



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



RENAN FUDOLI LINS VIEIRA

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

Limeira
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



RENAN FUDOLI LINS VIEIRA

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências do Esporte à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador(a): Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

Limeira
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências
Aplicadas Sueli Ferreira Júlio de
Oliveira - CRB 8/2380

V673e Vieira, Renan Fudoli Lins, 1997-
Efeitos do jejum intermitente e do exercício físico sobre a adiposidade corporal e alterações metabólicas em camundongos / Renan Fudoli Lins Vieira. – Limeira, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: José Rodrigo Pauli.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Jejum. 2. Treinamento físico. 3. Obesidade. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Effects of intermittent fasting and physical exercise on body adiposity and metabolic changes in mice

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli

[Orientador] Vitor

Rosetto Muñoz

Data de entrega do trabalho definitivo: 18-12-2020

Autor: Renan Fudoli Lins Vieira

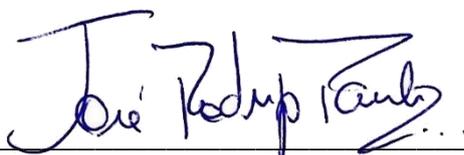
Título: Efeitos do jejum intermitente e do exercício físico sobre a adiposidade corporal e alterações metabólicas de camundongos

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 18/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

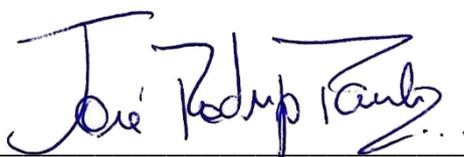


Prof. Dr. José Rodrigo Pauli – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Vitor Rosetto Muñoz – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Prof. Dr. José Rodrigo Pauli
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço meu pai e a minha mãe, Sidnei e Magna, meu irmão André e a todos os familiares que participaram do meu desenvolvimento como pessoa, que me educaram e mostraram os princípios e valores certos que devem ser seguidos, sendo essenciais para que eu seja uma pessoa responsável e respeitosa. Todos vocês fazem parte dessa conquista e vão sempre estar no meu coração.

Ao professor José Rodrigo Pauli, meu agradecimento por ter me aceitado como aluno e ter aberto as portas do seu laboratório, permitindo que eu possa trabalhar no meio científico e ter o contato com o meio acadêmico. Agradeço por toda ajuda desde nossa primeira conversa e tenho certeza de que você é uma grande inspiração para mim e para todos os seus alunos. Aproveito para agradecer aos outros professores que fazem parte do nosso grupo de pesquisa Adelino Sanchez, Dennys Cintra, Eduardo Ropelle e Leandro de Moura, e aos demais professores que fizeram parte da minha graduação.

Não posso deixar de agradecer a algumas pessoas especiais que fazem parte da minha vida e que participaram de alguma forma na minha graduação e deste trabalho. Quero agradecer aos amigos de Cerquilha, os amigos de graduação, Felipe, João Pedro e Thiago, aos amigos que tive o prazer de conhecer no laboratório e que também são grandes exemplos para a minha trajetória acadêmica, Rafael, Susana e Vitor, e a todos os integrantes do laboratório, meu muito obrigado a todos.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro na pesquisa e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de ingressar em uma universidade pública e por toda estrutura para que eu realizasse a minha graduação.

VIEIRA, Renan Fudoli Lins. Título: Efeitos do jejum intermitente e do exercício físico sobre a adiposidade corporal e alterações metabólicas de camundongos. 2020. nºf. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Ciências do Esporte – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

RESUMO

Algumas das intervenções adotadas para o combate à obesidade são o jejum intermitente (JI) e o exercício físico, estratégias que demonstram ser eficazes na prevenção e no tratamento de distúrbios metabólicos. No entanto, os efeitos sinérgicos e aditivos de uma intervenção combinada de JI e exercícios aeróbios no metabolismo do fígado não foram amplamente explorados. Assim, neste estudo, realizamos JI (8 h) e JI combinado com treinamento físico aeróbio (JI+Exe) e avaliamos a homeostase glicêmica e a expressão de genes hepáticos envolvidos na oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese em camundongos induzidos a obesidade com uma dieta rica em gordura. Foi demonstrado que JI isolado (comer apenas entre 22h e 6h) foi suficiente para reduzir o ganho de peso e adiposidade e diminuir os genes de lipogênese no fígado. No entanto, os camundongos expostos ao JI associado ao treinamento físico aeróbio apresentaram adaptações adicionais como aumento dos genes de oxidação de ácidos graxos (*Ppara* e *Cpt1a*), bem como redução da expressão de genes hepáticos para gliconeogênese (*Fbp1*, *Pck1* e *Pgc1a*) e lipogênese (*Srebp1c* e *Cd36*). Esses resultados foram acompanhados por melhora da homeostase glicêmica no grupo JI+Exe, que demonstrou melhora na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina. Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que o jejum intermitente aliado com o treinamento físico aeróbio é uma estratégia eficiente para mitigar os efeitos nocivos do consumo de uma dieta rica em gordura na adiposidade corporal, metabolismo hepático e homeostase glicêmica de camundongos Swiss jovens.

Palavras-chave: Jejum intermitente, Treinamento físico aeróbio, Obesidade, Metabolismo hepático.

VIEIRA, Renan Fudoli Lins. Effects of intermittent fasting and physical exercise on body adiposity and metabolic changes in mice. 2020. nºf. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Ciências do Esporte – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

ABSTRACT

One of the interventions adopted to combat obesity is intermittent fasting (IF) or physical exercise, which has been shown efficient in the prevention and treatment of metabolic disorders. However, the synergistic and additive effects of a combined intervention of JI and aerobic exercise on liver metabolism have not been explored. Thus, in this study, we performed JI (8 h) and JI combined with aerobic exercise training (JI+Exe) and assessment of glycemic homeostasis and the expression of liver genes involved in fatty acid oxidation, lipogenesis, and gluconeogenesis in mice induced by obesity with a high fat diet. It has been shown that JI alone (eating only between 10 pm and 6 am) was sufficient to reduce weight and adiposity gain, and decrease lipogenesis genes in the liver. However, mice exposed to JI associated with aerobic exercise training showed additional adaptations such as increased fatty acid oxidation genes (*Ppara* and *Cpt1 α*), as well as reduced expression of hepatic genes for gluconeogenesis (*Fbp1*, *Pck1*, and *Pgc1a*) and lipogenesis (*Srebp1c* and *Cd36*). These results were accompanied by increased in glycemic homeostasis in the JI+Exe group, which improves glucose tolerance and insulin sensitivity. In conclusion, our results obtained suggest that intermittent fasting combined with aerobic physical training is an efficient strategy to mitigate the harmful effects of consuming a high-fat diet on body adiposity, liver metabolism and glycemic homeostasis in young Swiss mice.

Keywords: Intermittent fasting, Aerobic exercise training, Obesity, Liver metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Jejum intermitente combinado ao exercício aeróbio atenua ganho de peso nos camundongos.....	19
Figura 2	Jejum intermitente combinado ao exercício aeróbio melhora a homeostase glicêmica.....	21
Figura 3	Jejum intermitente e treinamento aeróbio atenuam a expressão de genes da lipogênese e gliconeogênese e aumentam a expressão de genes de oxidação lipídica no fígado de camundongos.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de primers.....	18
----------	---------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcsI1	Ácido graxo de cadeia longa - acil-CoA sintetase 1
AcsI4	Ácido graxo de cadeia longa - acil-CoA sintetase 4
AcsI5	Ácido graxo de cadeia longa - acil-CoA sintetase 5
Cd36	Cluster de diferenciação 36
Cpt1a	Carnitina palmitoiltransferase I
CTL	Controle
$\Delta\Delta$CT	Delta-Delta Ct
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
EA	Exercício Aeróbio
Fasn	Ácido graxo sintase
Fatp4	Proteína 4 de transporte de ácidos graxos de cadeia longa
Fbp1	Frutose-Bisfosfatase 1
Gapdh	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
G6pc	Subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase
i.p	Intraperitoneal
JI	Jejum intermitente
JI+Exe	Jejum intermitente mais Exercício
OB	Obeso
Ppara	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa

Pc	Piruvato carboxilase
Pck	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
Pgc1a	O coativador 1-alfa do receptor gama
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SEM	Erro padrão da média
Srebp1c	O fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de estero
TTG	Teste de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
VE	Velocidade de exaustão

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
B	Beta
Δ	Delta
®	Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	MATÉRIAS E MÉTODOS.....	15
2.1	Caracterização dos animais.....	15
2.2	Protocolo de jejum intermitente.....	16
2.3	Teste de carga incremental.....	16
2.4	Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	16
2.5	Teste de tolerância a glicose (TTG).....	17
2.6	Teste de tolerância à insulina (TTI).....	17
2.7	Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos.....	17
2.8	Extração de RNA e RT-qPCR.....	17
2.9	Estatísticas.....	18
3	RESULTADOS.....	19
3.1	Parâmetros Fisiológicos.....	19
3.2	Testes Fisiológicos.....	20
3.3	Expressão de genes de oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese no tecido hepático.....	21
4	DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÃO.....	27
6	REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um grave problema de saúde pública em todo o mundo, que causa impacto econômico e social significativo, e consequente aumento da morbidade e mortalidade (Gregg and Shaw, 2017). O sedentarismo, aumento da ingestão calórica e qualidade nutricional reduzida, bem como fatores comportamentais são os principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento e agravamento da obesidade (Kushner, 2018; Li et al., 2018). Estudos têm demonstrado que uma dieta rica em gordura afeta negativamente a saúde metabólica, causando alterações no perfil lipídico e inflamatório, com consequente prejuízo na homeostase da glicose (Brunetta et al., 2020). Além disso, as flutuações nos períodos de jejum/alimentação têm um impacto crucial na saúde metabólica (Obert et al., 2017). Em condições normais, os roedores consomem alimentos principalmente em sua fase ativa, que é noturna e alterações nos padrões de alimentação e horários das refeições foram associadas a distúrbios do ritmo circadiano, aumento do peso corporal e distúrbios metabólicos (Zarrinpar et al., 2016).

O jejum intermitente (JI) por outro lado, vem sendo estudado a fim de identificar uma potencial estratégia contra a obesidade. Anteriormente, verificou-se que o JI protege roedores obesos induzidos por uma dieta hiperlipídica de um aumento na adiposidade corporal e distúrbios metabólicos (Chaix et al., 2014; Hatori et al., 2012; Regmi et al., 2020). Esses estudos mostram que o JI está associado com redução da massa corporal, glicemia e insulinemia e melhora no perfil lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica que tiveram ingestão alimentar similar a roedores alimentados ad libitum (Aouichat et al., 2020; Chaix et al., 2014; Hatori et al., 2012; Martinez-Lopez et al., 2017; Regmi et al., 2020; Sherman et al., 2012). Assim, mudanças relevantes no metabolismo de animais alimentados com dieta rica em gordura expostos ao JI. Considerando que a adoção do JI por períodos prolongados (acima de 16 horas) não é uma tarefa fácil para muitas pessoas, estratégias adicionais podem ser necessárias para manter a saúde metabólica. Além disso, o aumento do peso corporal também foi associado à redução da atividade física espontânea, comprometendo ainda mais o metabolismo de lipídios e carboidratos em roedores obesos (Hatori et al., 2012; Kohsaka et al., 2007). Portanto, talvez prevenir o ganho de peso quando houver exposição a uma dieta hiperlipídica seja uma estratégia necessária para preservar o nível de atividade

física. Dessa forma, o exercício físico associado a uma intervenção com JI pode efetivamente proteger o animal da obesidade.

O JI e o exercício aeróbio (EA) têm sido usados como intervenções não farmacológicas para prevenir ou tratar distúrbios relacionados à obesidade (ou seja, resistência à insulina, hiperglicemia, acúmulo de gordura hepática, entre outros) (De Cabo et al., 2014; Lustig et al., 2020). Quanto ao EA, estudos mostram que ele pode ser eficiente na supressão do programa gliconeogênico em roedores obesos, com efeitos relevantes na capacidade oxidativa e na melhora do desempenho (Marinho et al., 2012; Marosi et al., 2018). Porém, o próprio EA, sem ajustes nutricionais e restrição calórica, não tem sido eficiente na redução da gordura e do peso corporal (Ghanemi et al., 2020; Obert et al., 2017).

Neste trabalho, nossa hipótese é que o JI combinado com o treinamento aeróbio pode ser uma estratégia benéfica, com efeitos positivos contra a obesidade e distúrbios metabólicos associados ao consumo de dieta hiperlipídica. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o impacto do JI de 16 horas durante a fase ativa combinado com EA na homeostase glicêmica e nos marcadores moleculares relacionados oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese no fígado de camundongos Swiss alimentados com dieta rica em gordura.

2 MATÉRIAS E MÉTODOS

2.1 Caracterização dos animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com 4 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB). Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: Grupo Controle, animais alimentados *Ad Libitum* com dieta comercial padrão (CTL); Grupo obeso, animais alimentados *Ad Libitum* com dieta hiperlipídica (OB); Grupo Obeso Jejum intermitente, animais alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos a protocolo de jejum intermitente (JI); Grupo Obeso Jejum Intermitente Exercitado, animais alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos a protocolos de jejum intermitente e de exercício aeróbio (JI+Exe). Durante o protocolo experimental, os animais foram pesados e o consumo alimentar durante 24 horas também foi mensurado semanalmente. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de

Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP – Campinas-SP (processo nº5185-1/2019).

2.2 Protocolo de jejum intermitente

Os animais dos grupos JI e JI+Exe foram submetidos a um protocolo de jejum intermitente, no qual os animais tinham acesso a dieta hiperlipídica das 22:00 horas até as 06:00 horas (adaptado de Hatori et al., 2012). O acesso a ração foi realizado com a transferência dos camundongos de gaiolas com livre acesso a comida e água para gaiolas com acesso apenas à água. Assim, os animais tinham acesso à alimentação por 8 horas e realizavam jejum de 16 horas diárias.

2.3 Teste de carga incremental

Após a adaptação ao exercício aeróbio em ergômetro de corrida para roedores por 5 dias com velocidade de 3m/min por 10 minutos, os animais do grupo JI+Exe realizaram o teste de carga incremental. Os animais começaram o teste com velocidade inicial de corrida de 6 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão, definida quando os camundongos tocaram a extremidade da esteira cinco vezes em 60 segundos. A velocidade de exaustão (VE) obtido no teste de corrida em esteira foi utilizado para determinar a intensidade de 60% da VE do exercício aeróbio. O teste de carga incremental foi repetido mais duas vezes, ao final da quarta e sétima semana do protocolo, para correção da intensidade do treinamento devido à melhora do desempenho. Ao final do protocolo de 10 semanas, o teste foi realizado novamente.

2.4 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O protocolo de treinamento físico teve duração de 10 semanas e foi realizado todos os dias da semana com intensidade de 60% da VE obtida no teste de carga incremental após o período de alimentação (portanto, com início às 6 horas da manhã). O volume do treinamento aumentou gradualmente durante o protocolo, durante a primeira semana foram 30 minutos, na segunda semana o volume foi de 45 minutos e na terceira semana foram 60 minutos de treinamento, volume que foi utilizado até o final da décima semana de treinamento.

2.5 Teste de tolerância a glicose (TTG)

Durante a nona semana do protocolo, após 6 horas de jejum e 24 horas da última sessão de exercício físico os animais realizaram o teste de tolerância a glicose (TTG). Os animais receberam via intraperitoneal (i.p.) uma solução de glicose 50% (2 g/Kg de peso corporal), na sequência, amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0 (antes da injeção de glicose), 30, 60 e 120 minutos, para as dosagens da glicemia a partir da cauda dos animais. Em seguida, a área sob a curva foi calculada em cada grupo experimental.

2.6 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Na décima semana de experimentos, após 6 horas de jejum e 24 horas da última sessão de exercício os animais realizaram o teste de tolerância a insulina (TTI). Para isso, os camundongos receberam injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/Kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0 (antes da injeção de insulina), 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a partir da cauda dos animais para a determinação da glicemia. A área sob a curva foi calculada em cada grupo experimental.

2.7 Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos

Os camundongos receberam previamente aos procedimentos cirúrgicos e de extração dos tecidos injeção intraperitoneal (i.p.) de *ketamine chlorohydrate* (50 mg/Kg; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) e *xylazine* (20 mg/Kg; Rompun; Bayer, Leverkusen), e foram eutanasiados por decapitação. Os procedimentos de extração ocorreram após 24 horas da última sessão de exercício e 6 horas de jejum. Os animais receberam estímulo de insulina (10UI/Kg) via intraperitoneal e 10 minutos após, mostras do tecido adiposo epididimal e fígado foram retiradas e rapidamente congeladas em nitrogênio e armazenadas em biofreezer a -80° C. O fígado, tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram pesados em balança analítica (Gehaka®, BK3000) e foi feita a comparação entre os grupos.

2.8 Extração de RNA e análise por RT-qPCR

O tecido hepático foi homogeneizado em 400 µL de Trizol (Life Technologies, Rockville, MD) e o conteúdo de RNA foi extraído de acordo com as instruções do

fabricante. Um total de 2 µg de RNA foi usado para a síntese de cDNA usando Kits de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems®, Forest City, CA). As amostras de cDNA foram submetidas a uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando 300 ng de cDNA e 0,3 µM dos seguintes primers: *Ppara*, *Cpt1a*, *Acs11*, *Acs14*, *Acs15*, *Fatp4*, *Srebp1c*, *Fasn*, *Cd36*, *Fbp1*, *G6pc*, *Pck*, *Pc*, *Pgc1a* e *Gapdh* para controle endógeno sintetizados pela Exxtend® (Paulínia, SP, Brasil) e iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA). Os dados foram avaliados no software StepOne (Applied Biosystems), calculando o $\Delta\Delta C_t$.

Tabela 1. Sequência de Primers.

Sequência de Primers		
	Forward	Reverse
<i>Ppara</i>	5' - ACCACTACGGAGTTCACGCATG - 3'	5' - GAATCTTGCAGCTCCGATCACAC - 3'
<i>Cpt1a</i>	5' - AAAGATCAATCGGACCCTAGACA - 3'	5' - CAGCGAGTAGCGCATAGTCA - 3'
<i>Acs11</i>	5' - ACACTTCCTTGAAGCGATGG - 3'	5' - GGCTCGACTGTATCTTGTGG - 3'
<i>Acs14</i>	5' - GCACCTTCGACTCAGATCAC - 3'	5' - CCAGGTTTGTCTGAAGTGGG - 3'
<i>Acs15</i>	5' - CGCCCCATCTCCACTCCAG - 3'	5' - GCTTCAAACACCCAACATCCCATTGC - 3'
<i>Fatp4</i>	5' - GACTTCTCCAGCCGTTTCCACA - 3'	5' - CAAAGGACAGGATGCGGCTATTG - 3'
<i>Fasn</i>	5' - GAGGACACTCAAGTGGCTGA - 3'	5' - GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT - 3'
<i>Srebp1c</i>	5' - GAGGACACTCAAGTGGCTGA - 3'	5' - GGGAAGTCACTGTCTTGGTTGTT - 3'
<i>Cd36</i>	5' - TGGAGCTGTTATTGGTGCAG - 3'	5' - TGGGTTTTGCACATCAAAGA - 3'
<i>Fbp1</i>	5' - TGCTGAAGTCGTCTACGCTAC - 3'	5' - TTCCGATGGACACAAGGCAGTC - 3'
<i>G6pc</i>	5' - GCGCAGCAGGTGTATACTATG - 3'	5' - CGTTCAAACACCGGAATCCA - 3'
<i>Pck</i>	5' - AGAAGAAATACCTGGCCGCA - 3'	5' - CTTAAGTTGCCTTGGGCATCA - 3'
<i>Pc</i>	5' - AAGTTTGGTTGCGCGGAG - 3'	5' - TCAGCATCATTAGTGTGTCAGC - 3'
<i>Pgc1a</i>	5' - GAATCAAGCCACTACAGACACCG - 3'	5' - CATCCCTCTGAGCCTTTCGTG - 3'
<i>Gapdh</i>	5' - AACTTTGGCATTGTGGAAGG - 3'	5' - ACACATTGGGGGTAGGAACA - 3'

2.9 Estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados que não passaram no teste de normalidade foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. O teste de Shapiro-Wilk examinou a normalidade. Os dados que mostram normalidade foram analisados usando o teste de ANOVA, seguido por post-hoc de

Bonferroni. A significância estatística utilizada foi $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 8.0®.

3 RESULTADOS

3.1 Jejum intermitente combinado ao exercício aeróbio atenua ganho de peso nos camundongos

Observamos que a partir da 6ª semana o grupo OB apresentava massa corporal maior comparada aos grupos CTL, JI e JI+Exe (Figura 2 A). Além disso, a partir da 6ª semana também encontramos diferença na massa corporal entre os grupos JI e JI+Exe. Quanto a ingestão alimentar, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na ingestão durante o período de 24 horas (Figura 2 B). Quando analisamos o peso das gorduras intraperitoneais (mesentérico, epididimal e retroperitoneal), o peso das gorduras do grupo OB foi superior aos dos grupos CTL e JI+Exe, além disso, na soma das gorduras, o grupo OB apresentou um conteúdo de gordura maior do que os grupos CTL, JI e JI+Exe (figura 2 C-D).

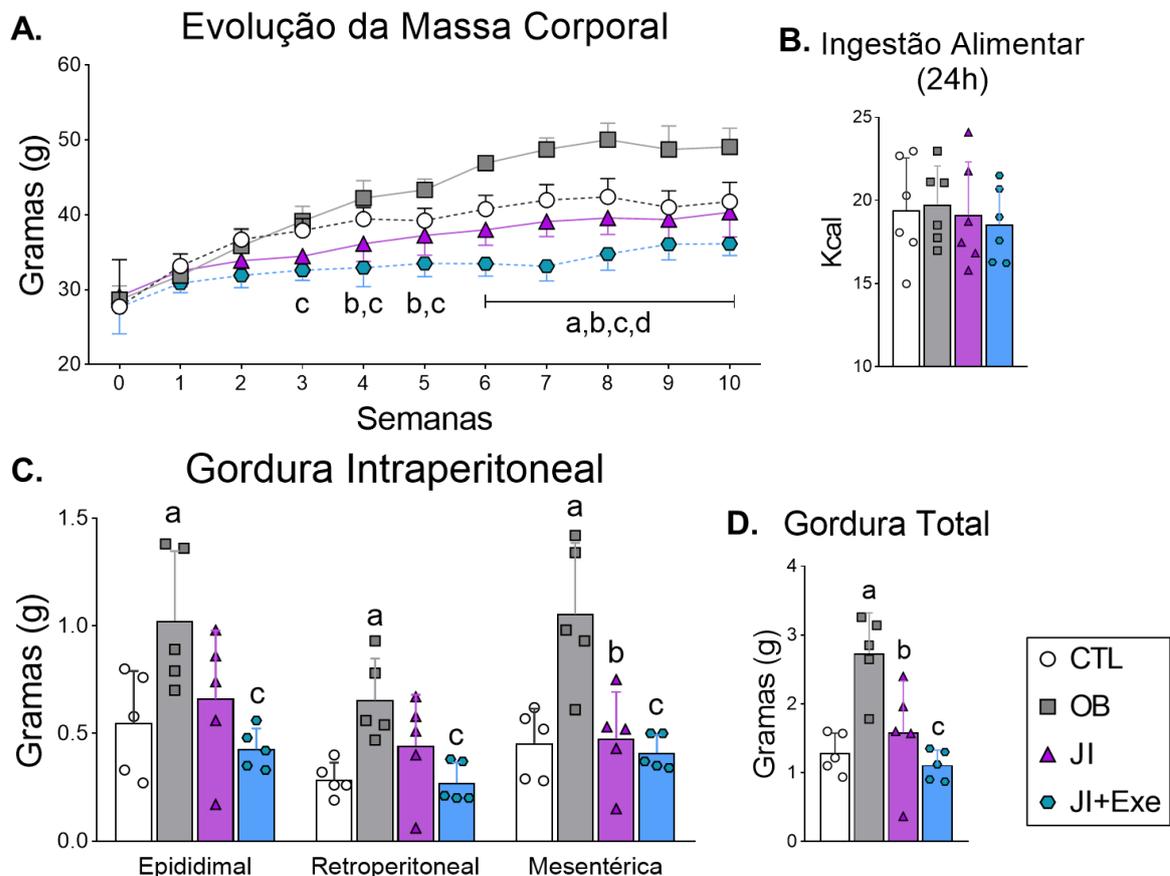


Figura 1. Parâmetros fisiológicos. A. Curva de peso corporal durante 10 semanas. B. Ingestão alimentar durante 24 horas. C. Peso do tecido adiposo

intraperitoneal (Epididimal, Retroperitoneal e Mesentérica). D. Ganho total de gordura intraperitoneal. As barras representam médias e DP dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe (n = 5-6). A significância estatística utilizada foi $p < 0,05$. ^a para o grupo CTL versus OB; ^b para o grupo OB versus JI; ^c para o grupo OB versus JI+Exe; ^d para o grupo JI versus JI+Exe.

3.2 Jejum intermitente combinado ao exercício aeróbio melhora a homeostase glicêmica

Durante as dez semanas de protocolo de JI e EA realizamos os testes fisiológicos de tolerância a glicose e insulina. No teste de tolerância a glicose, o grupo OB apresentou prejuízo na tolerância a glicose, com níveis glicêmicos superior com 30, 60 e 120 minutos comparado aos grupos CTL e JI+Exe. Além disso, o grupo JI+Exe teve níveis glicêmicos melhores do que o grupo JI nos tempos 30 e 60 minutos do TTG (Figura 3 A-B). No teste de tolerância a insulina o grupo OB teve níveis glicêmicos superior aos grupos CTL e JI+Exe em todos os pontos de coleta indicando um prejuízo na sensibilidade a insulina. O protocolo de JI aliado a EA novamente mostrou se eficiente, inclusive em comparação com o grupo JI, com níveis glicêmicos menores nos tempos de 15 e 20 minutos do TTI (Figura 3 C-D).

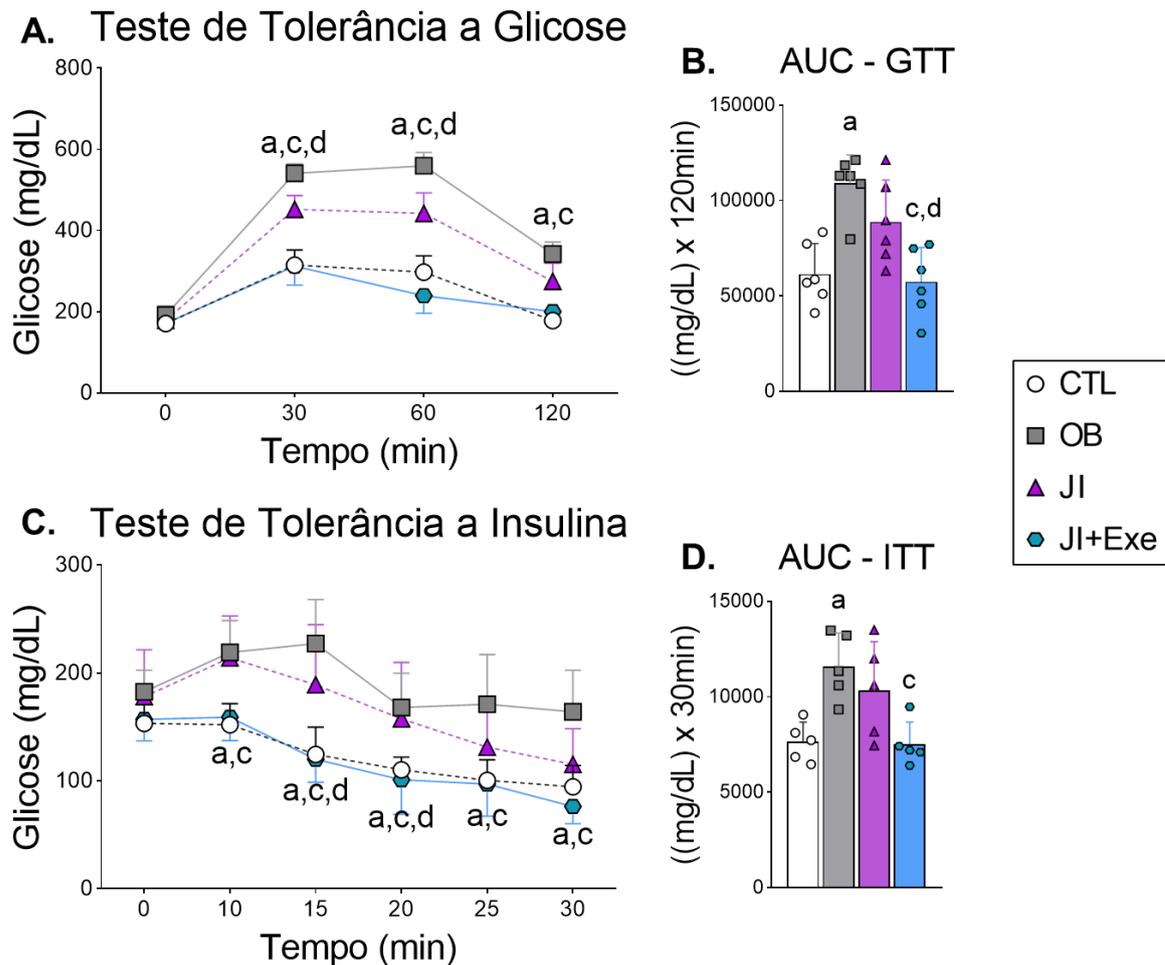


Figura 2. Testes fisiológicos. A. Curva do teste de tolerância à glicose. B. A área sob a curva do teste de tolerância à glicose. C. Curva do teste de tolerância à insulina. D. Área sob a curva do teste de tolerância à insulina. As barras representam médias e DP dos grupos CTL, OB, Jl e Jl+Exe (n = 5-6). A significância estatística utilizada foi $p < 0,05$. a para o grupo CTL versus OB; b para o grupo OB versus Jl; c para o grupo OB versus Jl+Exe; d para o grupo Jl versus Jl+Exe.

3.3 Jejum intermitente e treinamento aeróbio atenuam a expressão de genes da lipogênese e gliconeogênese e aumentam a expressão de genes de oxidação lipídica no fígado de camundongos

O RNAm para genes relacionados à oxidação de ácidos graxos, lipogênese e produção de glicose hepática induzida por insulina no fígado também foram determinados. Para os genes de oxidação de ácidos graxos, os níveis de ppara foram significativamente maiores no grupo Jl+Exe em comparação com OB e Jl; Cpt1a foi maior nos grupos Jl e Jl+Exe em relação ao grupo OB; os níveis de Acs11,

Acs14 e *Acs15* foram maiores no grupo OB em comparação com CTL (Figura 4 A). Para os genes de lipogênese, o grupo OB apresentou níveis aumentados de *Srebp1c* e *Cd36* em comparação com o grupo CTL, mas os grupos JI e JI+Exe apresentaram níveis mais baixos em comparação ao grupo OB (Figura 4 B). Quanto aos genes gliconeogênicos, o grupo OB apresentou níveis mais elevados de *Fbp1*, *Pc*, *Pck1* e *Pgc1a* em comparação ao grupo CTL, entretanto, o grupo JI+Exe mostraram alguma proteção contra esse aumento (Figura 4 C).

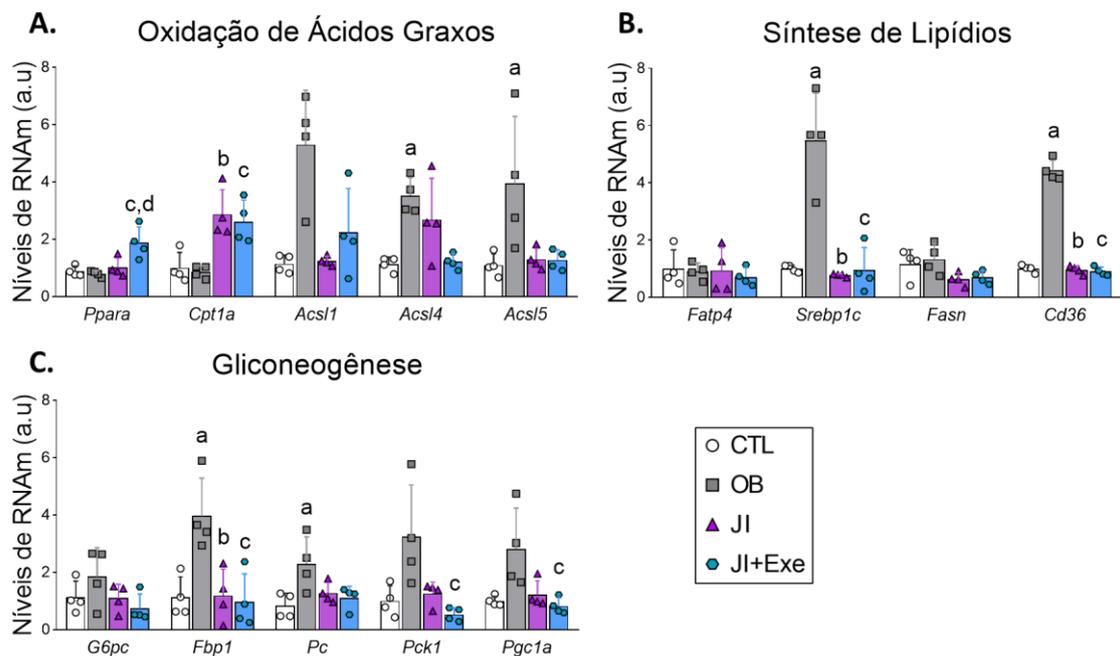


Figura 3. Expressão da oxidação de ácidos graxos, lipogênese e gliconeogênese no tecido hepático A. Níveis de RNAm em genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (*Ppara* / *Cpt1a* / *Acs11* / *Acs14* / *Acs15*). B. Níveis de RNAm em genes relacionados à lipogênese (*Fatp4* / *Srebp1c* / *Fasn* / *Cd36*). C. Níveis de RNAm em genes relacionados à gliconeogênese (*G6pc* / *Fbp1* / *Pc* / *Pck1* / *Pgc1a*). O gene GAPDH foi utilizado para normalizar os níveis de RNAm. As barras representam médias e DP dos grupos CTL, OB, JI e JI+Exe (n = 4). A significância estatística utilizada foi $p < 0,05$. a para o grupo CTL versus OB; b para o grupo OB versus JI; c para o grupo OB versus JI+Exe; d para o grupo JI versus JI+Exe.

4 DISCUSSÃO

Estudos recentes descreveram o JI como uma estratégia nutricional para prevenir ou tratar a obesidade, controlar a massa corporal, melhorar a sensibilidade

à insulina e mitigar o acúmulo de lipídios hepáticos (Melkani and Panda, 2017; Regmi and Heilbronn, 2020; Villanueva et al., 2019). Assim, o JI é uma estratégia não farmacológica que, aliada ao exercício físico, pode trazer muitos benefícios na obesidade (Lustig et al., 2020); entretanto, o impacto do JI combinado com o treinamento físico no metabolismo hepático de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura não foi amplamente explorado. Neste estudo, usamos um protocolo de JI combinado com treinamento físico aeróbio e analisamos a homeostase glicêmica e o metabolismo hepático de camundongos alimentados com dieta rica em gordura.

Nossos resultados mostram que o efeito combinado do JI e do treinamento físico aeróbio atenuou o ganho de peso, a adiposidade corporal e a intolerância à glicose em camundongos alimentados com dieta rica em gordura. Além disso o grupo JI+Exe teve melhora na sensibilidade a insulina no metabolismo hepático em relação aos genes de oxidação de ácidos graxos, lipólise e gliconeogênese. Desta forma, esse trabalho demonstra que JI+Exe tem efeitos positivos na prevenção da obesidade induzida por dieta rica em gordura e oferece benefícios adicionais em relação ao protocolo de JI isolado na manutenção da massa corporal, melhora da homeostase glicêmica e metabolismo hepático.

Os dados de composição corporal mostraram que a alimentação com dieta hiperlipídica promoveu aumento da massa corporal no grupo OB, porém, o JI foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal a partir da quarta semana. Além disso, o grupo JI também apresentou menor gordura mesentérica e gordura total em comparação ao grupo OB. Esses resultados corroboram com estudos que demonstraram efeitos positivos do JI no controle da massa corporal (Hatori et al., 2012; Sherman et al., 2012), e que reforçam o papel do JI como estratégia potencial no tratamento e prevenção da obesidade. Quando o JI foi combinado com o treinamento físico aeróbio, os camundongos apresentaram benefícios adicionais, como menor gordura epididimal, retroperitoneal e mesentérica em comparação ao grupo OB e o grupo JI+Exe apresentou peso corporal menor que o grupo JI após a 6ª semana. Estudo anterior com ratos Wistar em que os animais submetidos a protocolo de JI combinado com a realização de exercício de natação por 6 semanas também destacou um efeito adicional no grupo que realizou JI combinado com exercício na prevenção do aumento da massa corporal (de Moraes et al., 2017).

O grupo OB mostrou prejuízo na homeostase glicêmica, durante os testes fisiológicos os animais apresentaram menor tolerância à glicose e sensibilidade a insulina. A literatura mostra que animais que consomem dieta hiperlipídica também apresentaram resultados adversos no metabolismo da glicose mesmo em curto período de exposição (Brunetta et al., 2020; Kuipers et al., 2019; Nakandakari et al., 2019; Oliveira et al., 2015). O grupo JI+Exe por outro lado, mostrou eficiência no controle glicêmico, no teste de tolerância a glicose o grupo apresentou melhores resultados comparado ao grupo OB e JI. No teste de tolerância a insulina, novamente o grupo JI+Exe teve resultados positivos, apresentando maior sensibilidade a insulina comparado ao grupo OB.

Os resultados indicam que o grupo JI+Exe melhora a homeostase glicêmica, o que não foi observado no grupo JI, essa diferença provavelmente é uma consequência dos efeitos do exercício físico no fígado, mais também de ações em outros tecidos metabolicamente importantes para a homeostase glicêmica. Assim, o exercício induz um aumento na captação de glicose em tecidos metabólicos como músculo, coração, tecido adiposo e fígado (McGee and Hargreaves, 2020; Stanford and Goodyear, 2016; Vettor et al., 2014). O aumento da expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) é uma das adaptações em resposta ao treinamento aeróbico que aumenta a captação de glicose em resposta ao estímulo com insulina no músculo esquelético e favorece a normoglicemia (Kraniou et al., 2004; Richter and Hargreaves, 2013). Assim, o exercício físico regular é um estímulo importante e eficaz para aumentar a expressão de GLUT4 no músculo esquelético, o que contribui para uma melhor ação da insulina e diminuição da glicemia, o que foi observado no grupo JI+Exe.

O fígado é um órgão fundamental para o metabolismo, e está ligado a mudanças fisiológicas do corpo e à saúde metabólica. Assim avaliamos o metabolismo hepático dos camundongos através da análise de RT-qPCR de genes ligados a lipogênese, gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos. Os animais expostos a uma dieta rica em gordura aumentaram os níveis de RNAm dos genes lipogênicos (Srebp1c e Cd36) e gliconeogênicos (Fbp1 e Pc). No entanto, o grupo JI apresentou diminuição da expressão gênica da lipogênese (Srebp1c e Cd36). Curiosamente, os camundongos submetidos aos protocolos de JI e EA mostraram reduções nas expressões de RNAm dos genes de lipogênese e gliconeogênese, mas aumentaram as expressões de RNAm dos genes de oxidação de ácidos graxos

(Ppara e Cpt1a). Assim, os efeitos adversos da dieta hiperlipídica também foram observados no aumento da síntese lipídica e da gliconeogênese hepática e o JI conseguiu atenuar esses efeitos. Ao combinar JI e EA os resultados são ainda mais robustos e indicam uma proteção maior contra os prejuízos do consumo de dieta hiperlipídica.

Foi demonstrado que o JI reduz a expressão de enzimas como piruvato carboxilase e glicose 6-fosfatase no fígado (Chaix et al., 2014; Hatori et al., 2012). Essas adaptações do tecido hepático foram acompanhadas por reduções na glicemia e melhora na homeostase glicêmica. Além disso, o JI está associado a uma diminuição nos genes para ácido graxo sintase, esteroil CoA dessaturase e ácido graxo elongase e, conseqüentemente, com menos armazenamento de lipídios (Chaix et al., 2014; Hatori et al., 2012). O exercício físico tem sido outra estratégia capaz de atenuar a produção hepática de glicose em roedores alimentados com dieta hiperlipídica. Essa melhora promovida pelo exercício físico está relacionada com aumento de genes reguladores e proteínas críticas da gliconeogênese, como PEPCCK e G6Pase (Gaspar et al., 2020; Pauli et al., 2014; Pereira et al., 2019, 2020). Em nosso estudo, a combinação de JI com e treinamento aeróbio preveniu o aumento da expressão de genes gliconeogênicos na obesidade induzida por dieta.

Em nosso estudo, os camundongos tiveram acesso à dieta hiperlipídica durante a noite, período de atividade dos animais. Investigações anteriores indicam que os resultados do JI são mais positivos na prevenção do ganho de massa corporal e homeostase glicêmica nessas condições (Chaix et al., 2019; Lecheminant et al., 2013) e que quando o JI teve a alimentação durante o ciclo inativo os resultados foram mais discretos ou não ocorreram (Bray et al., 2010; Freire et al., 2020; Hatori et al., 2012; Rothschild et al., 2014). Já o treinamento aeróbio ocorreu logo após o período de alimentação dos camundongos. Estudo anterior realizado com camundongos também mostrou que comer pela manhã ou ao meio-dia seguido de exercícios à noite pode prevenir o ganho de peso de forma mais eficaz do que exercícios pela manhã seguidos de comer ao meio-dia ou à noite (Sasaki et al., 2014). Essas são variáveis interessantes para pesquisas futuras que podem analisar os efeitos do JI durante o ciclo inativo aliado ao exercício físico, onde também pode se analisar o efeito de diferentes tipos de exercício como treinamento de resistência ou intervalado de alta intensidade.

Estudos com humanos também mostram que o jejum intermitente com janelas de alimentação de 8 a 12 horas, foi eficaz no controle da massa corporal em indivíduos obesos ou pré-diabéticos, e efeitos adicionais, como redução da pressão arterial e níveis de lipídios também foram encontrados (Gill & Panda, 2015; Gabel et al., 2018; Chow et al., 2020; Wilkinson et al., 2020). Em indivíduos do sexo masculino com alto risco de desenvolver diabetes tipo 2, o JI forneceu um controle glicêmico positivo (Hutchison et al., 2019). No estudo de Moro et al., Indivíduos do sexo masculino treinados com exercícios resistidos realizaram um protocolo de JI (8 horas de janela de alimentação e 3 refeições diárias). Eles mostraram redução da massa gorda e manutenção da massa muscular (Moro et al., 2016). Outro estudo com pré-diabéticos analisou os efeitos do protocolo JI (janela de 6 horas após o ciclo circadiano, com a última refeição, realizada até as 15 horas), e observou uma melhora nos níveis de insulina e na resposta das células β , também como uma redução na pressão arterial e estresse oxidativo (Sutton et al., 2018). No entanto, estudos em que a alimentação aconteceu ao final da tarde e à noite não mostraram resultados benéficos ou mostraram piora em aspectos como glicemia de jejum, resposta das células β e pressão arterial (Carlson et al., 2007; Stote et al., 2007).

Alinhar o jejum intermitente com os ritmos circadianos novamente mostra ser ponto chave para que os benefícios de realizar o jejum intermitente ocorram. Assim a duração do jejum e a distribuição das refeições são importantes para a eficiência do jejum intermitente como mostrado em estudos anteriores onde indivíduos que se alimentaram durante a manhã perderam mais peso em comparação com indivíduos que se alimentaram durante a noite (Di Francesco et al., 2018; Raynor et al., 2018). Com isso, novos estudos com jejum intermitente tanto em animais como em humanos são importantes para que se aprofundem os conhecimentos sobre a relação entre o jejum intermitente e os ritmos circadianos. Além disso, outras variáveis como o exercício físico e o impacto da interrupção do jejum intermitente na fisiologia e metabolismo são importantes para que em breve tenhamos uma estratégia mais efetiva contra a obesidade e doenças associadas e que associado com a farmacologia por exemplo melhorem a saúde e a qualidade de vida das pessoas.

5 CONCLUSÃO

Em suma, esses resultados mostram que o JI com a alimentação realizada no ciclo ativo seguido do treinamento aeróbio foi eficaz em mitigar os impactos metabólicos da exposição a uma dieta rica em gordura. Assim o JI combinado com o treinamento aeróbio pode ser importante para prevenir e minimizar os efeitos prejudiciais da obesidade induzida por dieta hiperlipídica e melhorar a homeostase glicêmica e metabolismo hepático de camundongos.

6 REFERÊNCIAS

Aouichat, S., Chayah, M., Bouguerra-Aouichat, S., and Agil, A. (2020). Time-Restricted Feeding Improves Body Weight Gain, Lipid Profiles, and Atherogenic Indices in Cafeteria-Diet-Fed Rats: Role of Browning of Inguinal White Adipose Tissue. *Nutrients* 12, 2185.

Bray, M.S., Tsai, J.Y., Villegas-Montoya, C., Boland, B.B., Blasier, Z., Egbejimi, O., Kueht, M., and Young, M.E. (2010). Time-of-day-dependent dietary fat consumption influences multiple cardiometabolic syndrome parameters in mice. *Int. J. Obes.* 34, 1589–1598.

Brunetta, H.S., Politis-Barber, V., Petrick, H.L., Dennis, K.M.J.H., Kirsh, A.J., Barbeau, P., Nunes, E.A., and Holloway, G.P. (2020). Nitrate attenuates high fat diet-induced glucose intolerance in association with reduced epididymal adipose tissue inflammation and mitochondrial reactive oxygen species emission. *J. Physiol.* 16, 3357–3371.

De Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M.N., and Madeo, F. (2014). The search for antiaging interventions: From elixirs to fasting regimens. *Cell* 157, 1515–1526.

Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., and Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab.* 20, 991–1005.

Chaix, A., Lin, T., Le, H.D., Chang, M.W., and Panda, S. (2019). Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab.* 29, 303-319.e4.

Di Francesco, A., Di Germanio, C., Bernier, M., and De Cabo, R. (2018). A time to fast. *Science* (80-.). 362, 770–775.

Freire, T., Senior, A.M., Perks, R., Pulpitel, T., Clark, X., Brandon, A.E., Wahl, D., Hatchwell, L., Le Couteur, D.G., Cooney, G.J., et al. (2020). Sex-specific metabolic responses to 6 hours of fasting during the active phase in young mice. *J. Physiol.* 598, 2081–2092.

Gaspar, R.C., Muñoz, V.R., Nakandakari, S.C.B.R., Vieira, R.F.L., da Conceição, L.R., de Oliveira, F., Crisol, B.M., da Silva, A.S.R., Cintra, D.E., de Moura, L.P., et al. (2020). Aging is associated with increased TRB3, ER stress, and hepatic glucose production in the liver of rats. *Exp. Gerontol.* 139.

Ghanemi, A., Melouane, A., Yoshioka, M., and St-Amand, J. (2020). Exercise and high-fat diet in obesity: Functional genomics perspectives of two energy homeostasis pillars. *Genes (Basel).* 11, 1–16.

Gregg, E.W., and Shaw, J.E. (2017). Global health effects of overweight and obesity. *N. Engl. J. Med.* 377, 80–81.

Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E.A., Gill, S., Leblanc, M.,

Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J.A.J., et al. (2012). Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 15, 848–860.

Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F.W., and Bass, J. (2007). High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab.* 6, 414–421.

Kraniou, G.N., Cameron-Smith, D., and Hargreaves, M. (2004). Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. *Exp. Physiol.*

Kuipers, E.N., Held, N.M., In Het Panhuis, W., Modder, M., Ruppert, P.M.M., Kersten, S., Kooijman, S., Guigas, B., Houtkooper, R.H., Rensen, P.C.N., et al. (2019). A single day of high-fat diet feeding induces lipid accumulation and insulin resistance in brown adipose tissue in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*

Kushner, R.F. (2018). Weight Loss Strategies for Treatment of Obesity: Lifestyle Management and Pharmacotherapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 246–252.

Lecheminant, J.D., Christenson, E., Bailey, B.W., and Tucker, L.A. (2013). Restricting night-time eating reduces daily energy intake in healthy young men: A short-term cross-over study. *Br. J. Nutr.*

Li, Y., Pan, A., Wang, D.D., Liu, X., Dhana, K., Franco, O.H., Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Stampfer, M., Willett, W.C., et al. (2018). Impact of healthy lifestyle factors on life expectancies in the us population. *Circulation* 138, 345–355.

Lustig, E., Shubrook, J.H., and Pfothenauer, K.M. (2020). Time-Restricted Feeding and Potential for Type 2 Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 120, 560.

Marinho, R., Ropelle, E.R., Cintra, D.E., De Souza, C.T., Da Silva, A.S.R., Bertoli, F.C., Colantonio, E., D’Almeida, V., and Pauli, J.R. (2012). Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J. Cell. Physiol.* 227, 2917–2926.

Marosi, K., Moehl, K., Navas-Enamorado, I., Mitchell, S.J., Zhang, Y., Lehrmann, E., Aon, M.A., Cortassa, S., Becker, K.G., and Mattson, M.P. (2018). Metabolic and molecular framework for the enhancement of endurance by intermittent food deprivation. *FASEB J.* 32, 3844–3858.

Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., Batista-Gonzalez, A., Barzilai, N., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., et al. (2017). System-wide Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy. *Cell Metab.* 26, 856-871.e5.

McGee, S.L., and Hargreaves, M. (2020). Exercise adaptations: molecular mechanisms and potential targets for therapeutic benefit. *Nat. Rev. Endocrinol.*

Melkani, G.C., and Panda, S. (2017). Time-restricted feeding for prevention and

treatment of cardiometabolic disorders. *J. Physiol.* 595, 3691–3700.

de Moraes, R.C.M., Portari, G.V., Ferraz, A.S.M., da Silva, T.E.O., and Marocolo, M. (2017). Effects of intermittent fasting and chronic swimming exercise on body composition and lipid metabolism. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*

Nakandakari, S.C.B.R., Muñoz, V.R., Kuga, G.K., Gaspar, R.C., Sant’Ana, M.R., Pavan, I.C.B., da Silva, L.G.S., Morelli, A.P., Simabuco, F.M., da Silva, A.S.R., et al. (2019). Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain. Behav. Immun.*

Obert, J., Pearlman, M., Obert, L., and Chapin, S. (2017). Popular Weight Loss Strategies: a Review of Four Weight Loss Techniques. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 19, 17–20.

Oliveira, V., Marinho, R., Vitorino, D., Santos, G.A., Moraes, J.C., Dragano, N., Sartori-Cintra, A., Pereira, L., Catharino, R.R., Da Silva, A.S.R., et al. (2015). Diets containing α -linolenic (ω 3) or oleic (ω 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* 156, 4033–4046.

Pauli, L.S.S., Ropelle, E.C.C., de Souza, C.T., Cintra, D.E., da Silva, A.S.R., de Almeida Rodrigues, B., de Moura, L.P., Marinho, R., de Oliveira, V., Katashima, C.K., et al. (2014). Exercise training decreases mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *J. Physiol.* 592, 1325–1340.

Pereira, R.M., Da Cruz Rodrigues, K.C., Anaruma, C.P., Sant’Ana, M.R., De Campos, T.D.P., Gaspar, R.S., Dos Santos Canciglieri, R., De Melo, D.G., Mekary, R.A., Da Silva, A.S.R., et al. (2019). Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice. *J. Endocrinol.* 241, 59–70.

Pereira, R.M., da Cruz Rodrigues, K.C., Sant’Ana, M.R., Peruca, G.F., Morelli, A.P., Simabuco, F.M., da Silva, A.S.R., Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Pauli, J.R., et al. (2020). Strength exercise reduces hepatic pyruvate carboxylase and gluconeogenesis in DIO mice. *J. Endocrinol.*

Raynor, H.A., Li, F., and Cardoso, C. (2018). Daily pattern of energy distribution and weight loss. *Physiol. Behav.*

Regmi, P., and Heilbronn, L.K. (2020). Time-Restricted Eating: Benefits, Mechanisms, and Challenges in Translation. *IScience* 23, 101161.

Regmi, P., Chaudhary, R., Page, A.J., Hutchison, A.T., Vincent, A.D., Liu, B., and Heilbronn, L. (2020). Early or delayed time restricted feeding prevents metabolic impact of obesity in mice. *J. Endocrinol.* 1–33.

Richter, E.A., and Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* 93, 993–1017.

Rothschild, J., Hoddy, K.K., Jambazian, P., and Varady, K.A. (2014). Time-restricted feeding and risk of metabolic disease: A review of human and animal studies. *Nutr. Rev.* 72,

308–318.

Sasaki, H., Ohtsu, T., Ikeda, Y., Tsubosaka, M., and Shibata, S. (2014). Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol. Int.*

Sherman, H., Genzer, Y., Cohen, R., Chapnik, N., Madar, Z., and Froy, O. (2012). Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB J.* 26, 3493–3502.

Stanford, K.I., and Goodyear, L.J. (2016). Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte.*

Vettor, R., Valerio, A., Ragni, M., Trevellin, E., Granzotto, M., Olivieri, M., Tedesco, L., Ruocco, C., Fossati, A., Fabris, R., et al. (2014). Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: Role in adaptation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*

Villanueva, J.E., Livelio, C., Trujillo, A.S., Chandran, S., Woodworth, B., Andrade, L., Le, H.D., Manor, U., Panda, S., and Melkani, G.C. (2019). Time-restricted feeding restores muscle function in *Drosophila* models of obesity and circadian-rhythm disruption. *Nat. Commun.* 10, 1–17.

Zarrinpar, A., Chaix, A., and Panda, S. (2016). Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 69–83.