, Cheong J. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;355(4):883-8.
165. Canto C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):98-105.
166. Li G, Brocker CN, Yan T, Xie C, Krausz KW, Xiang R, et al. Metabolic adaptation to intermittent fasting is independent of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Metab*. 2018;7:80-9.
167. Libby AE, Bales E, Orlicky DJ, McManaman JL. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(46):24231-46.
168. Liu X, Xue R, Ji L, Zhang X, Wu J, Gu J, et al. Activation of farnesoid X receptor (FXR) protects against fructose-induced liver steatosis via inflammatory inhibition and ADRP reduction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450(1):117-23.
169. Wan R, Ahmet I, Brown M, Cheng A, Kamimura N, Talan M, et al. Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. *J Nutr Biochem*. 2010;21(5):413-7.
170. Varady KA, Allister CA, Roohk DJ, Hellerstein MK. Improvements in body fat distribution and circulating adiponectin by alternate-day fasting versus calorie restriction. *J Nutr Biochem*. 2010;21(3):188-95.
171. Jackson MB, Ahima RS. Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones. *Clinical science*. 2006;110(2):143-52.
172. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S362-7.
173. Yang Q, Fu C, Xiao J, Ye Z. Uric acid upregulates the adiponectin receptor 1 pathway in renal proximal tubule epithelial cells. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):3545-54.

174. Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119(6):239-50.
175. Szczepaniak LS, Victor RG, Mathur R, Nelson MD, Szczepaniak EW, Tyer N, et al. Pancreatic steatosis and its relationship to beta-cell dysfunction in humans: racial and ethnic variations. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2377-83.
176. Janikiewicz J, Pawelec P, Kucharczyk P, Dobrzyn A. The Good, the Bad, and the Ugly - role of the pancreas, endothelium, and adipose tissue axis in the management of pancreatic beta-cell failure in obesity-related type 2 diabetes. *Postepy Biochem*. 2018;64(2):166-74.
177. 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.
178. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):461-70.
179. Borges CC, Salles AF, Brighenti I, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adverse effects of vitamin D deficiency on the Pi3k/Akt pathway and pancreatic islet morphology in diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(2):346-57.
180. Zhang J, Jin J, Liu J, He Y, Zhang P, Ye W, et al. A study of the correlation of insulin resistance and leptin with inflammatory factors and vascular endothelial injury in T2DM patients with CHD. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(1):265-9.
181. Vianna AB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(3):626-33.
182. Gray SL, Donald C, Jetha A, Covey SD, Kieffer TJ. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling. *Endocrinology*. 2010;151(9):4178-86.
183. Chowdhury EA, Richardson JD, Gonzalez JT, Tsintzas K, Thompson D, Betts JA. Six Weeks of Morning Fasting Causes Little Adaptation of Metabolic or Appetite Responses to Feeding in Adults with Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2019;27(5):813-21.
184. Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, Gabriel R, Mitrakou A, Flyvbjerg A, et al. Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia*. 2007;50(11):2342-7.

185. Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(1):17-25.
186. Fava GE, Dong EW, Wu H. Intra-islet glucagon-like peptide 1. *J Diabetes Complications*. 2016;30(8):1651-8.
187. Mandarim-de-Lacerda CA. L'îlot pancréatique : ce que nous savons 150 ans après Langerhans. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 2019.
188. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Molecular endocrinology*. 2012;26(7):1203-12.
189. Maia-Ceciliano TC, Vianna AR, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D-restricted diet has consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice. *Endocrine*. 2016;54(1):60-9.
190. McCurdy CE, Klemm DJ. Adipose tissue insulin sensitivity and macrophage recruitment: Does PI3K pick the pathway? *Adipocyte*. 2013;2(3):135-42.
191. Tornovsky-Babeay S, Dadon D, Ziv O, Tzipilevich E, Kadosh T, Schyr-Ben Haroush R, et al. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in beta cells. *Cell Metab*. 2014;19(1):109-21.
192. Faris MA, Kacimi S, Al-Kurd RA, Fararjeh MA, Bustanji YK, Mohammad MK, et al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr Res*. 2012;32(12):947-55.
193. Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet (of Langerhans) revisited. *Histol Histopathol*. 2019;34(9):985-93.
194. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):193-200.
195. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature*. 2014;510(7503):76-83.
196. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404(6778):652-60.
197. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(1).
198. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res*. 1993;34(7):1057-91.

199. Jimenez M, Barbatelli G, Allevi R, Cinti S, Seydoux J, Giacobino JP, et al. Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem.* 2003;270(4):699-705.
200. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013;5(5):1196-203.
201. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):372-6.
202. Jash S, Banerjee S, Lee MJ, Farmer SR, Puri V. CIDEA Transcriptionally Regulates UCP1 for Britening and Thermogenesis in Human Fat Cells. *iScience.* 2019;20:73-89.
203. Liu B, Page AJ, Hutchison AT, Wittert GA, Heilbronn LK. Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. *Nutrition.* 2019;66:38-43.
204. During MJ, Liu X, Huang W, Magee D, Slater A, McMurphy T, et al. Adipose VEGF Links the White-to-Brown Fat Switch With Environmental, Genetic, and Pharmacological Stimuli in Male Mice. *Endocrinology.* 2015;156(6):2059-73.
205. Kim KH, Kim YH, Son JE, Lee JH, Kim S, Choe MS, et al. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Res.* 2017;27(11):1309-26.

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa



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

ibrag
Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

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. Mandarim 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 – Comprovação do 1º artigo científico aceito



Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet

Thatiany de Souza Marinho, Celina Carvalho Borges,
Marcia Barbosa Aguilã, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda*

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2019
Received in revised form 21 November 2019
Accepted 21 November 2019
Available online xxx

Keywords:

High-fat diet
Beta-cell mass
Alpha-cell mass
Obesity
Stereology

ABSTRACT

Aims: There is a pancreatic islet adaptation in obese subjects, resulting in insulin resistance and diabetes type 2. We studied the effect of intermittent fasting (IntF) on the islet structure of diet-induced obese (DIO) mice.

Methods: Three-month-old male mice fed a control diet (C, 10% Kcal fat) or a high-fat diet (HF, 50% Kcal fat) for two months ($n = 20$ each group). Then, half of each group did IntF (alternating 24 h fed/24 h fast), continuing in their diets four more weeks: C, C-IntF, HF, HF-IntF. Islets were prepared to microscopy or isolated for molecular analysis.

Results: HF group (vs. C group) showed hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, hypoadiponectinemia, glucose intolerance, insulin resistance, and islet hypertrophy with a consequent higher both the alpha-cell and beta-cell masses. In the HF group (vs. C), there was low PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1), and IntF did not alter PDX1. There was a low p-AKT/AKT ratio (protein kinase B), and IntF enhanced it. Also, tumor suppressor p53 was increased, and IntF decreased it. IL (interleukin)-6 was higher in the HF group (vs. C), and HF-IntF (vs. C-IntF). Any significant change in NF κ B was seen among groups.

Conclusions: IntF improves pancreatic islet structure in DIO mice, even with continued HF diet intake, primarily considering on the alpha- and beta-cell masses regulation, then improving insulin signaling and decreasing cell apoptosis. Future research should explore whether the shortening of the IntF extend could maintain the benefits observed in the long term.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sustained hyperglycemia is a significant insult to pancreatic islets, promoting an adaptation of islet cells (hyperplasia, hypertrophy, recruitment of progenitor cells).¹ The persistence of hyperglycemia leads to beta-cell depletion (hypoplasia, hypotrophy, and dedifferentiation), and insulin resistance.² Insult continuity progresses to diabetes mellitus type 2 (T2D) with decreased functional beta-cell mass, the hallmark of T2D,³ and beta-cell death.^{4,5} Therefore, efforts should be made for effectively increasing, enhancing, or restoring beta-cell function.^{6,7}

Abbreviations: Akt, protein kinase B; AUC, area under the curve; BM, body mass; C, control; DIO, diet-induced obesity; HF, high fat; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; IIT, intraperitoneal insulin tolerance test; IL6, interleukin-6; IntF, intermittent fasting; M, mass; NF κ B, nuclear factor kappa B; OGTT, oral glucose tolerance test; p53, tumor suppressor p53; pAkt, phospho-Akt; PDX1, pancreatic duodenal homeobox 1; Pp, partial points counted on the structure; Pt, total points of the test-system; Q_v, numerical density per area; T2D, diabetes mellitus type 2; V_v, volume density.

* Corresponding author at: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Av 28 de Setembro 87 fds, 20551-030 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: mandarin@uerj.br (C.A. Mandarin-de-Lacerda).

Intermittent fasting (IntF) is usually performed by religious motivations,⁸ besides being a dietary intervention effective in reducing body mass (BM). IntF might be categorized in alternate-day fasting, full-day fasting, and time-restricted feeding as one meal-per-day.⁹ The IntF might maintain the structure and function of pancreatic islets,¹⁰⁻¹² and, in rodents improves insulin sensitivity and adiposity,¹³ hyperglycemia, and T2D^{14,15} benefits that may be translated to humans.¹⁶

The study was undertaken to assess the high impact of the long-term intake of the high-fat diet and consequent obesity installation on the pancreatic islet alpha- and beta-cell arrangement and islet molecular markers when the animal is submitted to IntF.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

The study followed the guidelines for experimentation with animals (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised in 1996), and the protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the University of the State of Rio de Janeiro (Protocol No. CEUA/040/2016). The animals were maintained under controlled temperature

<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107497>
1056-8727/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: T.S. Marinho, C.C. Borges, M.B. Aguilã, et al., Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet, Journal of Diabetes and Its Complications, <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107497>

ANEXO C – Comprovação do 2º artigo científico aceito

Int. J. Morphol.,
37(4):1331-1334, 2019.

Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass

Estereología de los Islotes Pancreáticos: Estimación de la Masa de Células Beta

Thatiany de Souza Marinho; Marcia Barbosa Aguilá & Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

MARINHO, T. S.; AGUILA, M. B. & MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Pancreatic islet stereology: Estimation of beta cells mass. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1331-1334, 2019.

SUMMARY: Obesity and its comorbidities are becoming epidemic in the Western world. Beta cell mass estimation is an important indicator to track the progression of insulin resistance/type 2 diabetes, particularly in experimental studies, where it can be performed with stereological tools in an unbiased way. In this work, we present a simple protocol that can contribute to doing the practice of estimating the mass of beta cells more frequent and reproducible. As with any quantitative study, the necessary precautions regarding sampling and randomness must be respected.

KEY WORDS: Pancreatic islet; Beta cell; Stereology; Obesity; Cell biology.

INTRODUCTION

The obesity epidemic in the world is associated with diabetes mellitus, coronary heart disease, certain forms of cancer, and sleep-breathing disorders, in which insulin resistance/type 2 diabetes (T2D) is relevant (Kopelman, 2000), as demonstrated in the Hispanic population in the United States (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2019). Also, the exposure of mothers' diabetic pregnancies or gestational impaired glucose tolerance leads to inter-generational amplification of T2D risk mediated through prenatal exposures (Dyck *et al.*, 2019). The maternal vitamin D-restricted diet modifies the development of the pancreas of the offspring, leading to islet remodeling and altered insulin-signaling pathway. The decrease of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) is probably significant to the changes in the beta-cell mass and insulin secretion in adulthood (Maia-Ceciliano *et al.*, 2016). Empowering community diabetes mellitus screening programs targeting the environment, social gradients, and cultural norms while engaging in preventive interventions are recommended (Cuschieri & Grech, 2019).

Pancreatic beta cells are responsible for maintaining the body's glucose levels within a very narrow range; their population is dynamic, with compensatory changes to maintain euglycemia. Throughout the lifetime of a mammal, low levels of beta-cell replication and apoptosis are balanced and result in a slowly increasing mass of beta cells (Bonner-

Weir, 2000). One way to evaluate the evolution of insulin resistance / T2D, as well as the efficiency of therapeutic procedures, is by estimating the beta cell mass in the pancreatic islet (Frantz *et al.*, 2011; Mandarin-de-Lacerda, 2019). The progressive loss of pancreatic beta-cell mass that occurs in T2D is a primary factor driving efforts to identify strategies for effectively increasing, enhancing or restoring beta-cell mass as constant stimulation of beta-cell proliferation has remained a challenge (Aamodt & Powers, 2017). Islet neuropeptide Y receptors are promising targets for the preservation of beta-cell mass and targeting these receptors could help to maintain beta-cell mass in both type 1 and type 2 diabetes, and may also be useful for improving islet transplantation outcomes (Franklin *et al.*, 2018).

A relevant tool in experimental studies is the use of quantitative methods in morphology (morphometry and stereology) (Mandarin-de-Lacerda & Del-Sol, 2017), and islet and beta cell mass have been stereologically studied (Bock *et al.*, 2003a,b).

However, for this method to be more acceptable to researchers of metabolic disorders of glucose homeostasis and pancreatic islet, the present manuscript attempts to standardize a quick and easy method of execution of estimating the mass of beta cells using design-based stereology.

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases. Biomedical Centre, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

ANEXO D – Comprovação do 3º artigo científico aceito

Nutrition 65 (2019) 103–112



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjournal.com

Basic nutritional investigation

Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet



Thatiany de Souza Marinho Ph.D., Fernanda Ornellas R.D., Ph.D., Sandra Barbosa-da-Silva R.D., Ph.D., Carlos A. Mandarim-de-Lacerda M.D., Ph.D., Marcia Barbosa Aguilã R.D., Ph.D.*

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 12 June 2018

Received in revised form 29 January 2019

Accepted 23 February 2019

Keywords:

Nutritional intervention

Lipogenesis

 β -oxidation

Inflammation

Steatosis

ABSTRACT

Objective: Intermittent fasting (IF) is a nutritional intervention with significant metabolic effects on the liver that are not yet fully understood. The aim of this study was to investigate the effects of IF on body mass, lipid profile, glucose metabolism, liver lipogenesis, β -oxidation, and inflammation.

Methods: We used cellular and molecular techniques to investigate the effects of IF on 3-mo-old male C57 BL/6 mice that were fed control (10% kcal fat), high-fat (HF; 50% kcal fat), or high-fructose (HFr; 50% kcal fructose) diets for 8 wk. Half of the animals were submitted to IF (1 d fed, 1 d fast) for an additional 4 wk.

Results: Although food intake on the fed day did not differ between the groups, mice in the HF and HFr groups showed diminished body mass, total cholesterol, and triacylglycerol levels. Also, plasma adiponectin increased in the HFr group and leptin decreased in the HF mice. Oral glucose tolerance test and insulin were ameliorated by IF, regardless of the diet consumed (HF or HFr), and decreased hepatic lipogenesis and increased β -oxidation markers, resulting in a reduction of the hepatic steatosis and inflammation.

Conclusions: There were beneficial effects of IF even with the continuity of the obesogenic diet and proinflammatory diet in mice. It is recommended that based on the beneficial effects of IF on glucose and liver metabolism and inflammation that IF be a coadjutant factor in the treatment of hepatic metabolic issues and steatosis.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Intermittent fasting (IF) is characterized by periods of voluntary abstinence from food and drink, associated or not to religious and other practices [1]. IF improved insulin sensitivity, with effects on blood glucose, adiposity, and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in rodents [2] and humans [3], making it an option to alleviate the deleterious effects of unhealthy diets. Fasting organisms enter into

alternative metabolic stages, which rely less on glucose and more on ketone body-like carbon sources [4], reducing body mass (BM) [5] and enhancing cognitive functions [6]. The mechanisms involved with IF are related to adaptive cellular stress response signaling pathways, improving mitochondrial health, DNA repair, autophagy, promotion of stem cell-based regeneration, and long-lasting metabolic effects [7].

The high-fat diet (Western or “cafeteria” diet) is a primary factor associated with obesity and its comorbidities, even in rodents [8,9]. The consumption of a high-fat diet (HFD) causes adipose tissue expansion, and triacylglycerol (TG) stored in this tissue can be hydrolyzed to release glycerol and free fatty acids (FFA). The FFA generated by lipolysis are conducted to the liver and are used to synthesize TG, which accumulate in the liver, favoring the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [10,11].

Also, the fructose component of sugar may be particularly harmful because of its unique metabolic properties, and fructose-rich diets can rapidly produce all the key features of the metabolic syndrome [12], without a significant increase in BM [13]. Excess fructose leads to an increase in the production of acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA), which is not metabolized by the tricarboxylic cycle,

MBA was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number 305865/2017-0, and Fundação Carlos Chagas Filho do Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) grant number E-26/201.335/2014. CAML was funded by CNPq grant number 302.920/2016-1 and FAPERJ grant number E-26/201.186/2014. TSM received a bursary from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. These agencies had no interference in the accomplishment and submission of the study. TSM and FO generated, collected, assembled, analyzed, and interpreted the data and drafted the manuscript. SRS analyzed and interpreted the data. CML and MBA conceived of and designed the study, analyzed and interpreted the data, revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript. The authors have no conflicts of interest to declare.

* Corresponding author: Tel: +55 21 2868 8316; Fax: +55 21 2868 8033.

E-mail address: mbaguila@uerj.br (M.B. Aguilã).

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.02.020>

0899-9007/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO E – Comprovação de submissão do 4º artigo científico.

EJON-D-19-01188 - Submission Notification to co-author    Caixa de entrada x



Editorial Office (EJON) <em@editorialmanage... 21 de dez. de 2019 17:26   
 para eu ▾

Re: "Intermittent fasting, browning of subcutaneous adipocytes, and enhanced thermogenesis in the diet-induced obese mouse"

Full author list: Thatiany Souza Marinho, Ph.D.; Fernanda Omellas, R.D., Ph.D.; Marcia Barbosa Aguila, R.D., Ph.D.; Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, M.D., Ph.D.

Dear Dr Marinho,

We have received the submission entitled: "Intermittent fasting, browning of subcutaneous adipocytes, and enhanced thermogenesis in the diet-induced obese mouse" for possible publication in European Journal of Nutrition, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Professor Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
 European Journal of Nutrition

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ejon/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

ANEXO F –Artigo científico aceito com colaboração

Molecular and Cellular Endocrinology 439 (2017) 54–64



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Differential effects of angiotensin receptor blockers on pancreatic islet remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice



Francielle Graus-Nunes, Thatiany de Souza Marinho, Sandra Barbosa-da-Silva, Marcia Barbosa Aguila, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello^{a,*}

^aLaboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Centre, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 April 2016
Received in revised form 21 October 2016
Accepted 21 October 2016
Available online 22 October 2016

Keywords:
Pancreatic islet
Telmisartan
Losartan
Glucose homeostasis
High-fat diet
Apoptosis

ABSTRACT

Obesity leads to adverse endocrine pancreas remodelling, reduced islet lifespan and early type 2 diabetes onset. AT1R blockade shows beneficial pleiotropic effects. This study sought to compare the effects of losartan and telmisartan on pancreatic islets remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. High-fat diet yielded overweight, insulin resistance, islet apoptosis and hypertrophy. Suitable insulin levels and preserved endocrine pancreas structure were correlated to adequate AKT-FOXO1 pathway functioning in losartan-treated animals. Conversely, telmisartan yielded enhanced PDX1 and GLP-1 islet expression along with greater GLP-1 levels, with the consequent better islet glucose sensing and uptake. Greater islet vascularisation coupled with reduced apoptosis and macrophage infiltration seems to underlie the beneficial findings in both treatments. In conclusion, these results provide compelling evidence that two antihypertensive drugs (telmisartan and losartan) ameliorate pancreatic islet structure, glucose handling, and vascularisation in obese mice. Although only telmisartan countered overweight, both drugs yielded reduced apoptosis and islet preservation, with translational potential.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity has reached epidemic proportions and frequently stems from increased fat intake and physical inactivity (Seidell and Halberstadt, 2015). Adipose tissue capacity to buffer excessive exogenous or endogenous free fatty acids (FFA) is limited and the resulting increased leptin release from enlarged adipocytes triggers hyperinsulinemia, which is related to adverse pancreatic islet remodelling (Gustafson and Smith, 2015).

The pancreas is one of the most affected organs by lipotoxicity (van Raalte et al., 2010). It has been previously reported that high-fat feeding leads to enlarged pancreatic islets as an attempt to keep normal values of blood glucose at the expense of hyperinsulinemia (Janikiewicz et al., 2015; Souza-Mello et al., 2010). As lipotoxicity becomes chronic, glucose intolerance takes place and, at this stage, pancreatic islets present with altered metabolic pathways, besides a structural disarrangement (Del Guerra et al., 2005; Souza-Mello

et al., 2011). These alterations threaten the survival of pancreatic islets, which tend to become dysfunctional due to a highly demanding for insulin and glucagon synthesis (Cerf, 2007).

Insulin resistance precedes type 2 diabetes onset in at least ten years. During this period, pancreatic islet undergoes a series of structural, functional and metabolic remodelling. Pancreatic duodenal homeobox 1 (PDX1) islet expression is essential to induce adequate expression of glucokinase (GK) and glucose transporter 2 (GLUT2), which mediate glucose sensing and uptake by the islet and ensures beta cell function and islet preservation (Cerf, 2007; Stitzel et al., 2015).

The use of angiotensin receptor blockers (ARBs) has unravelled pleiotropic effects on pancreatic structure and glucose homeostasis (Souza-Mello et al., 2010; Zhao et al., 2016). The inhibition of angiotensin type 1 receptor (AT1R) in endocrine pancreas favours angiotensin type 2 receptor (AT2R) actions, which seems to cause islet preservation (Shao et al., 2013). Besides a better coupling between glucose sensing and uptake by beta cells, antiapoptotic effects and greater islet vascularisation play a major role in islet preservation (Bonora, 2008). In this context, unlike losartan (a pure ARB), telmisartan is also a partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonist, which is suggestive of additive beneficial effects on islet morphology and physiology (Bhatia and

* Corresponding author. Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomedico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: souzamello.uerj@gmail.com (V. Souza-Mello).

¹ Website: www.lmmc.uerj.br.