



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA



GABRIEL CALHEIROS ANTUNES

**Efeitos do tempo de restrição alimentar combinado com
exercício físico ou agonista da Rev-erba sobre a obesidade
e metabolismo hepático de camundongos machos e fêmeas**

Limeira – SP
2024

GABRIEL CALHEIROS ANTUNES

Efeitos do tempo de restrição alimentar combinado com exercício físico ou agonista da Rev-erb α sobre a obesidade e metabolismo hepático de camundongos machos e fêmeas

*Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas
como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do
título de Mestre em
Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo na
área de Ciências
Nutricionais e Metabolismo*

Orientador: Prof^o. Dr. José Rodrigo Pauli

*ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO(A) ALUNO GABRIEL
CALHEIROS ANTUNES E ORIENTADA PELO PROF. DR.
JOSÉ RODRIGO PAULI*

Limeira – SP
2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

An89e Antunes, Gabriel Calheiros, 1999-
Efeitos do tempo de restrição alimentar combinado com exercício físico ou agonista da Rev-erb sobre a obesidade e metabolismo hepático de camundongos machos e fêmeas / Gabriel Calheiros Antunes. – Limeira, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: José Rodrigo Pauli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Exercícios físicos. 3. Membro 1 do grupo A da subfamília 4 de receptores nucleares. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effects of time restricted feeding combined with physical exercise or Rev-erb agonist on obesity and hepatic metabolism of male and female mice

Palavras-chave em inglês:

Obesity Exercise

Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Alisson Luiz da Rocha

Vítor Rosseto Muñoz

Data de defesa: 30-08-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2400-8475>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1748502941123294>

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA

**Efeitos do tempo de restrição alimentar combinado com
exercício físico ou agosnista da Rev-erba sobre à obesidade
e metabolismo hepático de camundongos machos e fêmeas**

Autor: Gabriel Calheiros Antunes

Orientador: José Rodrigo Pauli

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, Presidente

Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp – Limeira.

Prof. Dr. Alisson Luiz da Rocha

Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp – Limeira.

Prof. Dr. Vitor Rosseto Munoz

Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFERP-USP)

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Agradecimentos

Chegar ao final deste ciclo acadêmico e apresentar esta tese de Mestrado é, sem dúvidas, um momento marcante em minha vida. A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e a contribuição de muitas pessoas que estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada.

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador e amigo, José Rodrigo Pauli. Sua orientação e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa, assim como minha evolução pessoal. Agradeço pela paciência, pelas valiosas críticas e pelo incentivo constante, que me impulsionaram a buscar sempre o melhor. Foi um privilégio ter sido seu aluno.

Aos meus pais, Marcelo e Claudia, não consigo encontrar palavras suficientes para expressar o quanto sou grato. Obrigado por terem me proporcionado as bases para que eu pudesse realizar meus sonhos. O amor e o apoio de vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus tios, Humberto e Erika, por todo o suporte, motivação e carinho que me deram nesta trajetória, em especial no meu período sanduíche. O apoio de vocês fez toda a diferença.

Aos meus amigos e também colegas de trabalho, que sempre estiveram presentes, seja nos momentos de festa ou nos desafios, sou eternamente agradecido. Vocês tornaram essa jornada mais leve, com bastante risada e piadas nos momentos de café que foram cruciais para o desenvolvimento do meu trabalho. Como também o apoio e a colaboração de cada um de vocês trouxeram perspectivas valiosas que enriqueceram minha pesquisa. A troca de experiências e ensinamentos foram cruciais para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao meu avô, José Heleno. Sua história, determinação e positividade foram, e continuam a ser, uma grande inspiração para mim. Agradeço por todo o suporte e ensinamentos que você me transmitiu e por sempre acreditar em meu potencial. Sua memória e seu legado me acompanham e guiam em todas as minhas conquistas.

Agradeço aos demais professores responsáveis pelo LaBMEx, ao programa e à Unicamp FCA por toda estrutura disponibilizada, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, responsável pelo financiamento deste projeto (2021/13847-8).

Muito obrigado!

Resumo

Padrões alimentares erráticos, como os experimentados por trabalhadores em turnos invertidos, podem agravar a obesidade e a doença hepática esteatótica metabólica (DHEM). O tempo de restrição alimentar (TRA) surgiu como uma estratégia potencial para mitigar os efeitos da obesidade, apoiada por vários estudos sobre seus benefícios para transtornos metabólicos como a DHEM. A prática de exercício físico regular é recomendada como um método não farmacológico para lidar com a obesidade e problemas relacionados. Tanto o TRA quanto o exercício mostram, de forma independente, promissora melhoria na saúde metabólica, no peso e no controle glicêmico. Além disto, estratégias farmacológicas envolvendo proteínas do ciclo circadiano, como a Rev-erba, são potenciais terapias para o combate a obesidade e a DHEM. Assim, combinar ambas as abordagens poderia ser uma estratégia potencial para combater a obesidade e a DHEM. Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos e fêmeas com seis semanas de vida, submetidos a um protocolo de indução à obesidade por 8 semanas e posteriormente submetidos ao TRA isoladamente, TRA combinado com exercício aeróbio e TRA combinado com a administração de SR9009 em camundongos obesos. Foi observado que o tratamento da obesidade e DHEM por meio da estratégia de TRA, mesmo na janela inativa dos animais, mostrou efeitos positivos na perda de peso, adiposidade, homeostase glicêmica, sensibilidade à insulina, acúmulo de gordura hepática e redução de genes lipogênicos e inflamatórios no fígado de camundongos em dieta ocidental por 8 semanas. A combinação do TRA com exercício aeróbio proporcionou benefícios complementares em relação a regulação de TG hepático e RER para os machos, já as fêmeas demonstraram um melhor controle do colesterol sérico, juntamente com a redução da expressão do gene *Fatp4* para ambos os sexos. O desempenho no exercício aeróbio também melhorou para ambos, com machos obtendo resultados superiores. Observou-se variação nas respostas metabólicas entre os sexos, destacando a necessidade de mais estudos. Adicionalmente, a associação do agonista da Rev-erba com o TRA trouxe melhorias na homeostase glicêmica, sensibilidade à insulina e colesterol sérico, contribuindo com dados inovadores para a literatura sobre essa combinação terapêutica.

Palavras-chave: Obesidade; Tempo de Restrição Alimentar; Exercício Físico; Rev-erba.

Abstract

Erratic eating patterns, such as those experienced by shift workers, can worsen obesity and metabolic steatotic liver disease (MSLD). Time-restricted eating (TRE) has emerged as a potential strategy to mitigate the effects of obesity, supported by several studies on its benefits for metabolic disorders like MSLD. Regular physical exercise is recommended as a non-pharmacological method to address obesity and related issues. Both TRE and exercise show promising independent improvements in metabolic health, weight, and glycemic control. Furthermore, pharmacological strategies involving circadian cycle proteins, such as Rev-erba, are potential therapies against obesity and MSLD. Thus, combining both approaches could be a promising strategy to combat obesity and MSLD. Male and female C57BL/6J mice, six weeks old, were used and subjected to an obesity induction protocol for eight weeks, followed by isolated TRE, TRE combined with aerobic exercise, and TRE combined with the administration of SR9009 in obese mice. It was observed that the treatment of obesity and MSLD through the TRE strategy, even during the animals' inactive window, showed positive effects on weight loss, adiposity, glycemic homeostasis, insulin sensitivity, hepatic fat accumulation, and a reduction of lipogenic and inflammatory genes in the livers of mice on a Western diet for eight weeks. The combination of TRE with aerobic exercise provided complementary benefits regarding hepatic TG regulation and RER for males, while females exhibited better control of serum cholesterol, along with a reduction in the expression of the *Fatp4* gene for both sexes. Aerobic exercise performance also improved for both, with males achieving superior results. Variations in metabolic responses between sexes were observed, highlighting the need for further studies. Additionally, the association of the Rev-erba agonist with TRE brought improvements in glycemic homeostasis, insulin sensitivity, and serum cholesterol, contributing innovative data to the literature on this therapeutic combination.

Key words: Obesity; Time restricted feeding; Physical Exercise; Rev-erba.

Sumário

Introdução.....	9
Obesidade e distúrbios metabólicos no tecido hepático	11
Tempo de restrição alimentar (TRA) e exercício físico no combate a obesidade e DHEM: Implicações do sexo e ciclo circadiano.....	13
Regulação do metabolismo hepático através da Rev-erba	16
Hipótese	17
Objetivos.....	18
Objetivo Geral	18
Objetivo específicos.....	18
Materiais e Métodos	19
Aprovação ética.....	19
Protocolo Experimental.....	19
Protocolo de Alimentação com Restrição de Tempo	20
Teste de Carga Incremental	21
Protocolo de Treinamento de Exercício Aeróbico.....	22
Tratamento com agonista da Rev-erba	22
Consumo de Oxigênio, Relação de Troca Respiratória e Produção de Calor	22
Testes de Tolerância à Glicose e Insulina Intraperitoneais (ipGTT e ipITT).....	22
Análise Bioquímica do Sangue	23
Extração do Fígado, Homogeneização e Determinação do Teor Total de Proteínas ..	23
Análise de Western Blotting	24
Extração de RNA e RT-qPCR	24
Análise Histológica	25
Análise Estatística.....	25
Resultados.....	40
Discussão	47
Referências.....	49

1 Introdução

A obesidade é um grave problema de saúde pública, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, envolvendo uma grande variedade de fatores (genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais, psicológicos e ambientais), de alcance mundial e com taxas que quase dobraram nos últimos 30 anos (1,2). No Brasil, segundo a organização mundial da saúde (OMS), aproximadamente, metade da população brasileira encontra-se acima da massa corporal ideal (3). O excesso de adiposidade é acompanhado muitas vezes de resistência à insulina, que contribui para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos graves, incluindo diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (4–6). Além de fornecer um local de armazenamento de gordura, o tecido adiposo branco desempenha um papel fundamental na regulação da sensibilidade à insulina em tecidos alvo desse hormônio, como músculo esquelético e fígado (7,8). O tecido adiposo exerce esse efeito quando macrófagos do tipo M2 polarizam para macrófagos do tipo M1 e são recrutados para o tecido adiposo, produzindo citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que podem prejudicar a ação da insulina, levando à resistência à insulina (1,2).

A metainflamação existente na obesidade induz prejuízos na sinalização e ação da insulina, com distúrbios notórios em processos metabólicos no fígado (9–12). Nessa condição de resistência à insulina verifica-se aumento da lipólise e maior direcionamento de ácidos graxos livres para o fígado, culminando em acentuado acúmulo de triacilgliceróis (TAG) no tecido hepático e mais tardiamente o desencadeamento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHEM) (12,13). Especula-se que a DHEM atinge um bilhão de indivíduos no mundo todo (14). Se não controlada de maneira eficiente, a DHEM pode evoluir para esteatohepatite não alcoólica (non-alcoholic steatohepatitis - NASH - em inglês), cirrose e alguns tipos de carcinoma hepático (15). Não obstante, a DHEM por si pode aumentar o risco do desenvolvimento de outras doenças metabólicas, incluindo diabetes, dislipidemias, cardiopatias, entre outras, fazendo com que os pesquisadores sugerissem renomear essa doença como doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (Metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease - DHEM - em inglês). Apesar disso, os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da doença e um tratamento efetivo para ela continuam sendo um grande desafio, uma vez que ainda não foram totalmente elucidados (16).

A produção hepática de glicose (glicogenólise e gliconeogênese) também pode ser mais exacerbada em condições de obesidade e resistência à insulina (12–14). Com isso,

verifica-se hiperglicemia de jejum e aumento dos valores de hemoglobina glicada que são indicadores relacionados com distúrbio do metabolismo de carboidrato no fígado (11,12). Tal fato ocorre, pois, a insulina é um hormônio essencial para supressão da transcrição de enzimas chaves relacionadas a gliconeogênese no fígado (12). Portanto, prejuízos na sinalização desse hormônio acarretam em uma elevação da produção de glicose pelo tecido hepático e em hiperglicemia. Além disso, a hiperinsulinemia está relacionada com vias moleculares que favorecem o acúmulo de gordura no fígado (12). Assim, estratégias com intuito de melhorar a saúde e a função hepática são cruciais para prevenir o DM2 e o desenvolvimento e progressão da DHEM.

O tempo de restrição alimentar (TRA) tem sido uma estratégia adotada para minimizar os impactos da obesidade (16,17). Nas últimas décadas um número grande de estudos vem tentando investigar os efeitos fisiológicos e moleculares desse tipo de intervenção em modelos experimentais com intuito de verificar os benefícios potenciais sobre o organismo e na prevenção e tratamento de distúrbios metabólicos atrelados a doenças como obesidade e DM2 (16–19). Na mesma direção, como uma estratégia não farmacológica, o exercício físico tem sido utilizado para minimizar ou reverter os impactos da obesidade e suas comorbidades (20–23). Portanto, verifica-se que tanto o TRA quanto o exercício físico têm se mostrado capaz de promover benefícios metabólicos, reduzir peso e adiposidade corporal e melhorar a homeostase glicêmica.

Embora esses efeitos isolados da realização do TRA ou do exercício físico tenham sido positivos para a saúde metabólica, a realização combinada de TRA e exercício físico é ainda incipiente. Ademais, os efeitos do TRA parecem depender do horário que é realizado e do sexo do roedor. É necessário comentar que em estudo prévio realizado em nosso laboratório envolvendo a combinação de TRA e exercício físico aeróbio, os camundongos tiveram acesso à alimentação à noite e, portanto, no período mais ativo (17). De acordo com investigações anteriores, o TRA nestas condições parece promover resultados mais satisfatórios, principalmente em relação à atenuação do ganho de peso e melhora da homeostase glicêmica (17,18,24). Por outro lado, foi demonstrado que quando o TRA foi aplicado no ciclo diurno e, portanto, na fase inativa do animal, os resultados foram mais discretos ou não ocorreram (18,25,26).

Assim, torna-se relevante investigar se a estratégia adotada em nosso estudo anterior de combinação de TRA com treinamento físico aeróbio também pode ser eficiente se aplicado ao ciclo diurno do animal. Também é necessário destacar que o treinamento físico aeróbio foi realizado no final do período ativo e após o período de alimentação dos roedores. Estudo anterior mostrou que comer pela manhã ou ao meio-dia seguido de exercício à noite

pode prevenir ganho de peso de forma mais eficaz do que exercícios durante a manhã seguida de comer ao meio-dia ou à noite (27). Não menos importante, é relevante mencionar que os impactos do TRA não foram tão satisfatórios em roedores fêmeas se comparado a machos (28). Isto sugere que intervenções adicionais (como a de um programa de treinamento físico) podem ser necessárias para melhorar a saúde em fêmeas. Mediante os achados na literatura é possível verificar que há ainda muitas lacunas a serem exploradas quanto o assunto é TRA.

Adicionalmente, outra estratégia com potencial para perda de peso e melhora do metabolismo, envolve ações capazes de promover a regulação de genes e proteínas relacionadas ao ciclo circadiano. Especialmente, a via de sinalização da REV-ERB demonstra ser um alvo interessante em ambos os mecanismos e com um impacto sobre o ganho de peso (29) e saúde metabólica (30,31). A proteína REV-ERB, codificada pelo gene *Nr1d1* está relacionada com a regulação dos genes relacionados ao relógio biológico a nível do sistema nervoso central, possuindo também uma relação direta no controle de outros genes localizados nos tecidos periféricos, incluindo o fígado (29,30). A ativação da REV-ERB através de um agonista tem se mostrado capaz de atenuar os impactos da obesidade sobre o acúmulo de gordura no fígado (30,32). Isto sugere que a REV-ERB possui uma função essencial na regulação sistêmica e pode ser um alvo promissor de combate a obesidade e a DHEM, mas que ainda não foi testada junto com o TRA e em ambos os sexos de roedores.

1.1 Obesidade e distúrbios metabólicos no tecido hepático.

Entre as doenças metabólicas relacionadas à obesidade e ao envelhecimento, a doença hepática relacionada à obesidade metabólica (DHEM) tem se tornado a mais prevalente (33). O aumento do estresse oxidativo, da inflamação, da disfunção mitocondrial e a redução na sinalização de hormônios fundamentais para processos metabólicos como lipogênese e gliconeogênese no fígado são fatores que agravam as condições associadas ao tecido hepático.(14,17,20,34–38). A combinação desses fatores pode levar ao desenvolvimento de fibrose no fígado, que pode progredir para estágios mais severos como cirrose e carcinoma hepatocelular. A DHEM é o ponto de partida para o desenvolvimento de fibrose no tecido hepático, caracterizada pelo acúmulo de gordura intracelular. A prevalência da DHEM em adultos varia entre 15% a 30%, com uma tendência a aumentar após os 65 anos, podendo alcançar de 30% a 40%(39–41).

Além do acúmulo de gordura no fígado, a resistência à insulina contribui para o aumento da produção de glicose pelo fígado (PHG), uma vez que a insulina tem a

capacidade de inibir a gliconeogênese ao regular a expressão de enzimas chave dessa via (13,14,42). Portanto, a ineficácia em suprimir a gliconeogênese é considerada um fator crucial para a hiperglicemia observada em pacientes com DM2 (42).

Pesquisas que induziram obesidade em roedores através de dietas ricas em gordura mostraram resistência à insulina em tecidos periféricos, como o músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado (17,20,22,43,44). No tecido adiposo branco, que é o principal reservatório energético do corpo, a resistência à insulina impede a interrupção da lipólise, resultando em um aumento do fluxo de triacilgliceróis e ácidos graxos livres na corrente sanguínea (15). Essas substâncias são então captadas pelo fígado, onde uma parte é transportada para as mitocôndrias por meio de proteínas como a carnitina palmitoil transferase (CPT) para serem oxidadas (β -oxidação), enquanto outra parte é convertida em gordura (lipogênese) e armazenada nas células hepáticas, levando à esteatose hepática (45). Além disso, a lipogênese de novo, que é um processo hepático, pode ser acionada por dietas ricas em gordura saturada, carboidratos e frutose, consistindo na produção de novos ácidos graxos a partir de glicose, aminoácidos e carboidratos (45).

Os níveis de glicose no sangue são fundamentais para a lipogênese, pois a glicose é convertida em acetil-coenzima A (acetil-CoA) e, em seguida, em malonil-CoA, que é o principal substrato desse processo (45). Para que a lipogênese ocorra, a atuação das enzimas ACC (acetil-CoA carboxilase), FAS (ácido graxo sintase) e SCD1 (esteroil-CoA dessaturase) é essencial. A ACC converte o acetil-CoA em malonil-CoA, a FAS sintetiza ácidos graxos de cadeia longa a partir do malonil-CoA, e a SCD1 transforma malonil-CoA em ácidos graxos monoinsaturados (46). Pesquisas indicaram que animais com obesidade e hiperglicemia apresentam um aumento no conteúdo proteico de ACC, FAS e SCD1. Além disso, a hiperglicemia leva a um aumento na produção e na liberação de insulina, que é o principal hormônio responsável pela regulação da lipogênese (47).

A regulação da lipogênese pela insulina ocorre por meio da ativação do fator de transcrição SREBP-1C (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esteroil). Esse fator controla a expressão gênica de ACC, FAS e SCD1 (12,48). A sinalização da insulina promove a fosforilação da proteína quinase B (Akt), o que leva à ativação do complexo mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos), que, por sua vez, sinaliza para o SREBP-1C (12,49). A importância dessa via foi demonstrada experimentalmente pela inibição do SREBP-1C, que resultou em uma redução no acúmulo de gordura no fígado de camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura. (48).

Outra função crucial da insulina é a regulação da produção de nova glicose a partir

de substratos não carboidratos no fígado (42). Assim, a resistência à insulina no tecido hepático tem implicações significativas na inibição da gliconeogênese, levando a um aumento nos níveis de glicose no sangue, tanto em jejum quanto após as refeições (42). O efeito da insulina na supressão da gliconeogênese no fígado se dá por meio de sua ligação ao receptor de insulina (IR) na membrana celular e a subsequente cascata de sinalização intracelular. Quando o hormônio se liga ao receptor, ocorre uma mudança de forma no IR que resulta em sua ativação. Uma vez ativado, o IR fosforila os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS1 e IRS2), ativando-os e estimulando sua associação com a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (12). A PI3K ativa a proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos (PKD), que então recruta a Akt e induz sua fosforilação. A Akt regula várias moléculas envolvidas em diferentes vias metabólicas, incluindo a síntese de glicogênio, ao fosforilar a glicogênio sintase 3 (GSK3). Além disso, a Akt também pode fosforilar o fator de transcrição FoxO1, um importante regulador da gliconeogênese. A FoxO1 é responsável pela transcrição de proteínas chave dessa via metabólica, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase) (12). Com a fosforilação, a FoxO1 é removida do núcleo, interrompendo o processo transcricional e, conseqüentemente, reduzindo a expressão e o conteúdo proteico de PEPCK e G6Pase (12). A superexpressão da FoxO1 leva a um aumento de G6Pase. Por outro lado, a ausência da FoxO1, especialmente no fígado, resulta em hipoglicemia em jejum nos animais knock-out para esse gene (50). Animais que tiveram a FoxO1 deletada também mostraram menor expressão de PEPCK e G6Pase, indicando que a FoxO1 é um alvo terapêutico importante para a manutenção da homeostase glicêmica (51).

Além disso, o excesso de ganho de peso, a resistência à insulina e a esteatose hepática estão associados à disfunção mitocondrial (52). As mitocôndrias, organelas essenciais para a respiração celular, contêm enzimas que convertem glicose, ácidos graxos e aminoácidos em energia (53). Em geral, a disfunção mitocondrial afeta todas as células, mas tem um impacto mais significativo nas que demandam maior quantidade de energia, como as do músculo cardíaco, fígado e tecido adiposo (52–54). A incapacidade de gerar energia adequadamente prejudica o funcionamento do músculo, do tecido adiposo e do fígado. Portanto, estratégias voltadas para melhorar a saúde e a função hepática são fundamentais para prevenir diabetes tipo 2 e para o desenvolvimento e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) para esteatohepatite não alcoólica e cirrose.

1.2 Tempo de restrição alimentar (TRA) e exercício físico no combate a obesidade e DHEM: Implicações do sexo e ciclo circadiano

Considerado uma intervenção dietética, a realização do TRA vem se popularizando nas últimas décadas. O TRA é uma estratégia alimentar adotada no qual não se faz ingestão de alimentos em um período do dia, resultando geralmente em uma menor ingestão calórica diária, assim levando a perda de peso corporal (55). O tempo adotado nesse tipo de intervenção é variável, com períodos de 9-12 h ou mais tempo. No entanto, períodos restritivos de tempo de alimentação, em especial superior a 16 horas são mais difíceis de serem adotados e mantidos a longo prazo pelas pessoas (56). Já o TRA de 16 horas tem se mostrado capaz de induzir perda de peso e melhoras metabólicas na condição de obesidade (17,18). Entretanto, a regulação da homeostase glicêmica através do tempo de restrição alimentar e os efeitos disso em tecidos periféricos merece maior investigação. A avaliação dos efeitos do TRA associado ao exercício físico ainda é bastante escasso (57). Como também, os efeitos combinados do TRA ao exercício físico em roedores fêmeas não foram amplamente explorados. Outra lacuna existente é a relação entre TRA e exercício físico sobre a regulação do ciclo circadiano. Neste cenário, não é sabido se os efeitos fisiológicos do tempo de restrição alimentar estão ligados diretamente na regulação de mecanismos moleculares do ciclo circadiano, como por exemplo a proteína REV-ERB que exerce importante ação relacionada ao ritmo do relógio biológico e o metabolismo (16).

Sabe-se que a manutenção da prática do jejum e a redução de peso tende a reduzir as taxas metabólicas freando a perda de peso em longo prazo (58). Ademais, com a redução de peso e adiposidade corporal os níveis de leptina também reduzem, sendo este um hormônio de fundamental importância para regulação da fome e saciedade (59). Esta é uma questão intrigante e que desperta interesse da comunidade científica com intuito de prover mecanismos capazes de potencializar essa manutenção da perda de peso e principalmente proteger do reganho de peso. A queda no metabolismo (redução da taxa metabólica basal) acaba por impactar negativamente na manutenção da perda de peso a longo prazo (58). Dessa maneira, deslizos na alimentação com exageros na ingestão de calorias durante o ciclo inativo (no qual a taxa metabólica é reduzida) favorecem o reganho de peso em programas de emagrecimentos que tem como estratégia o uso do TRA.

Em uma pesquisa anterior, foi encontrado que a ingestão alimentar total em animais submetidos a uma dieta rica em gordura, mesmo sob restrição alimentar (TRA), pode ser comparável àquela de roedores alimentados *ad libitum*. Assim, a implementação do TRA pode não ser suficiente para evitar o desenvolvimento de alterações metabólicas prejudiciais quando o organismo está exposto a uma dieta hiperlipídica por períodos prolongados (18,60). Mudanças significativas no metabolismo tendem a ser mais pronunciadas quando o jejum é prolongado em roedores com alto teor de gordura na dieta (61). Por isso, manter

períodos de TRA mais longos (acima de 16 horas) pode ser desafiador para muitas pessoas, e estratégias adicionais podem ser necessárias para apoiar a saúde metabólica. Além disso, o aumento de peso foi associado à diminuição da atividade física espontânea, o que prejudica ainda mais o metabolismo de lipídios e carboidratos em roedores obesos (18,62). Portanto, combinar um programa de exercícios físicos com o TRA pode ser uma estratégia eficaz para proteger os roedores da obesidade.

Estudos em humanos também indicam que o TRA, com janelas de alimentação de 8 a 12 horas, pode ser eficaz para o controle da massa corporal em indivíduos obesos ou pré-diabéticos, além de trazer benefícios adicionais como a redução da pressão arterial e dos níveis de lipídios no sangue (63–66). Em homens com alto risco de desenvolver diabetes tipo 2 (DM2), o TRA mostrou um controle glicêmico positivo (67). Outro estudo envolvendo pré-diabéticos avaliou um protocolo de TRA (com uma janela de 6 horas, com a última refeição até as 15 horas) e observou melhorias nos níveis de insulina e na resposta das células β do pâncreas, além de redução na pressão arterial e no estresse oxidativo (68). Assim, o ritmo circadiano parece ser um fator fundamental para a eficácia do TRA. Estudos que aplicaram a alimentação restrita no final da tarde ou à noite apresentaram menor eficácia, levando a piores resultados em termos de glicemia de jejum, resposta das células β e pressão arterial (69,70). Contudo, o ciclo de trabalho das pessoas nem sempre permite que sejam seguidos horários mais adequados para a alimentação e o TRA.

Especulamos, que o tempo de restrição alimentar seja uma estratégia capaz de promover benefícios a saúde metabólica e reduzir adiposidade corporal, mas seus efeitos são mitigados em longo prazo. Este efeito reduzido na capacidade de reduzir a adiposidade pode estar relacionado a sinalização da REV-ERB, que como visto tem implicações na transcrição de genes em tecidos periféricos relacionados ao gasto energético e metabolismo de carboidrato e gorduras (30–32,71). Portanto, o exercício físico pode ser uma estratégia que adotado em associação com o TRA pode trazer benefícios adicionais e ser eficiente em proteger dos distúrbios provocados pela alimentação de uma dieta rica em gordura sobre o metabolismo hepático em roedores machos e fêmeas. Em estudos anteriores temos visto que o exercício físico pode proteger os animais dos efeitos da obesidade e isso foi atrelado a uma melhora na sinalização da insulina e diminuição do acúmulo de gordura e produção de glicose pelo fígado em camundongos (20–22).

Quanto ao impacto do sexo sobre os distúrbios metabólicos induzidos por uma dieta obesogênica observa-se que são necessários mais estudos. Sabe-se atualmente que as mulheres são mais propensas a ganhar massa adiposa e resistir à perda de gordura corporal. Quando se olha para prevalência global da obesidade, os números apontam que

é mais alto nas mulheres do que nos homens (72). Outra característica que merece destaque é a que mulheres têm mais gordura e menos massa magra (músculo esquelético) em relação aos homens, mas para um equivalente de adiposidade, as mulheres são mais sensíveis à insulina do que os homens (28). Além disso, as evidências provenientes de estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram grandes diferenças entre os sexos na prevalência de distúrbios metabólicos, com mulheres sendo protegidas de doenças cardiovasculares (DCV) em relação a homens antes da menopausa. Apesar desse menor risco, nos últimos 20 anos, o risco de DCV aumentou em mulheres na pré-menopausa, que foi atribuído a um aumento na prevalência de diabetes que pode compensar esse dimorfismo sexual (73). Levando em consideração que as mulheres desenvolvem doenças metabólicas, como DGHNA, e também são propensas a evoluir para formas mais graves da doença, urge a necessidade de incluir a avaliação dos impactos do TRA e exercício neste grupo também. Por fim, acreditamos que o TRA associado ao exercício físico seja capaz de regular a REV-ERB, que é um repressor transcricional que regula os processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento da DHEM, incluindo a lipogênese e a inflamação. E que a análise da regulação da REV-ERB e do metabolismo hepático em machos e fêmeas possam revelar diferentes adaptações, com obtenção de dados que serão pioneiros para a área da saúde.

1.3 Regulação do metabolismo hepático através da Rev-erba

Em especial, a via de sinalização das Rev-erbs (Rev-erba e Rev-erbβ) se demonstra ser um alvo interessante em mecanismos relacionados de ingestão alimentar e gasto energético e com um impacto sobre o ganho de peso (29). As Rev-erbs, estão relacionadas com a regulação dos genes centrais do ciclo circadiano, possuindo também uma relação direta no controle de outros genes localizados nos tecidos periféricos (29,30). Ambas as proteínas (Rev-erba e Rev-erbβ) podem ligar-se a elementos específicos do DNA e regular a transcrição de genes, mas elas têm diferentes alvos genéticos e podem influenciar a expressão gênica de maneiras distintas. A Rev-erba é amplamente expressa em muitos tecidos, incluindo o fígado e o cérebro, e está especialmente associada ao controle do metabolismo e da homeostase energética. Já a Rev-erbβ, por outro lado, é mais prevalente no sistema nervoso central e está mais envolvido na regulação do ritmo circadiano e na resposta a estímulos ambientais (30,74). Isto sugere que a Rev-erba possui uma função essencial na regulação sistêmica e pode ser um alvo promissor de combate a obesidade.

No nível celular, o relógio circadiano é controlado por mecanismos de transcrição e tradução com diferentes genes, incluindo período (Per, para o qual existem três genes Per1-Per3), criptocromo 1 e 2 (Cry1 e Cry2), Bmal1 (também conhecido como Arntl) e Clock

(75,76). Os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 heterodimerizam e ativam a expressão dos genes *Per* e *Cry* ligando-se a elementos E-box em seus promotores (76). As proteínas CRY e PER formam oligômeros que são transportados do citoplasma para o núcleo, onde reprimem sua própria transcrição ao inibir a atividade BMAL1-CLOCK. BMAL1-CLOCK também induz a expressão do receptor nuclear Rev-erba, que reprime a transcrição de *Bmal1* por meio da ligação direta a um elemento de resposta REV-ERBa (RORE) dentro do promotor *Bmal1* (77). A Rev-erba é expressa em uma variedade de tipos de tecido, incluindo gordura marrom, músculo esquelético e fígado (71,78). Além de sua ação no mecanismo do relógio circadiano, REV-ERBa foi implicado na adipogênese (79), diferenciação muscular (80), metabolismo hepático (31) e neurogênese (81).

Estudo prévio demonstrou que o tratamento com agonista (SR9009) da Rev-erba em camundongos obesos tem efeitos benéficos para distúrbios metabólicos, especificamente DHEM (30,82). Além disso, os autores verificaram que a administração do agonista da Rev-erba melhorou o perfil metabólico nos camundongos, sendo visto redução dos níveis de glicose e melhora da tolerância à glicose, e também melhora da saúde hepática, suprimindo a inflamação envolvida na progressão da DHEM (30,82). Adicionalmente, foi observado uma redução significativa na expressão de genes pró-fibróticos no fígado, que foi consistente com a redução da fibrose hepática. Portanto, o conhecimento atual permite considerar que a Rev-erba controla a expressão de genes downstream envolvidos no metabolismo lipídico hepático por meio da interação com HNF6 e HNF4 α (83), e que a Rev-erba regula a ação dos glicocorticóides ligando-se ao receptor de glicocorticóides no fígado (83). No entanto, a Rev-erba não é o único ligante que interage com o agonista SR9009, fazendo com que haja efeitos independentes da ação da Rev-erba e não relacionados ao ciclo circadiano (74).

Camundongos com deleção global de Rev-erba demonstram alterações marcantes no equilíbrio diário de utilização de carboidratos e lipídios e apresentam um fenótipo de acúmulo e armazenamento de lipídios substancialmente aumentado (83). Isso é caracterizado por esteatose hepática e hipertrofia do tecido adiposo em animais normais alimentados com ração padrão, que é exacerbada por uma dieta rica em gordura. A avaliação dos efeitos da administração do agonista da Rev-erba em roedores submetidos ao TRA machos e fêmeas ajudarão a compreender os impactos da regulação dessa proteína sobre o metabolismo hepático e direcionar terapêuticas futuras para combater a obesidade.

2 HIPÓTESE

Portanto, nossa hipótese é que a TRA, quando combinada com exercício físico aeróbio ou agonista da Rev-Erba, terá efeitos complementares e sinérgicos, sendo a saúde

metabólica mais eficaz em comparação com o efeito da TRA isoladamente, com um impacto positivo no peso corporal, inflamação e metabolismo de machos e fêmeas. Além disso, especulamos que esses benefícios ocorrerão mesmo com uma janela de acesso à comida no ciclo diurno dos animais. Portanto, investigamos os efeitos da TRA associada ao treinamento de exercício aeróbio em machos e fêmeas alimentados com dieta ocidental no ciclo claro, e associado ao tratamento farmacológico com o agonista (SR9009) da Rev-Erba na obesidade e no metabolismo hepático em machos alimentados com dieta ocidental no ciclo claro.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliação dos efeitos do tempo de restrição alimentar combinado com exercício físico ou agonista da Rev-Erba sobre a obesidade e metabolismo hepático em camundongos machos e fêmeas alimentados com dieta rica em gordura.

3.2 Objetivos específicos

Etapa 1 – Avaliação dos efeitos do TRA realizado no ciclo inativo combinado ou não com o exercício físico aeróbio realizado durante o ciclo diurno sobre o metabolismo lipídico e inflamatório no fígado de camundongos machos e fêmeas;

- a) Avaliar parâmetros de peso corporal e adiposidade;
- b) Verificar homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina;
- c) Determinar acúmulo de gordura no tecido hepático;
- d) Analisar vias metabólicas (lipogênese e inflamação) no tecido hepático;
- e) Analisar o consumo de VO₂, CO₂ e RER;

Etapa 2 – Avaliação dos efeitos do TRA realizado no ciclo noturno combinado ou não com o agonista da Rev-Erba realizado durante o ciclo inativo sobre o metabolismo lipídico no fígado de camundongos machos;

- a) Avaliar parâmetros de peso corporal e adiposidade;
- b) Verificar homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina;
- c) Determinar acúmulo de gordura no tecido hepático;
- d) Analisar via metabólica da lipogênese no tecido hepático;
- e) Analisar o consumo de VO₂, CO₂ e RER;

4 Métodos

4.1 Aprovação ética

Todos os protocolos com camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UNICAMP - Campinas-SP (Número do protocolo 5957-1/2022) e estavam alinhados com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Protocolo Experimental

Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J, com 6 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica em Ciências de Animais de Laboratório (CEMIB) – Universidade de Campinas (UNICAMP). Para a primeira etapa os camundongos foram distribuídos em oito grupos experimentais durante 16 semanas: camundongos machos controle alimentados com uma ração comercial padrão para roedores ad libitum (CTL) (n = 6); camundongos machos obesos alimentados ad libitum com dieta ocidental (OB) (n = 6); camundongos machos do grupo TRA alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA (n = 6), camundongos machos TRA+EXE alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA combinado com protocolo de exercício aeróbico (n = 6); camundongos fêmeas controle alimentados com uma ração comercial padrão para roedores ad libitum (CTL) (n = 6); camundongos fêmeas obesos alimentados ad libitum com dieta ocidental (OB) (n = 6); camundongos fêmeas do grupo TRA alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA (n = 6), camundongos fêmeas TRA+EXE alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA combinado com protocolo de exercício aeróbico (n = 6). Para a segunda etapa os camundongos foram distribuídos em quatro grupos experimentais durante 16 semanas: camundongos machos controle alimentados com uma ração comercial padrão para roedores ad libitum (CTL) (n = 6); camundongos machos obesos alimentados ad libitum com dieta ocidental (OB) (n = 6); camundongos machos do grupo TRA alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA (n = 6), camundongos machos TRA+SR9009 alimentados com dieta ocidental submetidos ao TRA combinado com a administração do agonista SR9009 (n=6). O período de indução da obesidade pela dieta foi realizado nas primeiras 8 semanas do experimento, submetendo os camundongos a uma dieta ocidental, seguido do tratamento da obesidade nas 8 semanas seguintes. Os camundongos foram ajustados a um ciclo de 12h de luz:12h de escuridão e alojados em gaiolas de polietileno com livre acesso à hidratação. A dieta padrão era um pellet comercial fornecido pela Nuvilab (Quimtia, Colombo, PR, Brasil) e a composição nutricional fornecida pelo fabricante era de 23% de proteína bruta, 4% de lipídios e 5% de fibra. A dieta ocidental

era composta por uma dieta rica em gordura combinada com uma solução concentrada de sacarose para hidratação. A composição da dieta rica em gordura era de 11,55% de amido de milho, 20% de caseína, 10% de sacarose, 13,2% de amido dextrinizado, 4% de óleo de soja, 31,2% de banha, 5% de celulose, 3,5% de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 0,3% de L-cistina e 0,25% de bitartarato de colina (84), de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN39-G) (85). A composição da dieta rica em gordura foi descrita como uma porcentagem da massa (g/100 g) combinada com uma solução de alta sacarose para hidratação. A diluição da solução concentrada de sacarose foi de 42g por litro e composta por 55% de frutose e 45% de D-glicose da Synth®. Durante o protocolo experimental, os animais foram pesados semanalmente, e a ingestão de alimentos foi determinada uma vez por semana, medindo o peso dos alimentos em 24 h.

4.3 Protocolo de Alimentação com Restrição de Tempo

O tempo de Zeitgeber (ZT) 0 foi denotado como luz ligada (6h) e ZT12 como luz apagada (18h). Os camundongos dos grupos TRA e TRA+EXE foram submetidos a um protocolo de TRA. O acesso à dieta ocorreu 2h após a luz ligada (ZT2 – 8h) até 2h antes do início do ciclo escuro (ZT10 – 16h), totalizando 8h de acesso à dieta (adaptado de Hatori et al. 2012). O acesso aos alimentos foi regulado transferindo os camundongos diariamente entre gaiolas com livre acesso à dieta rica em gordura e solução rica em carboidratos e gaiolas com acesso livre apenas à água. Dessa forma, os camundongos tiveram acesso à comida por 8h e restrição alimentar de 16h diariamente apenas durante a semana; no final de semana, os camundongos tiveram acesso à comida ad libitum (Fig. 1).

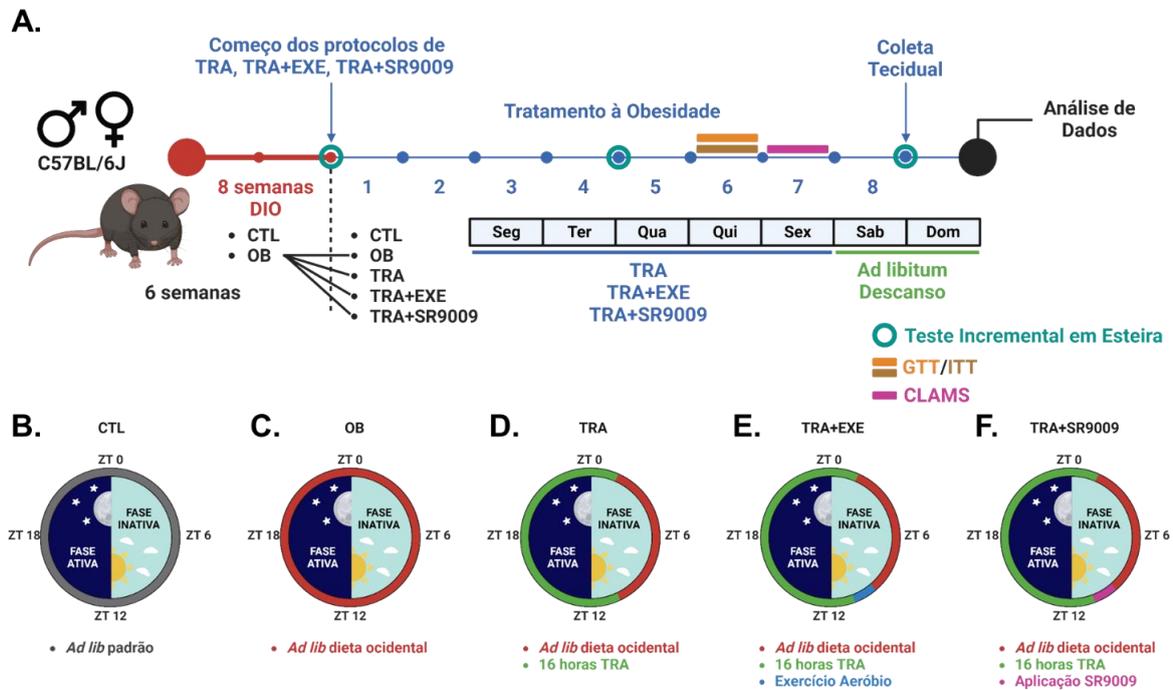


Figura 1. Desenho experimental. A, cronograma do protocolo. Nas primeiras 8 semanas do experimento, os camundongos foram divididos em grupo CTL (camundongos alimentados com dieta padrão ad libitum) e OB (camundongos alimentados com dieta ocidental ad libitum) para indução da obesidade e, na 9ª semana, os camundongos do grupo OB foram divididos em OB (OB), tempo de restrição alimentar (TRA), tempo de restrição alimentar combinado com exercício aeróbico (TRA+EXE) e tempo de restrição alimentar combinado com administração de SR9009 (TRA+SR9009) para o tratamento da obesidade nas semanas seguintes até a coleta de tecidos na 16ª semana; representações do grupo CTL (B), grupo OB (C), grupo TRA (D), grupo TRA+EXE (E) e grupo TRA+SR9009.

4.4 Teste de Carga Incremental

Após 5 dias de adaptação ao exercício aeróbico em uma esteira a 3 m/min, os camundongos do grupo TRA+EXE passaram por um teste de carga incremental. Eles começaram a correr a 6 m/min em uma esteira plana, aumentando a velocidade em 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão, definida como tocar a extremidade da esteira cinco vezes em 60 segundos. A velocidade de exaustão (EV) desse teste foi usada para ajustar a intensidade de um subsequente protocolo crônico de exercício aeróbico de 8 semanas a 60% da EV. O teste de carga incremental foi repetido ao final da 4ª e 8ª semanas para ajustar a velocidade de corrida à medida que o desempenho melhorava. Os camundongos descansaram por 24 horas entre cada sessão de treinamento. Os efeitos do exercício aeróbico foram avaliados usando um método dependente do peso corporal (massa corporal × EV), e o desempenho foi especificamente medido pela velocidade de exaustão. Nenhum efeito adverso foi observado em nenhum dos camundongos durante o teste de carga incremental (Fig. 2).

4.5 Protocolo de Treinamento de Exercício Aeróbico

O treinamento de AE durou 8 semanas, com uma intensidade de 60% da EV obtida no teste de carga incremental. Os camundongos foram submetidos a um exercício aeróbico (AE) por 5 dias da semana (de segunda a sexta-feira) após o período de alimentação e descansaram durante o fim de semana. Portanto, o treinamento de exercício aeróbico foi realizado de ZT10 (16h) a ZT11 (17h). O volume de exercício aumentou gradualmente de 30 min na primeira semana para 45 min na segunda semana, chegando a 60 min da terceira à décima semana. Nenhum resultado adverso foi observado em nenhum camundongo durante o protocolo de AE incremental.

4.6 Tratamento com agonista da Rev-erba

Os animais foram submetidos a um protocolo de administração do agonista da Rev-erba com duração de 30 dias. A administração do agonista ocorreu em dose única de segunda-sexta-feira, ao final do ciclo inativo (entre 16:00/17:00) dos animais. A administração do agonista SR9009 foi realizada via intraperitoneal em uma quantidade de 100mg/kg do animal conforme descrição prévia (30). Após 24 horas da última administração os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para as análises moleculares.

4.7 Consumo de Oxigênio, Relação de Troca Respiratória e Produção de Calor

Entre a 6^a e a 7^a semanas do experimento, os camundongos foram submetidos ao Sistema de Monitoramento Abrangente de Animais de Laboratório (CLAMS-Oxymax) (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA). Antes da análise, os camundongos foram adaptados ao equipamento por 24h em gaiolas individuais. No dia da análise experimental, o grupo TRA+EXE treinou entre ZT11 e ZT12, e as análises começaram em ZT12. Durante o experimento, os camundongos foram mantidos em gaiolas separadas em um ciclo de temperatura controlada. O consumo de oxigênio (VO₂), o consumo de dióxido de carbono (VCO₂), a relação de troca respiratória (RER) e o gasto energético (EE) foram analisados ao longo de 24h. O valor de EE foi calculado como $(3.815 + 1.232 \times RER) \times VO_2$ (27). A aquisição de dados ocorreu 6 vezes por hora, durante as 24 h. Ao final do experimento, os dados foram plotados no Microsoft Excel 2016 e agrupados a cada hora.

4.8 Testes de Tolerância à Glicose e Insulina Intraperitoneais (ipGTT e ipITT)

Após 8 horas de jejum e 24 horas após a última sessão de exercício aeróbico, amostras de sangue foram coletadas das caudas dos camundongos para dosagem basal de glicose (ponto de tempo zero). Em seguida, uma solução de glicose a 50% (2g/Kg de peso

corporal) foi aplicada intraperitonealmente (IP), com amostras de sangue sendo coletadas nos tempos de 30, 60 e 120 minutos para dosagem de glicose no sangue (Accu-Check Active /Roche, Suíça). Para o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT), a insulina humana recombinante (Humulin R) da Eli Lilly (Indianapolis, IN, EUA) foi aplicada a uma concentração de 1,5U/kg de peso corporal via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para medição de glicose no sangue (Accu-Check Active®/Roche, Suíça). Para esses testes, as amostras de sangue foram coletadas após um corte na cauda (usando tesouras cirúrgicas), com sangramento reprimido entre os pontos de tempo usando uma bandagem de compressão (Johnson and Johnson, São Paulo, SP, Brasil). Após o teste, os camundongos foram monitorados por até 3h.

4.9 Análise Bioquímica do Sangue

Os marcadores bioquímicos de colesterol total e triglicerídeos foram analisados usando kits comerciais Laborlab (São Paulo, SP, Brasil) no soro e no fígado de camundongos submetidos à coleta de tecido após decapitação (24h após a última sessão de exercício aeróbico e 4h de jejum). Os ácidos graxos não esterificados foram medidos usando o ensaio NEFA-HR da Wako HR series (Fujifilm).

4.10 Extração do Fígado, Homogeneização e Determinação do Teor Total de Proteínas

Após 24h da última sessão de exercício aeróbico e 4h de jejum, os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (90 mg kg⁻¹; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI, EUA) e xilazina (10 mg kg⁻¹; Rompun; Bayer, Leverkusen, Alemanha) e em seguida foram decapitados, e o fígado foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido para armazenamento a -80°C. Subsequentemente, o tecido foi homogeneizado em um buffer de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vandato de sódio, 2 mM fluorofosfato de fenilmetila e 0.1 mg/ml de aprotinina) a 4°C com um Homogeneizador Bead Ruptor 12 OMNI (Omni International, Kennesaw, GA, EUA) operado na velocidade máxima por 60s. Os lisados foram centrifugados em Eppendorf 5804R (Hamburg, Alemanha) a 12.851 g a 4°C por 15 min para remover material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio. O teor de proteína foi determinado usando o método de ácido bicinonínico. Os tecidos adiposos brancos, perigonadal, retroperitoneal, mesentérico e inguinal foram coletados e pesados.

4.11 Análise de Western Blotting

Após a determinação do teor total de proteínas, o tampão de Laemmli contendo 100 mm de ditiotreitol foi adicionado ao sobrenadante, e as amostras foram aquecidas por 5–10 min (Laemmli, 1970). Em seguida, amostras com quantidades iguais de proteínas (40 µg) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida para separação por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. A coloração de Ponceau foi aplicada para verificar a transferência da membrana. Os blots foram bloqueados com 5% de leite em pó à temperatura ambiente por 1h e, em seguida, incubados durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: FAS (#3189S) e β-actina (#3700S) da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). As membranas foram então incubadas por 1h com os anticorpos secundários específicos. As bandas específicas foram visualizadas por quimioluminescência e quantificadas por suas áreas usando densitometria óptica com o software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Inc. Orem, UT, EUA).

4.12 Extração de RNA e RT-qPCR

O tecido hepático foi homogeneizado em 400 µl de Trizol (Thermo Fisher Scientific), 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 Alta Capacidade (Thermo Fisher Scientific). As amostras de cDNA foram submetidas a uma reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando 300 ng de cDNA e 0,3 µm de primers para *Fasn*, *Srebp1c*, *Cd36*, *Fatp4*, *Nfkb*, *Tnfα*, *Tlr4* e *Il1β*, com *Gapdh* como controle endógeno (Tabela 1), sintetizados pela Exxtend (Paulínia, SP, Brasil), e iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os dados foram avaliados usando o software StepOne (Thermo Fisher Scientific), calculando $\Delta\Delta Ct$.

Tabela 1. Sequências dos primers usados para a técnica de RT-qPCR

Gene	Forward	Reverse
<i>Fasn</i>	5'-GAGGAACTCAAGTGGCTGA-3'	5'-GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT-3'
<i>Srebp1c</i>	5'-GAGGAACTCAAGTGGCTGA-3'	5'-GGGAAGTCACTGTCTTGGTTGTT-3'
<i>Cd36</i>	5'-TGGAGCTGTTATTGGTGCA-3'	5'-TGGGTTTTGCACATCAAAGA-3'
<i>Fatp4</i>	5'-GACTTCTCCAGCCGTTCCACA-3'	5'-CAAAGGACAGGATGCCGGCTATTG-3'
<i>Nfkb</i>	5'-GATTCCGGGCAGTGACG-3'	5'-GATGAGGGGAAACAGATCGTCC-3'
<i>Tnfα</i>	5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3'
<i>Tlr4</i>	5'-GTTCTCTCATGGCCTCCACT-3'	5'-GGAACACTCTATGCAGGGAT-3'
<i>Il1β</i>	5'-TGGACCTCCAGGATGAGGACA-3'	5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'

4.13 Análise Histológica

O tecido hepático foi extraído e criopreservado em isopentano pré-resfriado a -80°C. Finas fatias (10µm) do fígado foram cortadas usando um criostato Leica (CM1850, Heidelberg, Alemanha) e montadas em lâminas de adesão. As lâminas foram coradas com solução de Óleo Vermelho O (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 30 min e hematoxilina por 1 min, em seguida, lavadas e seladas com uma solução de gelatina-glicerina. As imagens foram capturadas usando o software Leica Application Suite. O Escore de Atividade DHEM foi avaliado de forma duplo-cega para avaliar os danos hepáticos induzidos pela dieta. A esteatose foi classificada de 0 a 3 com base na porcentagem de tecido afetado, o balonamento hepatocelular de 0 a 2 com base no número de hepatócitos balonados e a inflamação lobular de 0 a 3 com base no número de focos inflamatórios. Todos esses parâmetros contribuíram para um Escore de Atividade DHEM total (86,87), com um perfil esteatogênico avaliado a 400x de ampliação. A inflamação foi caracterizada pela presença de pelo menos cinco células inflamatórias não dispostas em linha em dez campos (88).

4.14 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), e o teste de Shapiro-Wilk W analisou a normalidade dos dados. Uma Análise de Variância (ANOVA) de uma via foi adotada para os dados com distribuição normal, seguida do teste de Tukey. A análise de variância (ANOVA) de duas vias foi utilizada quando os grupos foram comparados em momentos diferentes, seguida do teste de Tukey. A significância estatística adotada foi $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 8.0® foi utilizado para a análise estatística e elaboração de gráficos.

5 Resultados

O treinamento de exercício aeróbico melhora o desempenho em camundongos machos e fêmeas.

O desempenho físico foi avaliado por meio do teste de carga incremental realizado na 8ª, 12ª e 16ª semanas nos grupos TRA+EXE. Os dados mostram que tanto os camundongos machos quanto fêmeas obtiveram um aumento significativo na velocidade de exaustão e na potência do último teste em comparação ao teste inicial. Dessa forma, demonstrando que o exercício aeróbico foi eficiente para melhorar o desempenho aeróbico em ambos os sexos. Além disso, foi identificada uma diferença significativa

entre os últimos testes ao comparar camundongos machos e fêmeas (Fig. 2A e B).

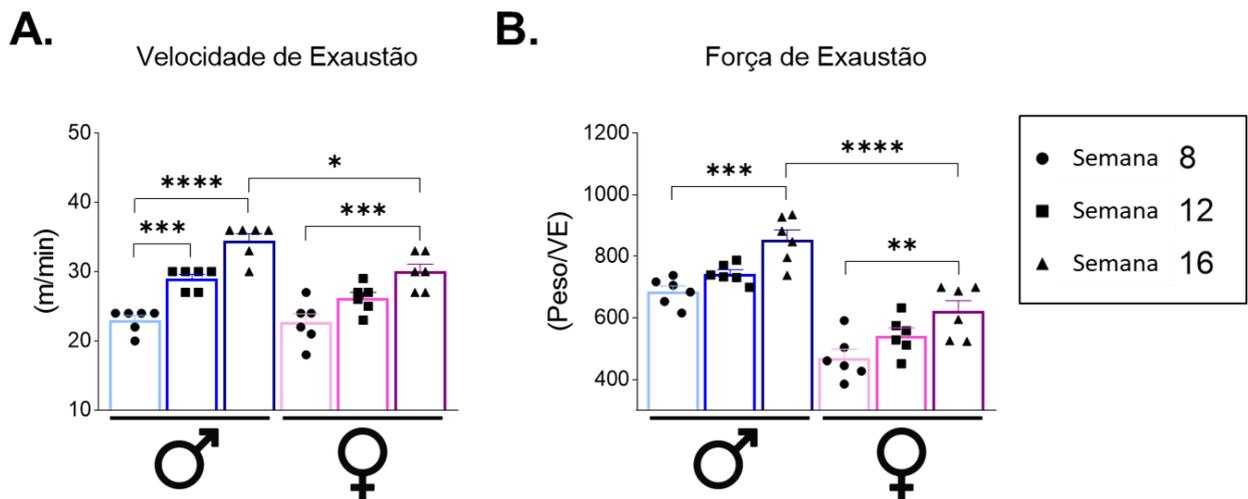


Figura 2. O treinamento de exercício aeróbico melhorou o desempenho em camundongos machos e fêmeas. A, velocidade de exaustão dos três testes realizados durante o protocolo de exercício aeróbico. B, potência de exaustão dos três testes realizados durante o protocolo de exercício aeróbico. As barras representam a média e o erro padrão do 1º, 2º e 3º testes (n=6). * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

TRA e TRA combinado com exercício aeróbico reduzem o peso corporal e a adiposidade em camundongos machos e fêmeas.

Após 8 semanas de indução à obesidade, os camundongos foram submetidos a 8 semanas de TRA e TRA+EXE. Assim, foi identificado que o grupo OB apresentou um aumento da evolução do peso corporal e o ganho de peso em comparação ao CTL. Adicionalmente, observou-se uma diferença significativa nos grupos TRA e TRA+EXE apenas em camundongos machos (Fig. 3A, B, G, H). A ingestão de alimentos cumulativa mostrou um aumento nos camundongos do grupo OB em comparação ao CTL, mas TRA e TRA+EXE demonstraram uma redução da ingestão de alimentos em relação ao grupo OB em camundongos machos e fêmeas. Além disso, TRA+EXE diminuiu a ingestão de alimentos em comparação ao grupo TRA apenas em camundongos machos (Fig. 3C e I). Corroborando com esses achados, o Índice de Lee foi elevado no grupo OB em comparação ao CTL. TRA e TRA+EXE foram eficientes para reduzir esse parâmetro quando comparados ao grupo OB, independentemente do sexo (Fig. 3D e J). Em relação à gordura corporal, o grupo OB apresentou um aumento no conteúdo de gordura visceral e total em relação ao grupo CTL. Por outro lado, TRA e TRA+EXE reduziram o tecido adiposo visceral tanto em machos quanto em fêmeas. Contudo, TRA e TRA+EXE reduziram a gordura total em camundongos fêmeas, enquanto em machos apenas TRA+EXE mostrou ser eficaz (Fig. 3E, F, K, L).

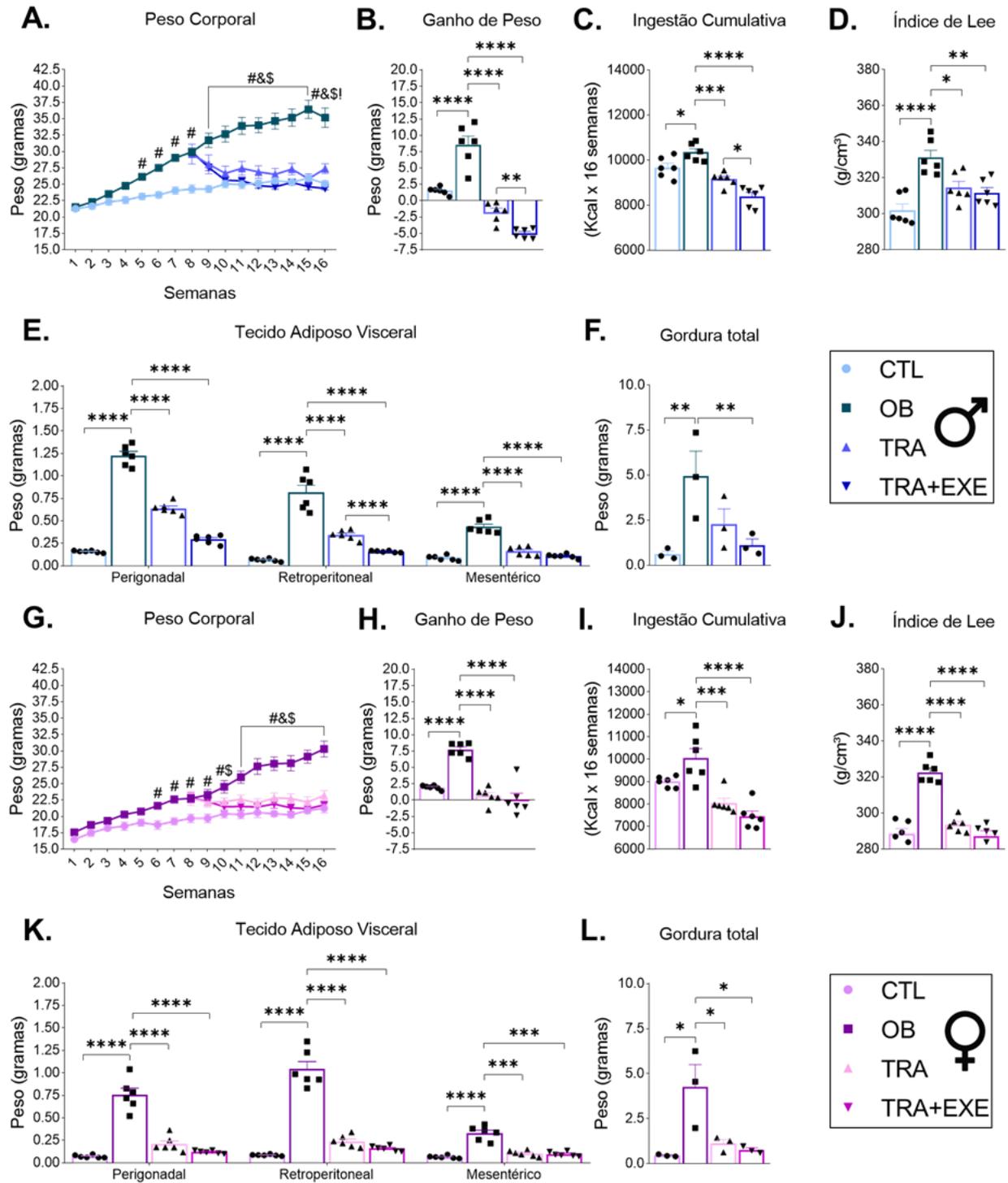


Figura 3. Tempo de restrição alimentar (TRA) e TRA combinado com exercício aeróbico reduzem o ganho de peso e melhoram a composição corporal em camundongos machos e fêmeas. A e G, peso corporal (n=6). B e H, ganho de peso (n=6). C e I, ingestão cumulativa (n=6). D e J, Índice de Lee (n=6). E e K, tecido adiposo visceral (n=6). F e L, gordura total (n=3). As barras representam a média e o erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+EXE; ! para TRA vs TRA+EXE.

TRA e TRA combinado com exercício aeróbico melhoram a homeostase glicêmica e marcadores lipídicos no soro de camundongos machos e fêmeas, enquanto a sensibilidade à insulina apenas em machos.

Na 6ª semana do tratamento da obesidade, GTT e ITT foram realizados para verificar a homeostase da glicose. No teste GTT, o grupo OB demonstrou um aumento significativo na curva glicêmica após a injeção de glicose em comparação ao CTL. Tanto em machos quanto em fêmeas, TRA e TRA+EXE demonstraram ser eficientes em manter a curva glicêmica mais baixa do que o grupo OB (Fig. 4A e H). A área sob a curva do GTT confirma o mesmo resultado (Fig. 4B e I). Além disso, a glicose em jejum no grupo OB mostrou estar mais alta quando comparada ao CTL, e os grupos TRA e TRA+EXE também foram preservados desses distúrbios metabólicos induzidos pela exposição a uma dieta rica em gorduras e solução de carboidratos (Fig. 4C e J). No teste ITT, o grupo OB apresentou uma curva glicêmica mais alta durante todo o teste em camundongos machos, mas nas fêmeas apenas os primeiros 3 pontos (0, 10 e 25 min) foram mais altos quando comparados ao CTL. Mesmo assim, TRA e TRA+EXE demonstraram níveis mais baixos na curva glicêmica em relação ao grupo OB em camundongos machos. Mas, para camundongos fêmeas, TRA e TRA+EXE mostraram níveis mais baixos em relação ao OB apenas nos primeiros 3 pontos. A área sob a curva corrobora esses achados, nos quais TRA e TRA+EXE foram eficientes para reduzir os valores mesmo quando os camundongos machos foram submetidos a dieta ocidental por 8 semanas. Por outro lado, TRA e TRA+EXE não foram eficientes para reduzir os valores da AUC ITT quando comparados ao grupo OB (Fig. 4E, F, L, M). Após a coleta de tecidos, o soro foi coletado para a análise de colesterol e ácidos graxos não esterificados. Assim, o grupo OB apresentou níveis mais altos de colesterol e NEFA devido aos efeitos negativos da dieta ocidental em camundongos machos e fêmeas. Mas novamente, TRA e TRA+EXE demonstraram ser eficientes para reduzir esses níveis quando comparados ao grupo OB em ambos os sexos (Fig. 4D, G, K, N). Dessa forma, indicando que a dieta ocidental por 8 semanas foi eficiente para causar um comprometimento na homeostase da glicose e disfunções metabólicas no metabolismo lipídico em camundongos submetidos a uma dieta ocidental, mas TRA e TRA quando combinados com exercício aeróbico foram estratégias eficientes para restaurar a homeostase da glicose e o metabolismo lipídico em camundongos machos e fêmeas. Embora TRA e TRA combinado com exercício aeróbico tenham sido eficientes para restaurar a sensibilidade à insulina apenas em camundongos machos.

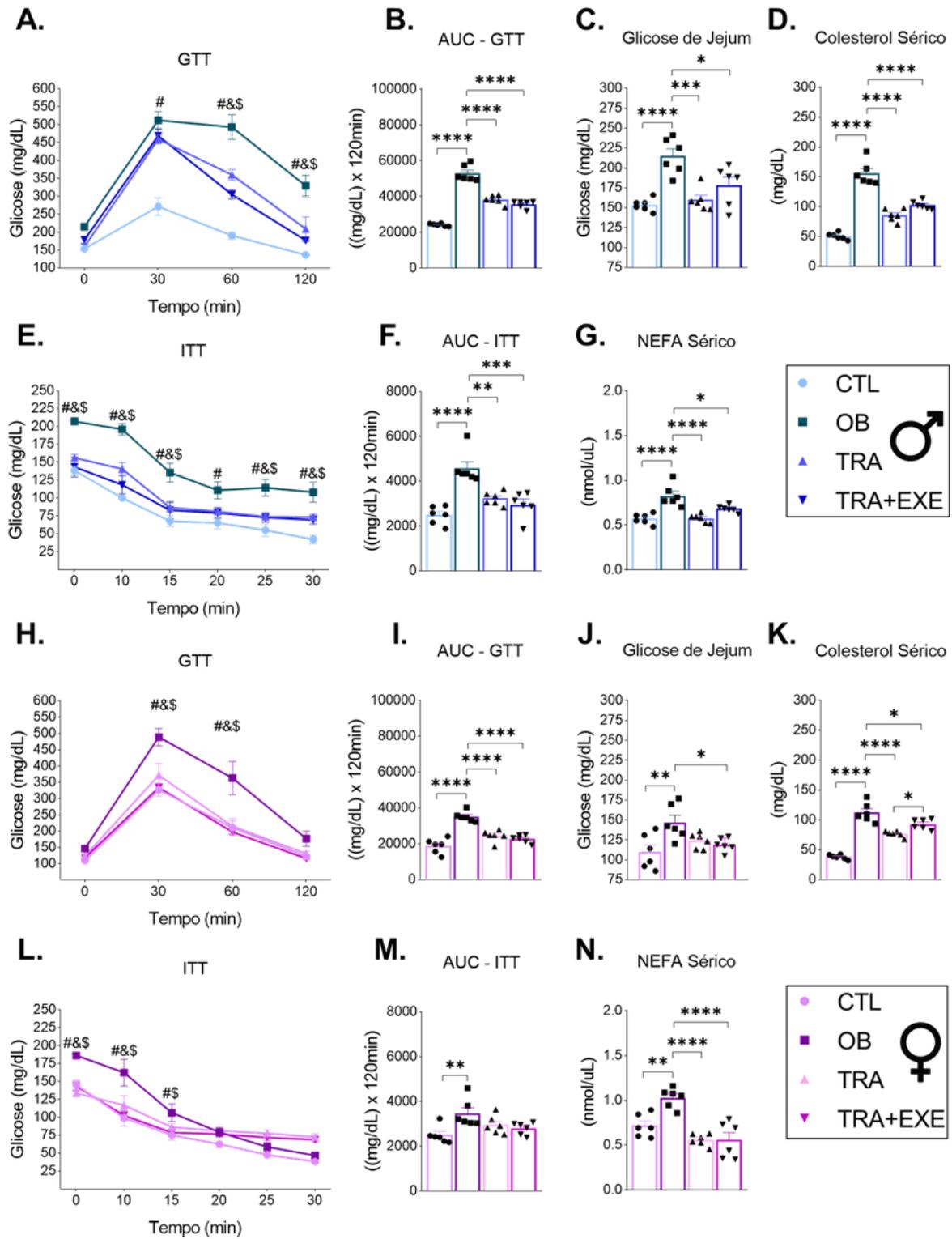


Figura 4. Efeitos do TRA e TRA combinado com exercício aeróbico na homeostase glicêmica e marcadores lipídicos em camundongos machos e fêmeas. A e H, teste de tolerância à glicose (n=6). B e I, área sob a curva do GTT (n=6). C e J, glicose em jejum (n=6). D e K, colesterol sérico (n=6). E e L, teste de tolerância à insulina (n=6). F e M, área sob a curva para o ITT (n=6). G e N, NEFA sérico (n=6). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+EXE; ! para TRA vs TRA+EXE.

TRA e TRA combinado com exercício aeróbico reduzem o acúmulo de gordura hepática e melhoram o metabolismo lipídico em camundongos machos e fêmeas.

Para análise histológica, foi identificado um acúmulo significativo de gordura no grupo OB em comparação ao grupo CTL tanto em camundongos machos quanto fêmeas. Em contraste, TRF e TRF+EXE levaram a uma redução significativa no acúmulo de gordura hepática em comparação ao grupo OB em ambos os sexos (Fig. 5A e E). Esses achados estão alinhados com o escore DHEM, colesterol hepático e triglicerídeos (TG), que estavam elevados no grupo OB em comparação ao grupo CTL. No entanto, TRF e TRF+EXE reduziram efetivamente o escore DHEM, o colesterol hepático e os níveis de TG em relação ao grupo OB em ambos os sexos. Além disso, o TRF + EXE foi mais eficaz que o TRF sozinho na redução dos níveis de TG no fígado, mas esse efeito foi observado apenas em camundongos machos (Fig. 5B, C, D, F, G e H).

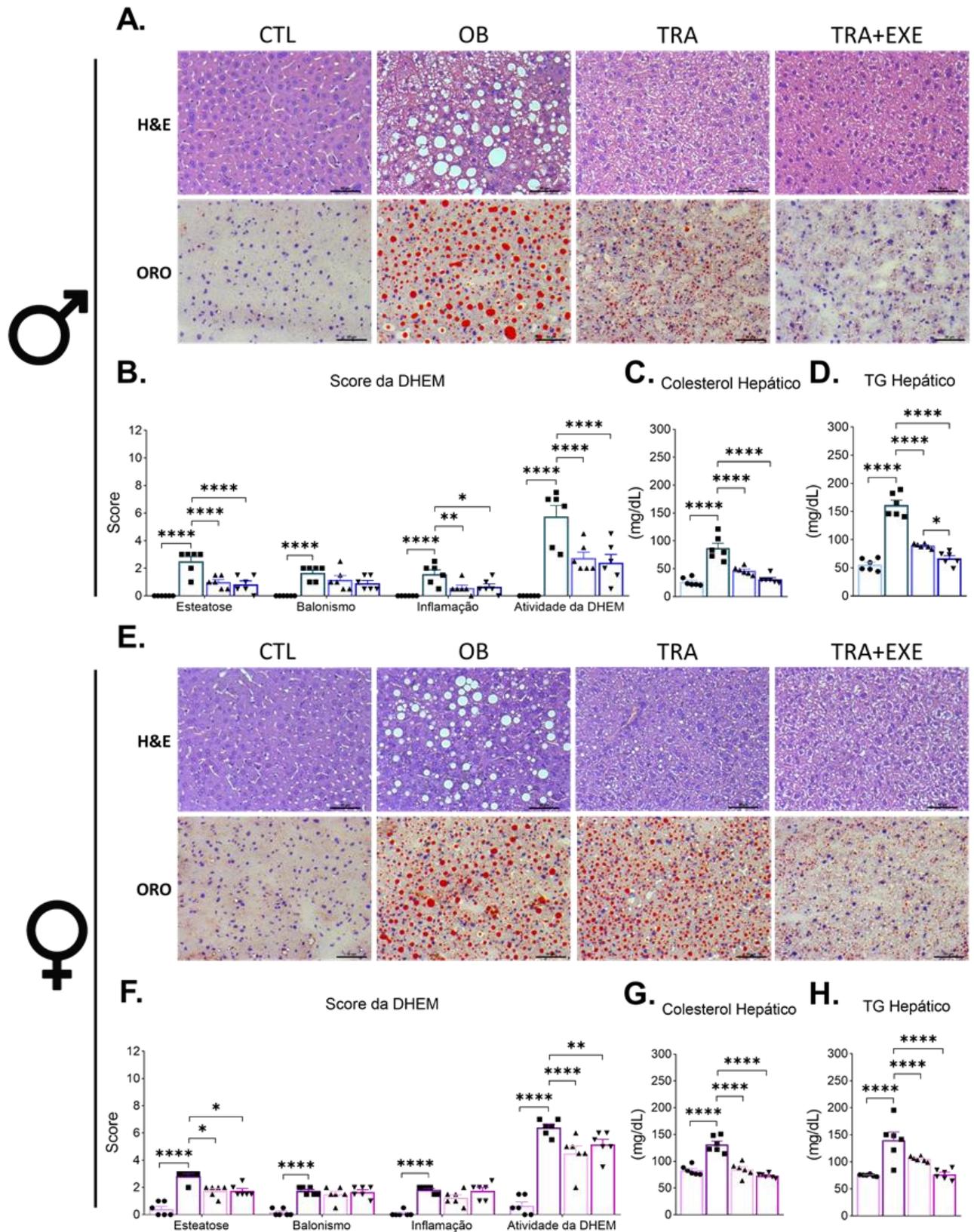


Figura 5. A TRA e a TRA combinada com exercício aeróbico melhoram o acúmulo de gordura hepática em camundongos machos e fêmeas. A e F, coloração H&E e ORO do fígado. B e F, escore da DHEM (n=6). C e G, colesterol hepático (n=6). D e H, triglicerídeo hepático (n=6). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; * p<0,001; **** p<0,0001.**

TRA e TRA combinado com exercício aeróbico alteram a expressão de genes lipogênicos e inflamatórios e a expressão de proteínas lipogênicas no fígado de camundongos machos e fêmeas.

Em nível molecular, a expressão gênica de genes lipogênicos (*Fasn*, *Srebp1*, *Cd36* e *Fatp4*) e genes inflamatórios (*Nfkb*, *Tnfa*, *Tlr4* e *Il1 β*) foi realizada. A expressão de *Fasn* foi elevada no grupo OB quando comparado ao CTL de ambos os sexos, mas TRA e TRA+EXE foram eficazes para reduzir apenas em camundongos machos. Assim, *Srebp1* demonstrou ser maior no grupo OB de ambos os sexos, e desta vez TRA e TRA+EXE demonstraram uma redução importante desse marcador lipogênico em machos e fêmeas. A expressão de *Cd36* mostrou um aumento maior no grupo OB quando comparado ao CTL, mas apenas em camundongos machos TRA e TRA+EXE demonstraram uma redução em comparação ao CTL. Em relação à expressão de *Fatp4*, não foram identificadas diferenças em ambos os grupos OB em comparação ao CTL. Novamente, TRA e TRA+EXE foram eficientes para reduzir sua expressão quando comparados ao OB em camundongos machos, mas não em fêmeas. Além disso, TRA+EXE demonstrou ser mais eficiente em comparação ao TRA isolado em camundongos machos. Curiosamente, TRA mostrou um aumento da expressão de *Fatp4* em relação ao grupo OB em camundongos fêmeas, mas o grupo TRA+EXE foi protegido desse efeito (Fig. 6A e G).

Para os marcadores inflamatórios, *Nfkb* mostrou um aumento no grupo OB quando comparado ao CTL apenas em camundongos fêmeas. Por outro lado, foi regulado negativamente nos grupos TRA e TRA+EXE em relação ao OB exclusivamente em machos. Ambos os grupos OB demonstraram níveis mais altos de *Tnfa* quando comparados ao controle, mas TRA e TRA+EXE demonstraram níveis mais baixos apenas em camundongos machos. A expressão de *Tlr4* foi maior no fígado do grupo OB de camundongos machos, e TRA foi eficiente para reduzir sua expressão em machos e fêmeas. No entanto, TRA+EXE foi eficiente para reduzir sua expressão em camundongos machos. A expressão de *Il1 β* foi elevada nos camundongos machos OB em relação ao CTL, mas TRA em ambos os sexos foi uma estratégia eficiente para diminuir seus níveis. No entanto, TRA+EXE demonstrou ser eficiente apenas em camundongos machos quando comparado ao OB (Fig. 6D e J).

Para confirmar esses parâmetros, realizamos a técnica de Western blot para avaliar a expressão de proteína de um marcador lipogênico, FAS. Assim, foi identificado que o conteúdo de FAS estava elevado no grupo OB de ambos os sexos quando comparado ao CTL. Embora, TRA tenha mostrado ser eficaz para reduzir seu conteúdo

em ambos os machos e fêmeas. Curiosamente, TRA+EXE foi uma estratégia potente para reduzir o conteúdo de FAS apenas em camundongos machos (Fig. 6B, C, E, F, H, I, K, L).

Esses dados corroboram com os painéis de histologia, nos quais os camundongos machos mostraram uma maior redução de gordura nos grupos TRA e TRA+EXE observada nas colorações H&E e Oil Red em comparação às fêmeas. Esse efeito pode ser explicado pela maior redução da expressão de genes lipogênicos e inflamatórios e da expressão de proteínas lipogênicas através das intervenções TRA e TRA combinadas com exercício aeróbico em camundongos machos quando comparados às fêmeas. Assim, apresentando adaptações diferentes entre os sexos.

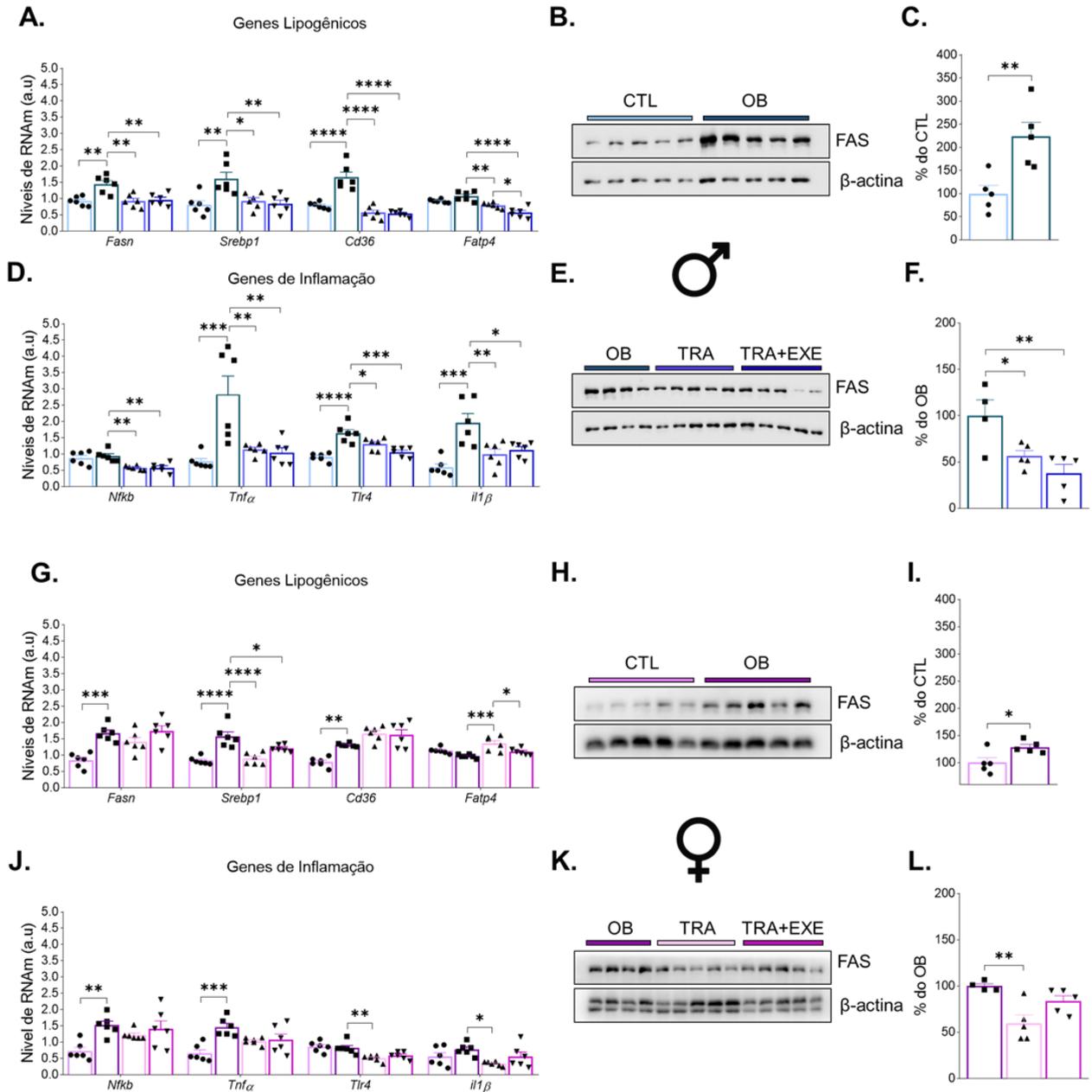


Figura 6. A TRA e a TRA combinada com exercício aeróbico melhoram o metabolismo lipídico hepático e a inflamação em camundongos machos e fêmeas. A, G, Genes lipogênicos no tecido hepático (n=6). B, C, E, F, H, I, K, L, Conteúdo total de proteína FAS nos no tecido hepático para CTL (n=5) vs OB (n=5) e OB (n=4) vs TRA (n=5) vs TRA+EXE (n=5). D, J, Genes de inflamação no tecido hepático (n=6). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

TRA combinado com exercício aeróbico melhora o RER apenas em camundongos machos.

Na sétima semana do protocolo de tratamento, os camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas para avaliação de VO₂, CO₂ e RER. De acordo com os dados, nenhuma diferença foi observada no gráfico de VO₂ para tanto machos quanto fêmeas

(Fig. 7A-D). Para a análise de CO₂, foi identificada uma redução da produção no grupo OB em comparação ao CTL em ambos os ciclos, mas um aumento na intervenção TRA+EXE em relação ao OB no ciclo claro em camundongos machos (Fig. 7E e F). Para camundongos fêmeas, apenas foi identificada uma redução da produção de CO₂ no grupo TRA em relação ao OB (Fig. 7G e H). Portanto, o RER apresentou uma redução em ambos os ciclos no grupo OB quando comparado ao CTL para machos e fêmeas. Da mesma forma, TRA e TRA+EXE aumentaram o RER em comparação ao grupo OB no ciclo claro de camundongos machos, mas nas fêmeas essa diferença foi observada apenas no grupo TRA+EXE. Além disso, TRA+EXE demonstrou uma redução em relação ao grupo TRA em camundongos machos. Além disso, no ciclo escuro foi identificada uma redução de RER no grupo TRA+EXE quando comparado ao OB e TRA em camundongos machos, mas nas fêmeas tanto TRA quanto TRA+EXE foram eficazes para reduzir o RER quando comparados ao grupo OB (Fig. 7I-L).

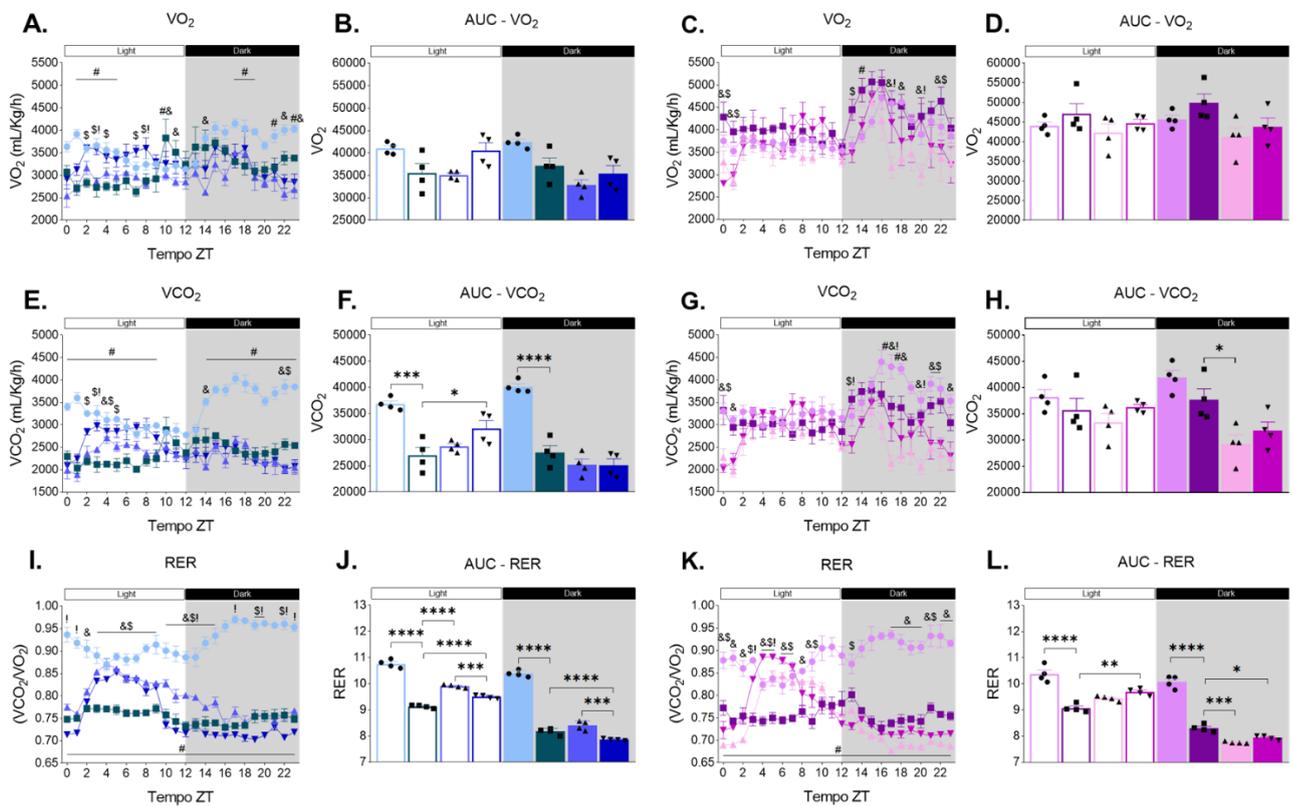


Figura 7. Efeitos da TRA e TRA combinada com exercício aeróbico no consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e razão de troca respiratória. A e C, consumo de VO₂ por 24h (n=4). B e D, área sob a curva de VO₂ durante o ciclo claro e escuro (n=4). E e G, produção de VCO₂ por 24h (n=4). F e H, área sob a curva de VCO₂ durante o ciclo claro e escuro (n=4). I e K, razão de troca respiratória por 24h (n=4). J e L, área sob a curva da razão de troca respiratória durante o ciclo claro e escuro (n=4). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+EXE; ! para TRA vs TRA+EXE.

TRA e TRA combinado com SR9009 reduzem o peso corporal e a adiposidade em camundongos machos.

Após 8 semanas de indução à obesidade, foi identificado houve um aumento do peso corporal, ganho de peso e o índice de Lee em camundongos alimentados com uma dieta ocidental em comparação ao CTL. Porém, observou-se uma redução significativa nos grupos TRA e TRA+SR9009 em todos estes parâmetros (Fig. 8A, B, C). Além disso, o grupo OB apresentou um maior conteúdo de gordura visceral e gordura total em comparação ao CTL. Já o TRA e TRA+SR9009 foram eficientes para reduzir a gordura visceral e conseqüentemente a gordura total (Fig. 8D e E).

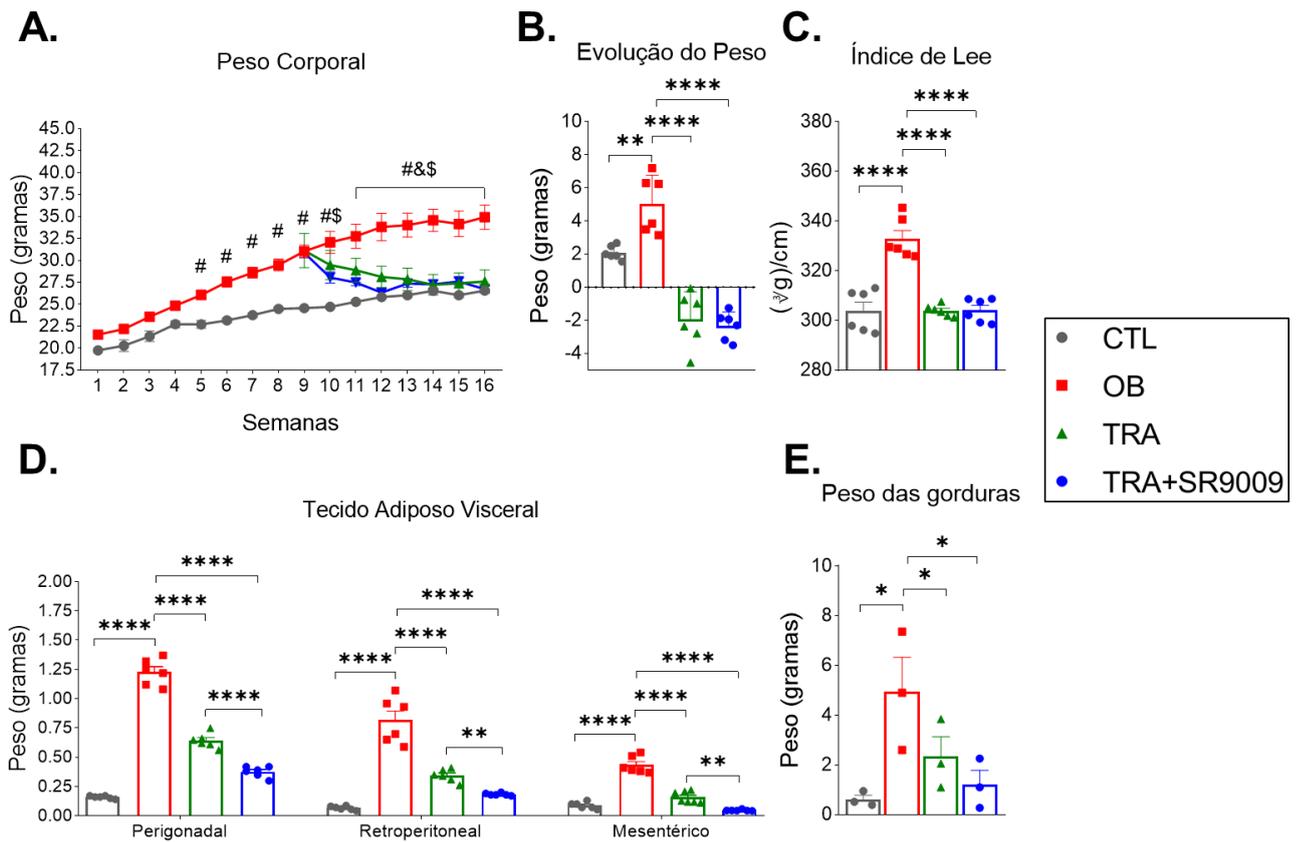


Figura 8. Tempo de restrição alimentar (TRA) e TRA combinado com SR9009 reduzem o ganho de peso e melhoram a composição corporal em camundongos machos. A, peso corporal (n=6). B, evolução do peso (n=6). C, Índice de Lee (n=6). D, tecido adiposo visceral (n=6). E, peso das gorduras (n=3). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+SR9009.

TRA combinado com SR9009 é mais eficiente do que TRA isolado para controle da homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina.

Na 6ª semana do tratamento da obesidade, GTT e ITT foram realizados para verificar a homeostase glicêmica. No teste GTT, o grupo OB demonstrou um aumento significativo na curva glicêmica após a injeção de glicose em comparação ao CTL. O TRA e TRA+SR9009 demonstraram ser estratégias eficientes em manter a curva glicêmica mais baixa do que o grupo OB, assim como a área sobre a curva apresentou-se reduzida nestes grupos (Fig. 9A e B). Em relação à glicose em jejum, o grupo OB demonstrou valores mais elevados quando comparado ao CTL, e os grupos TRA e TRA+SR9009 demonstraram valores reduzidos mesmo sendo expostos por uma dieta ocidental. Além disto, o TRA+SR9009 demonstrou maior capacidade em reduzir os valores da glicemia de jejum em relação ao TRA isoladamente (Fig. 9C). Como esperado, no teste ITT, o grupo OB apresentou uma curva glicêmica mais elevada durante todo o teste em relação CTL. Mesmo assim, TRA e TRA+SR9009 demonstraram níveis mais baixos na curva glicêmica em relação ao grupo OB e o TRA+SR9009 apresentando valores mais reduzidos em todo o teste em comparação ao grupo TRA, demonstrando uma melhora da sensibilidade à insulina do que o TRA isoladamente. Tais dados também estão de acordo com a pela área sobre a curva do ITT (Fig. 9D e E).

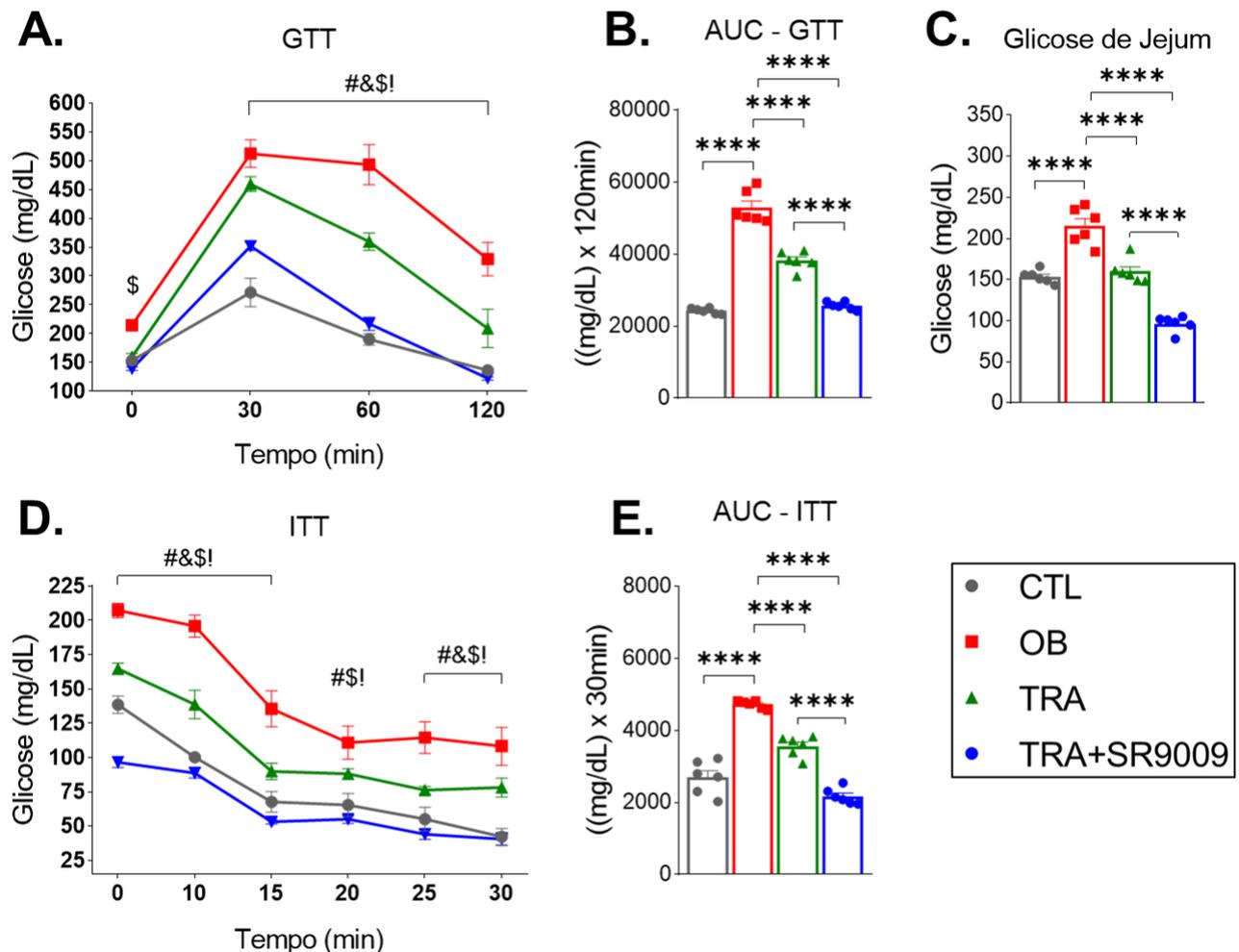


Figura 9. Efeitos da TRA e TRA combinado com SR9009 na homeostase glicêmica e marcadores lipídicos de camundongos machos. A, teste de tolerância à glicose (n=6). B, área sob a curva do GTT (n=6). C, glicose em jejum (n=6). D, teste de tolerância à insulina (n=6). E, área sob a curva do ITT (n=6). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+SR9009; ! para TRA vs TRA+SR9009.

TRA e TRA combinado com SR9009 reduzem o acúmulo de gordura hepática e melhoram o metabolismo lipídico em camundongos machos.

Em relação à análise histológica, a coloração de H&E foi realizada para avaliar o acúmulo de lipídios no tecido hepático. De acordo com a microscopia realizada, o grupo OB demonstrou um grande acúmulo de gordura quando comparado ao grupo CTL. Porém, tanto o TRA quanto o TRA+SR9009 foram eficientes em reduzir este acúmulo de gordura hepático quando comparados ao grupo OB (Fig. 10A). O acúmulo de gordura excessivo no grupo OB também resultou em alterações moleculares. Como identificado nos genes lipogênicos *Srebp1* e *Fatp4*, o grupo OB apresentou uma elevada expressão dos mesmos, no entanto, as estratégias de TRA e TRA+SR9009 foram eficientes em

reduzir a expressão de tais genes (Fig.10B). Além do mais, os marcadores bioquímicos de colesterol e NEFA séricos apresentaram um aumento no grupo OB mas uma redução importante dos valores nos grupos TRA e TRA+SR9009. Em adição, o TRA+SR9009 foi mais eficiente em reduzir os valores de colesterol sérico em comparação ao grupo TRA.

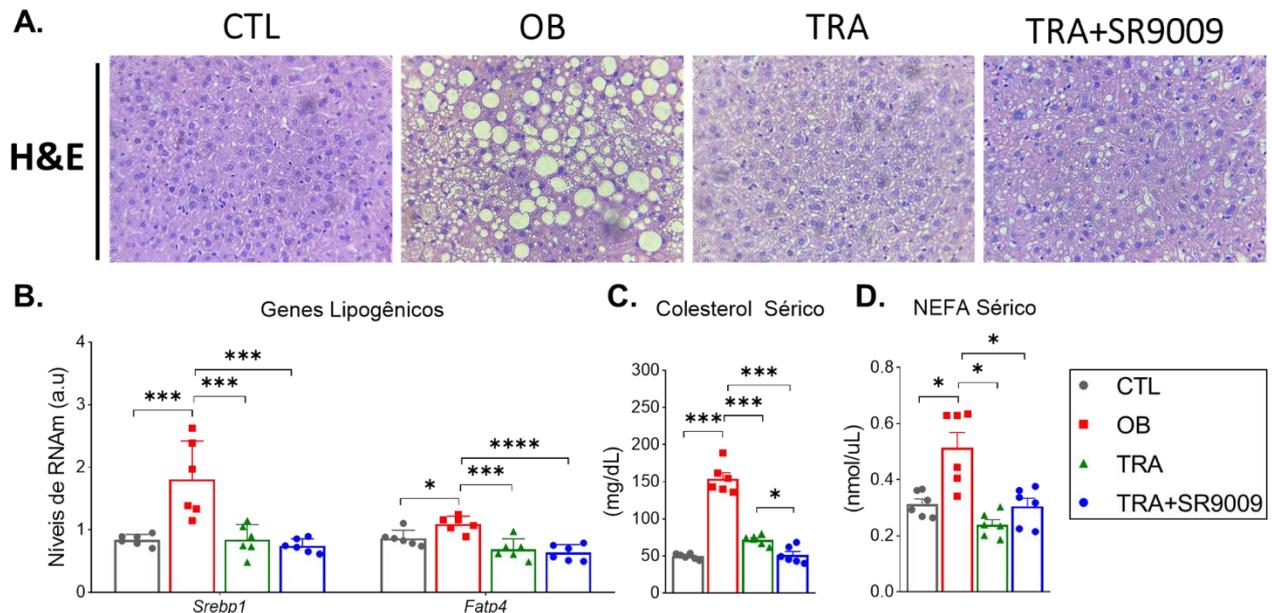


Figura 10. A TRA e a TRA combinado com SR9009 melhoram o acúmulo de gordura hepática em camundongos machos. A, coloração H&E no tecido hepático. B, genes lipogênicos no tecido hepático (n=6). C, colesterol sérico (n=6). D, NEFA sérico (n=6). As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+SR9009.

TRA e TRA combinado com SR9009 aumentam o RER em camundongos machos submetidos à uma dieta ocidental.

Na sétima semana do protocolo de tratamento, os camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas para avaliação de VO₂, CO₂ e RER. No gráfico de VO₂ foi observado uma redução no grupo OB em relação ao CTL em ambos os ciclos (Fig. 11A e B). Para a análise de CO₂, também foi identificada uma redução da produção no grupo OB em comparação ao CTL em ambos os ciclos, porém um aumento no grupo TRA+SR9009 em relação ao OB no ciclo claro em (Fig. 11C e D). Já em relação ao RER, novamente foi observado uma redução no grupo OB quando relacionado ao CTL. No entanto o TRA e TRA+SR9009 apresentaram valores mais elevados do RER do que o grupo OB no ciclo claro, e no ciclo escuro somente o grupo TRA+SR9009 demonstrou valores superiores. Em concordância a estes dados, o gráfico total do RER também demonstra valores reduzidos no grupo OB e um aumento nos grupos TRA e TRA+SR9009. Todavia, sem nenhuma diferença significativa entre os grupos TRA e

TRA+SR9009.

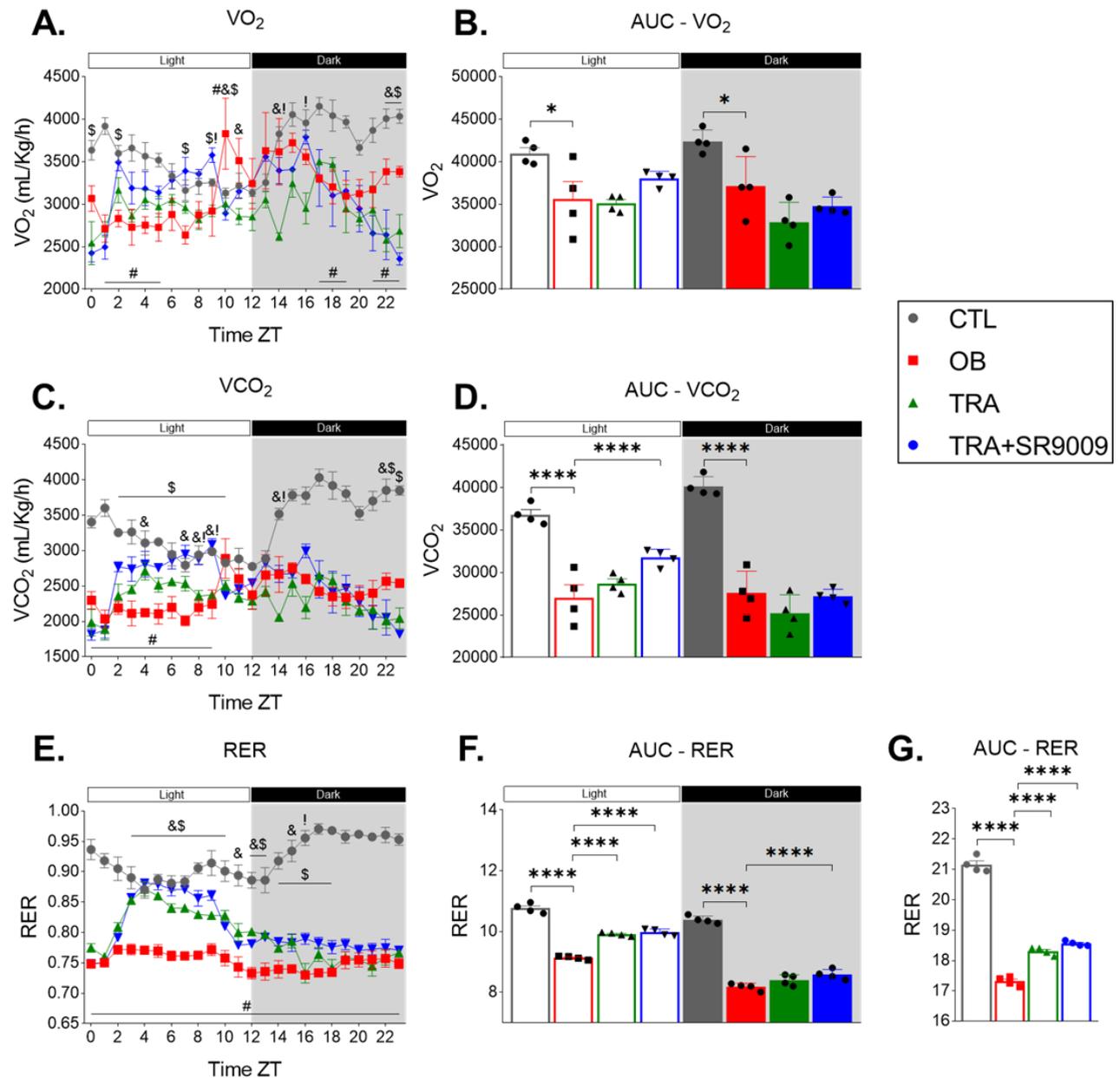


Figura 11. Efeitos do TRA e TRA combinado com SR9009 no consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e razão de troca respiratória. A, consumo de VO₂ por 24h (n=4). B, área sob a curva de VO₂ durante o ciclo claro e escuro (n=4). C, produção de VCO₂ por 24h (n=4). D, área sob a curva de VCO₂ durante o ciclo claro e escuro (n=4). E, razão de troca respiratória por 24h (n=4). F, área sob a curva da razão de troca respiratória durante o ciclo claro e escuro (n=4). G, área sobre a curva total da razão de troca respiratória. As barras representam a média e o erro padrão. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. # para CTL vs OB; & para OB vs TRA; \$ para OB vs TRA+SR9009; ! para TRA vs TRA+SR9009.

6 Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do TRA e do TRA combinado com exercício aeróbico ou agonista da Rev-erba na fase clara de camundongos

machos e fêmeas alimentados com uma dieta ocidental e seus resultados dependentes do sexo. É bem conhecido os efeitos negativos de um regime nutricional composto por uma dieta rica em gorduras saturadas e também rica em açúcares no metabolismo e no desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 e DHEM (89,90). Além disso, não apenas os aspectos quantitativos e qualitativos da dieta são importantes, mas também o momento da alimentação tem uma influência significativa no metabolismo (91). Alimentar-se no momento errado demonstrou agravar os impactos negativos da obesidade em ratos e humanos (92–94).

Um estudo conduzido por Arble e colaboradores identificou que camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em gorduras na fase clara ganharam significativamente mais peso do que os camundongos alimentados na fase escura, mesmo consumindo a mesma quantidade de calorias (92). Isso sugere que a alimentação no momento errado pode potencializar os efeitos negativos de uma dieta rica em gorduras e colaborar para o desenvolvimento da obesidade e suas doenças associadas. Isso ocorre devido a uma desregulação circadiana, na qual o padrão de alimentação contribui para um desalinhamento do principal relógio central, levando a vários resultados metabólicos negativos (26,95). Em humanos, foi identificado um aumento no risco de doença coronariana em mulheres que estavam sujeitas a trabalhos noturnos (93).

Assim, abordagens farmacológicas e não farmacológicas, como terapias nutricionais, exercício físico e tratamentos que envolvam a modulação de genes e proteínas do ciclo circadiano são estratégias potenciais para regular o tempo de alimentação e o balanço calórico. O jejum tem se mostrado uma estratégia eficaz para reduzir câncer e obesidade em roedores, ao mesmo tempo, estudos em humanos mostram que o jejum é uma estratégia potencial para reduzir hipertensão e obesidade (96). O TRA de 10 horas demonstrou ser eficiente para proteger camundongos que carecem de um relógio circadiano submetidos a uma dieta rica em gorduras contra ganho de peso, intolerância à glicose e resistência à insulina (90). Demonstrando os potenciais efeitos do TRA para prevenir a obesidade em uma condição de desregulação circadiana. No fígado, o TRA demonstrou regular a gluconeogênese e a produção de colesterol e bile (97).

Um estudo anterior do nosso laboratório identificou os grandes benefícios de combinar TRA e exercício aeróbio em camundongos machos suíços. Camundongos submetidos a um TRA de 8 horas na fase escura e combinado com exercício aeróbico mostraram uma melhora no peso corporal, na acumulação de gordura hepática, na oxidação de ácidos graxos e na redução da lipogênese. Além disso, a via de sinalização da insulina foi resgatada no grupo combinado de TRA com exercício aeróbico quando comparado ao

TRA. Além disso, o TRA não comprometeu o desempenho do exercício aeróbico (17). Semelhante aos nossos resultados, tanto camundongos machos quanto fêmeas mostraram uma melhoria no desempenho após 8 semanas de exercício aeróbico, mesmo em combinação com o TRA. Assim, foi identificada uma diferença estatística nas últimas sessões entre os sexos, em que os machos apresentaram uma maior velocidade de exaustão e potência do que as fêmeas. Os homens são comumente mais fortes, potentes e rápidos do que as mulheres quando comparados na mesma idade devido às suas características específicas de sexo do metabolismo endógeno. Dessa forma, apresentando um desempenho superior em comparação com as mulheres (98). Outro estudo de Chaix, 2021, identificou os benefícios de 9 horas de TRA de maneira dependente do sexo em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas. Tanto camundongos machos quanto fêmeas foram protegidos contra a intolerância à glicose e a acumulação de gordura hepática, mas apenas os machos mostraram redução de peso corporal, apesar de não haver diferenças no consumo calórico entre os grupos ad libitum e TRA (28).

Em nosso estudo, resultados semelhantes foram identificados, onde camundongos submetidos a 8 horas de TRA na fase clara mostraram uma redução no peso corporal e no ganho de peso apenas em machos, enquanto em fêmeas o TRA impediu o ganho de peso. Além disso, o TRA combinado com exercício aeróbico mostrou um efeito adicional em machos em comparação com camundongos submetidos apenas a TRA. Ao contrário do estudo de Chaix, 2019, os grupos TRA e TRA+EXE apresentaram uma redução significativa na ingestão alimentar acumulativa independentemente do sexo (28). Além disso, o consumo calórico do TRA+EXE foi menor do que o do grupo TRA apenas em camundongos machos. Esses dados podem explicar a redução de peso nesses grupos. Além disso, essa diferença calórica pode ser justificada pelo fato de que os camundongos foram alimentados no ciclo invertido.

Em relação ao metabolismo da glicose e marcadores lipídicos, ambos os sexos demonstraram uma melhora nos marcadores. No entanto, para a sensibilidade à insulina, apenas os machos demonstraram uma melhora neste marcador. É importante mencionar que os camundongos fêmeas não mostraram melhora no teste ITT porque talvez não desenvolvessem resistência à insulina devido ao menor ganho de peso em comparação aos machos. Outro marcador que deve ser considerado é a glicose em jejum; embora o grupo OB tenha mostrado um aumento estatisticamente significativo em relação ao CTL em fêmeas, os valores são consideravelmente mais baixos do que em machos. Possivelmente indicando que a dieta ocidental por 8 semanas não foi suficiente para desenvolver resistência à insulina em camundongos fêmeas. Como alguns dados mostram, as fêmeas

têm uma proteção contra o desenvolvimento de resistência à insulina em comparação aos machos. Esse fato também ocorre porque as fêmeas apresentam uma deposição de gordura subcutânea, enquanto os machos têm mais acúmulo de gordura intra-abdominal, o que aumenta o risco cardiometabólico e o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Essa proteção também é explicada pela maior sensibilidade à insulina na gordura e no músculo das mulheres em comparação com os homens, e em camundongos foi demonstrado um maior conteúdo e ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo da captação de glicose nas fêmeas em comparação aos machos (99). Da mesma forma, o estrogênio desempenha um papel importante na homeostase do metabolismo, na qual o declínio causado pela menopausa pode diminuir esse efeito protetor (100,101). Este efeito também é observado no fígado, onde a prevalência de DHEM em homens é maior do que em mulheres da mesma idade, mas as mulheres no período pós-menopausa perdem o efeito protetor do estrogênio, apresentando o mesmo risco de DHEM que os homens (102).

No metabolismo hepático, foi claro que o TRA foi eficiente para reduzir a acumulação de gordura independentemente do sexo. E quando administrado em combinação com exercício aeróbico, foi ainda mais eficaz para reduzir a acumulação de gordura hepática. Camundongos machos C57BL/6J foram submetidos a um protocolo de jejum intermitente (1 dia alimentado, 1 dia em jejum) por 4 semanas alimentados com uma dieta rica em gordura ou rica em frutose. Camundongos em ambos os grupos de jejum intermitente demonstraram uma redução importante da esteatose hepática e da inflamação (103). Resultados semelhantes são encontrados em nossos dados, como mostrado no escore DHEM, em que foi identificada uma redução da esteatose e inflamação, resultando em uma diminuição da atividade DHEM nos grupos TRA e TRA+EXE em machos. Para fêmeas, apenas a análise da esteatose é menor nos grupos TRA e TRA+EXE, mas ainda assim a atividade DHEM é diminuída nesses grupos quando comparados ao grupo OB. Outro estudo de nosso laboratório também demonstrou uma redução da acumulação de gordura através de Oil Red e do escore DHEM em camundongos machos suíços submetidos a TRA e TRA combinado com exercício de resistência por 8 semanas (104). Associado aos nossos dados, o TRA indica ser efetivo para reduzir ou prevenir a acumulação de gordura hepática, TG hepáticos e marcadores lipídicos no soro de camundongos submetidos a uma dieta ocidental ou dieta rica em gorduras, mas quando combinado com exercício, esses marcadores apresentaram uma redução acentuada quando comparados ao TRA isolado (17,28,104). Além disso, esses efeitos podem variar de acordo com o sexo. Um estudo conduzido por Oliveira e colaboradores também demonstrou os melhores efeitos da combinação de TRA com exercício.

Complementar aos nossos dados, Freire, 2020, demonstrou adaptações diferentes entre os sexos na composição corporal e no metabolismo hepático de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas que foram submetidos a 6 horas de acesso à comida na fase ativa por quatro semanas. Os pesquisadores encontraram uma clara diferença na deposição de gordura no fígado dos camundongos, onde as fêmeas apresentaram níveis mais altos de conteúdo de triglicérides do que os machos. Em nosso experimento, os camundongos foram alimentados com uma dieta ocidental por 8 semanas na fase inativa, o que claramente resultou em um aumento da deposição de gordura tanto para machos quanto para fêmeas (26). Assim, parece que o tratamento com TRA, e também o TRA combinado com exercício aeróbico, foi mais eficaz em camundongos machos do que em fêmeas, como observado nas colorações H&E e Oil Red. Além disso, o colesterol hepático e TG apresentaram níveis ligeiramente mais baixos do que os dos camundongos fêmeas. Adicionalmente, apenas em machos foi identificado um efeito complementar do exercício aeróbico quando em combinação com TRA nos TG hepáticos.

Consistente com dados anteriores, marcadores lipogênicos e inflamatórios foram avaliados. Foi constatado que os genes lipogênicos (*Fasn*, *Srebp1*, *Cd36*) estavam elevados em ambos os sexos no grupo OB, confirmado pelo aumento dos níveis de proteína FAS em comparação aos controles. Os marcadores de inflamação mostraram que camundongos machos OB tinham níveis elevados de *Tnfa*, *Tlr4* e *Il1 β* , enquanto as fêmeas apresentavam apenas níveis aumentados de *Nfkb* e *Tnfa*. Camundongos alimentados com uma dieta ocidental e rica em gorduras demonstraram uma regulação positiva nos marcadores lipogênicos e inflamatórios (103). Além disso, a alimentação em curto prazo no ciclo invertido (luzes acesas) mostrou piorar os efeitos da obesidade e aumentar os marcadores lipogênicos no fígado de camundongos alimentados com uma dieta ocidental por 1 semana em comparação a camundongos alimentados no momento certo (luzes apagadas) (105). O jejum restrito no tempo (TRA), tanto isoladamente quanto combinado com exercício aeróbico, regulou negativamente os marcadores lipogênicos nos camundongos machos, mas foi menos eficaz nas fêmeas, onde apenas *Srebp1* diminuiu. Curiosamente, o grupo TRA+EXE apresentou uma regulação negativa de *Fatp4* quando comparado ao TRA isolado, independentemente do sexo. O TRA reduziu significativamente os níveis de proteína FAS em comparação ao grupo OB, sem diferença notável nas fêmeas quando combinado com exercício aeróbico. Os marcadores inflamatórios também mostraram expressão reduzida com TRA e TRA combinado com exercício aeróbico em camundongos machos, enquanto as fêmeas apresentaram apenas uma diminuição em *Tlr4* e *Il1 β* com TRA. O TRA demonstrou ser uma estratégia eficiente para restaurar o metabolismo lipídico hepático por

meio da regulação negativa do gene lipogênico *Fasn* (106). De modo geral, o TRA emergiu como uma abordagem eficaz para restaurar o metabolismo lipídico hepático, regulando negativamente o *Fasn*, embora seus efeitos variem de acordo com o sexo. Além disso, é válido mencionar a expressão gênica lipogênica semelhante, mas também a expressão gênica distinta da inflamação entre homens e mulheres. Este fato poderia ser explicado pelos efeitos androgênicos do estrogênio, que protegem as mulheres do desenvolvimento de inflamação hepática (102,107). Este efeito também foi observado em camundongos machos e fêmeas alimentados com uma dieta rica em frutose, onde ambos os sexos apresentaram acúmulo semelhante de gordura hepática, mas a inflamação foi menor nas fêmeas (108).

Além de não ter sido identificada diferença no gráfico de VO₂, no VCO₂ foi identificada uma redução estatística no grupo OB em ambas as fases clara e escura, acompanhada por um aumento na produção de VCO₂ apenas no grupo TRA+EXE de camundongos machos na fase clara. Nas camundongas, uma redução da produção de VCO₂ do grupo TRA foi observada apenas na fase escura. Para o RER, o grupo OB mostrou uma redução desse parâmetro para machos e fêmeas em ambas as fases. Além disso, TRA e TRA+EXE apresentaram um aumento na fase clara para machos, embora para fêmeas apenas TRA+EXE tenha apresentado aumento, o que faz sentido devido ao momento da alimentação na fase clara. Além disso, o TRA+EXE demonstrou um efeito complementar para reduzir o valor de RER em relação ao TRA para camundongos machos. Na fase escura, apenas o TRA+EXE demonstrou uma redução, novamente sendo menor que o TRA em camundongos machos, enquanto em fêmeas tanto TRA quanto TRA+EXE exibiram valores diminuídos. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores (18,109,110), onde, no estado de jejum, a utilização de gordura é mais pronunciada, o que se alinha com a fase escura, mas apenas em camundongos fêmeas foi observado esse maior efeito do TRA, enquanto em machos apenas o grupo TRA+EXE mostrou esse resultado, possivelmente devido às adaptações do exercício aeróbico.

Como demonstrado por Chaix e colaboradores, o TRA demonstra ter uma atuação direta na regulação do ciclo circadiano, prevenindo o desenvolvimento à obesidade e síndrome metabólica em camundongos com deleção global de *Cry1* e *Cry2* e também camundongos knock-out (KO) específico da *Rev-erba* e *Bmal1* no tecido hepático (16). Em adição, o TRA foi eficiente em aumentar a expressão de *Rev-erba* que tem por sua função regular negativamente a via da lipogênese hepática (19). Além disso, o KO da proteína *Rev-erba* em hepatócitos levou a um metabolismo alterado de colesterol e lipídios em camundongos submetidos a uma indução à obesidade (111). Assim, demonstrando a grande

importância que a proteína Rev-erba tem sobre a regulação do metabolismo e em especial o metabolismo hepático e os efeitos do TRA sobre a modulação da Rev-erba.

Em relação aos camundongos machos submetidos ao TRA e TRA+SR9009, foi identificado uma redução importante do peso e ganho de peso em relação ao grupo OB, porém sem nenhuma diferença significativa entre os grupos TRA e TRA+SR9009. No entanto, a adiposidade mostrou-se aumentada no grupo OB, porém foi visto que os grupos TRA e TRA+SR9009 apresentaram uma redução da adiposidade visceral quando comparados ao grupo OB. Somado a isso, o TRA quando combinado com a administração do SR9009 demonstrou ser mais eficiente em reduzir o acúmulo de gordura visceral do que o TRA isoladamente. Isto pode ser explicado pela efetiva ativação farmacológica da proteína Rev-erba que causou em uma regulação negativa da lipogênese, resultando em um menor acúmulo de gordura visceral, como demonstram alguns estudos (30,112).

Sobre a homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina, o grupo OB apresentou uma maior curva glicêmica no teste de GTT, iTT, área sobre a curva e também glicose de jejum. O TRA e o TRA+SR9009 foram eficientes em reduzir todos estes parâmetros em relação ao grupo OB, demonstrando a efetividade destas estratégias em recuperar a homeostase glicêmica e sensibilidade a insulina mesmo quando a alimentação dos animais foi realizada na fase inativa. Em adição, o TRA+SR9009 novamente demonstrou ser mais eficaz do que o TRA isoladamente, apresentando valores reduzidos em todos os testes, demonstrando que a combinação do TRA com o tratamento farmacológico do agonista da Rev-erba resultou em um efeito adicional. Tal fato pode ser explicado devido a eficiência da atividade farmacológica pelo SR9009 no metabolismo da glicose (30,31). Um estudo muito importante demonstrou a capacidade regulatória da proteína Rev-erba sobre a sensibilidade à insulina hepática (113). Estes dados podem justificar a melhor regulação da glicose de jejum e principalmente o resultado no teste ITT, indicando melhor sensibilidade a insulina quando comparado ao TRA isolado.

Sobre o acúmulo de gordura hepático, foi visto que os animais do grupo OB apresentaram um acúmulo de gordura elevado em relação ao CTL. Porém os camundongos submetidos ao TRA e o TRA tratamento do SR9009 apresentaram uma redução importante do conteúdo de gordura hepática quando comparado ao grupo OB, sendo também eficiente na redução do NEFA sérico. Porém foi identificado um efeito complementar do SR+9009 quando somado ao TRA somente no colesterol sérico. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos que demonstraram redução do acúmulo de gordura hepática em camundongos submetidos ao tratamento com o SR9009 e também uma melhora da saúde do tecido hepático (82,114). Em adição, outros trabalhos demonstraram uma redução do

colesterol sérico com o tratamento do agonista da Rev-erba (30,31). No entanto, ainda não foi visto na literatura a combinação do TRA e a administração do SR9009, tornando os achados neste trabalho inovadores. Em concordância com os dados de histologia, a análise de expressão gênica da via da lipogênese demonstram que o grupo OB apresentou uma expressão elevada dos genes *Srebp1* e *Fatp4* em comparação ao CTL. Já os grupos TRA e TRA+SR9009 mostraram ser eficientemente iguais para a redução da expressão destes genes. Alguns trabalhos demonstram a participação importante que a proteína Rev-erba e a sua ativação através de um agonista possuem sobre regulação da lipogênese hepática, principalmente regulando o gene *Srebp1* (82,115). Porém nenhum efeito adicional da administração do SR9009 foi vista em combinação ao TRA.

Já em relação ao RER analisado pela respirometria, o grupo obeso demonstrou uma redução dos valores do RER em relação ao CTL, causado pela dieta. E as estratégias de TRA e TRA+SR9009 mostraram um aumento dos valores de RER em comparação ao OB. Contudo, o grupo TRA+SR9009 demonstrou uma tendência a aumentar os valores de RER em relação ao TRA isolado. Isto pode ser explicado pelo efeito da aplicação do agonista da Rev-erba no metabolismo da glicose, onde há uma elevação da oxidação de glicose e maior utilização da mesma como substrato energético (30,31).

7 Conclusão

O presente estudo demonstrou que tratamento à obesidade com a estratégia de TRA foi eficiente mesmo sendo aplicado na janela inativa dos animais, com efeitos positivos sobre e perda de peso, adiposidade, homeostase glicêmica, sensibilidade à insulina, acúmulo de gordura hepático e redução da expressão de genes lipogênicos e inflamatórios no fígado de camundongos submetidos a uma dieta ocidental por 8 semanas. No entanto, quando combinado com o exercício aeróbio foram identificados efeitos adicionais na regulação do TG hepático e RER para os machos, já as fêmeas demonstraram um melhor controle do colesterol sérico, juntamente com a redução da expressão do gene *Fatp4* para ambos os sexos. Além disso, o desempenho do exercício aeróbico melhorou para ambos os sexos, com machos mostrando resultados superiores. Diferenças nas respostas metabólicas relacionadas à homeostase glicêmica, como glicose em jejum e testes de tolerância à glicose, foram notadas entre os sexos. Os achados ressaltam a necessidade de mais estudos para explorar esses efeitos em machos e fêmeas. Já em relação ao tratamento com o agonista da Rev-erba, foi visto que a combinação do mesmo com o TRA resultou em melhoras adicionais nos parâmetros de homeostase glicêmica, glicose de jejum, sensibilidade à insulina e colesterol sérico. Desta forma trazendo dados inovadores para a

literatura sobre a combinação do TRA com o tratamento farmacológico do agonista da Rev-erba.

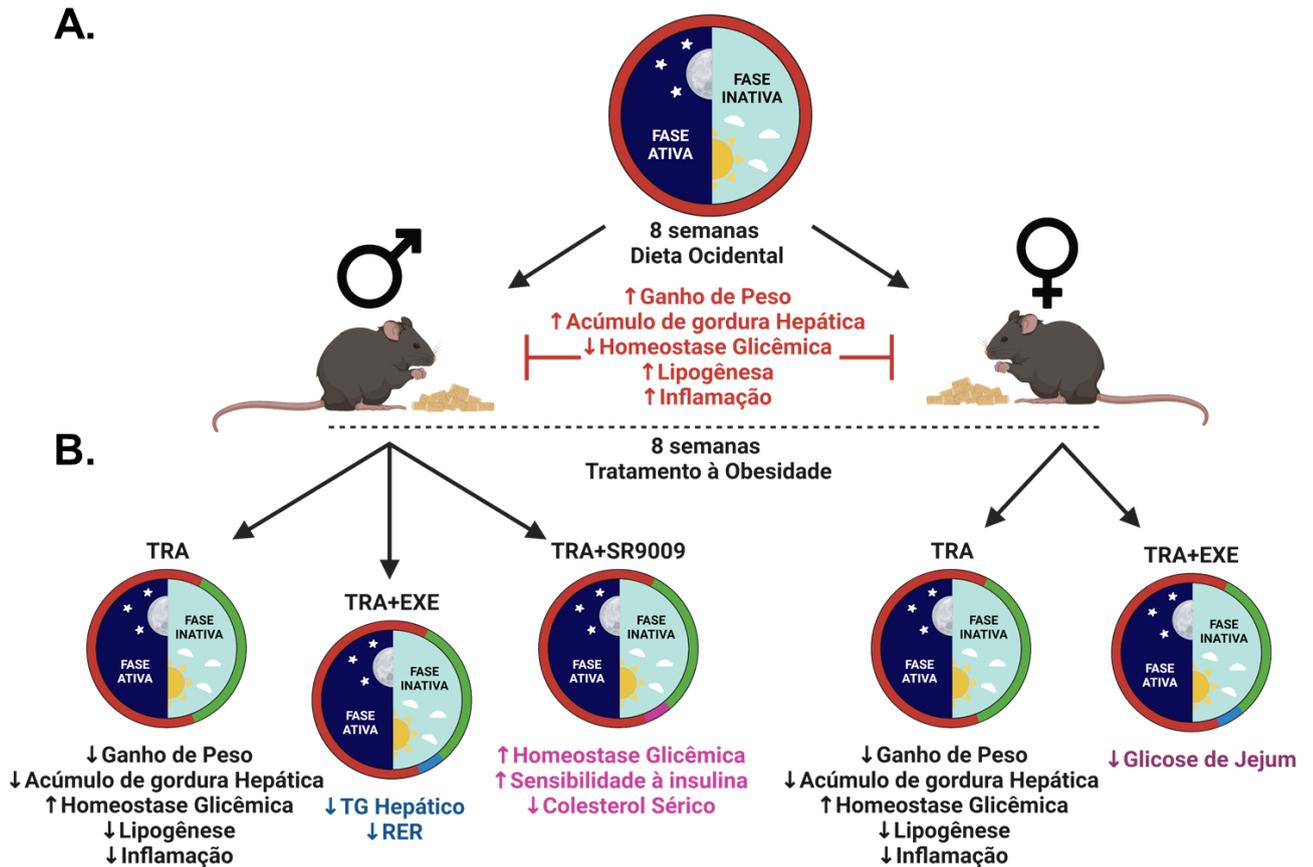


Figura 12. Resumo em gráfico. A, indução à obesidade. Danos metabólicos gerados pela dieta ocidental nas primeiras 8 semanas do experimento em camundongos machos e fêmeas. B, tratamento à obesidade. Benefícios gerados pela adoção do TRA, TRA+EXE e TRA+SR9009 (machos), e TRA e TRA+EXE (fêmeas) durante 8 semanas.

8 Referências

1. Kessler C. Pathophysiology of Obesity. *Nurs Clin North Am*. 2021;56(4):465–78.
2. Jared Baxter, Priscila Rodrigues Armijo, Laura Flores, Crystal Krause, Sarah Samreen TT. Updates on Monogenic Obesity in a Multifactorial Disease. *Obes Surg*. 2019;29(12):4077–83.
3. World Health Organization [Internet]. Available from: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
4. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(2):81–7.
5. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(MAY):1–24.
6. Neeland IJ, Poirier P, Després JP. Cardiovascular and Metabolic Heterogeneity of Obesity: Clinical Challenges and Implications for Management. *Circulation*. 2018;137(13):1391–406.
7. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* [Internet]. 2017;542(7640):177–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21363>
8. Kumari R, Kumar S, Kant R. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2019;13(4):2409–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.06.005>
9. Li C, Xu MM, Wang K, Adler AJ, Vella AT, Zhou B. Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl Res* [Internet]. 2018;191:29–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004>
10. Ropelle ER, da Silva ASR, Cintra DE, de Moura LP, Teixeira AM, Pauli JR. Physical Exercise: A Versatile Anti-Inflammatory Tool Involved in the Control of Hypothalamic Satiety Signaling. *Exerc Immunol Rev*. 2021;27:7–23.
11. Goedeke L, Perry RJ, Shulman GI. Emerging pharmacological targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019;59:65–87.
12. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133–223.
13. Savage DB, Semple RK. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and

- their links to insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(4):329–36.
14. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell* [Internet]. 2021;184(10):2537–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>
 15. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments. *Nutrients*. 2017;9(4):1–13.
 16. Chaix A, Lin T, Le HD, Chang MW, Panda S. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab* [Internet]. 2019;29(2):303-319.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.004>
 17. Vieira RFL, Muñoz VR, Junqueira RL, de Oliveira F, Gaspar RC, Nakandakari SCBR, et al. Time-restricted feeding combined with aerobic exercise training can prevent weight gain and improve metabolic disorders in mice fed a high-fat diet. *J Physiol*. 2021;0:1–17.
 18. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 2012;15(6):848–60.
 19. Chaix A, Manoogian ENC, Melkani GC, Panda S. Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annu Rev Nutr*. 2019;39:291–315.
 20. Gaspar RC, Veiga CB, Bessi MP, Dátilo MN, Sant’Ana MR, Rodrigues PB, et al. Unsaturated fatty acids from flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of obese mice: a new anti-inflammatory approach. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2019;66:52–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.003>
 21. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva ASR, Bertoli FC, et al. 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*. 2012;227(7):2917–26.
 22. Muñoz VR, Gaspar RC, Crisol BM, Formigari GP, Sant’Ana MR, Botezelli JD, et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. *J Physiol Sci*. 2018;68(4):493–501.
 23. Muñoz VR, Gaspar RC, Kuga GK, Nakandakari SCBR, Baptista IL, Mekary RA, et al. Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):5885–92.
 24. Lecheminant JD, Christenson E, Bailey BW, Tucker LA. Restricting night-time eating

- reduces daily energy intake in healthy young men: A short-term cross-over study. *Br J Nutr.* 2013;110(11):2108–13.
25. Aoyama S, Shibata S. Time-of-Day-Dependent Physiological Responses to Meal and Exercise. *Front Nutr.* 2020;7(February):1–12.
 26. Freire T, Senior AM, Perks R, Pulpitel T, Clark X, Brandon AE, et al. Sex-specific metabolic responses to 6 hours of fasting during the active phase in young mice. *J Physiol.* 2020;598(11):2081–92.
 27. Sasaki H, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol Int.* 2014;31(9):959–75.
 28. Chaix A, Deota S, Bhardwaj R, Lin T, Panda S. Sex- and age-dependent outcomes of 9-hour time-restricted feeding of a Western high-fat high-sucrose diet in C57BL/6J mice. *Cell Rep [Internet].* 2021;36(7):109543. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109543>
 29. Adlanmerini M, Nguyen HCB, Krusen BM, Teng CW, Geisler CE, Peed LC, et al. Hypothalamic REV-ERB nuclear receptors control diurnal food intake and leptin sensitivity in diet-induced obese mice. *J Clin Invest.* 2021;131(1).
 30. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature [Internet].* 2012;485(7396):62–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11030>
 31. Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, et al. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J.* 2012;26(8):3321–35.
 32. Wang S, Li F, Lin Y, Wu B. Targeting REV-ERB α for therapeutic purposes: Promises and challenges. *Theranostics.* 2020;10(9):4168–82.
 33. Gan L, Chitturi S, Farrell GC. Mechanisms and implications of age-related changes in the liver: Nonalcoholic fatty liver disease in the elderly. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2011;2011.
 34. Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem.* 2006;387(4):349–60.
 35. Mahrouf-Yorgov M, De L'Hortet AC, Cosson C, Slama A, Abdoun E, Guidotti JE, et al. Increased susceptibility to liver fibrosis with age is correlated with an altered inflammatory response. *Rejuvenation Res.* 2011;14(4):353–63.
 36. Cevenini E, Monti D, Franceschi C. Inflamm-ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*

- 2013;16(1):14–20.
37. Sanz N, Díez-Fernández C, Alvarez AM, Fernández-Simón L, Cascales M. Age-related changes on parameters of experimentally-induced liver injury and regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;154(1):40–9.
 38. Sastre J, Pallardó F V., Plá R, Pellín A, Juan G, O'Connor JE, et al. Aging of the liver: Age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*. 1996;24(5):1199–205.
 39. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Van Rooij FJA, Hofman A, Stricker BH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: Results from the Rotterdam study. *J Hepatol* [Internet]. 2012;57(6):1305–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.028>
 40. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005–23.
 41. Kagansky N, Levy S, Keter D, Rimon E, Taiba Z, Fridman Z, et al. Non-alcoholic fatty liver disease - A common and benign finding in octogenarian patients. *Liver Int*. 2004;24(6):588–94.
 42. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017;13(10):572–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
 43. Muñoz VR, Gaspar RC, Kuga GK, da Rocha AL, Crisol BM, Botezelli JD, et al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4791–800.
 44. Da Luz G, Frederico MJS, Da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, De Pinho RA, et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(9):2015–23.
 45. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: Linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017;13(9):509–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.56>
 46. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2014;53(1):124–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>
 47. Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the Regulation of Hepatic

- Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2017;28(7):497–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
48. Frederico MJS, Vitto MF, Cesconetto PA, Engelmann J, De Souza DR, Luz G, et al. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46(11):1381–8.
 49. Quinn WJ, Birnbaum MJ. Distinct mTORC1 pathways for transcription and cleavage of SREBP-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):15974–5.
 50. Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2464–72.
 51. O-Sullivan I, Zhang W, Wasserman DH, Liew CW, Liu J, Paik J, et al. FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nat Commun*. 2015;6(May).
 52. Di Ciaula A, Calamita G, Shanmugam H, Khalil M, Bonfrate L, Wang DQH, et al. Mitochondria matter: Systemic aspects of nonalcoholic fatty liver disease (naflid) and diagnostic assessment of liver function by stable isotope dynamic breath tests. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
 53. Macêdo A, Muñoz VR, Romeiro CF, Simabuco FM, Cintra E, Pauli JR. 1,5 . 1. 2020;
 54. Lim S, Kim JW, Targher G. Links between metabolic syndrome and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2021;32(7):500–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.04.008>
 55. Harris L, Hamilton S, Azevedo LB, Olajide J, De Brún C, Waller G, et al. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review and meta-analysis. *JB database Syst Rev Implement reports*. 2018;16(2):507–47.
 56. Anton SD, Moehl K, Donahoo WT, Marosi K, Lee SA, Mainous AG, et al. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. *Obesity*. 2018;26(2):254–68.
 57. Chaix A, Rynders CA. Time restricted feeding plus exercise: could two be better than one for metabolic health? *J Physiol*. 2021;0:1–2.
 58. Hill, James O., Peters, John C. WHR. Using the Energy Gap to Address Obesity: A Commentary. 2009;109(11):1848–1853.
 59. Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, et al. Long-Term Persistence of Hormonal Adaptations to Weight Loss. *Obstet Gynecol Surv*. 2012;67(2):91–2.

60. Delahaye LB, Bloomer RJ, Butawan MB, Wyman JM, Hill JL, Lee HW, et al. Time-restricted feeding of a high-fat diet in male C57BL/6 mice reduces adiposity but does not protect against increased systemic inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018;43(10):1033–42.
61. Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab* [Internet]. 2014;20(6):991–1005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>
62. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, et al. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab*. 2007;6(5):414–21.
63. Chow LS, Manoogian ENC, Alvear A, Fleischer JG, Thor H, Dietsche K, et al. Time-Restricted Eating Effects on Body Composition and Metabolic Measures in Humans who are Overweight: A Feasibility Study. *Obesity*. 2020;28(5):860–9.
64. Gabel K, Hoddy KK, Haggerty N, Song J, Kroeger CM, Trepanowski JF, et al. Effects of 8-hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study. *Nutr Heal Aging*. 2018;4(4):345–53.
65. Gill S, Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab* [Internet]. 2015;22(5):789–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.005>
66. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, et al. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab* [Internet]. 2020;31(1):92-104.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004>
67. Hutchison AT, Regmi P, Manoogian ENC, Fleischer JG, Wittert GA, Panda S, et al. Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Men at Risk for Type 2 Diabetes: A Randomized Crossover Trial. *Obesity*. 2019;27(5):724–32.
68. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab* [Internet]. 2018;27(6):1212-1221.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.010>
69. Carlson O, Martin B, Stote KS, Golden E, Maudsley S, Najjar SS, et al. Impact of reduced meal frequency without caloric restriction on glucose regulation in healthy, normal-weight middle-aged men and women. *Metabolism*. 2007;56(12):1729–34.
70. Kelly CJ. A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults [10]. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(4):1254–5.

71. Woldt E, Sebti Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoute J, et al. Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. 2013;19(8):1039–46.
72. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes*. 2008;32(9):1431–7.
73. Regensteiner JG, Golden S, Anton B, Barrett-Connor E, Chang AY, Chyun D, et al. Sex differences in the cardiovascular consequences of diabetes mellitus a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132(25):2424–47.
74. Wu N, Yin L, Hanniman EA, Joshi S, Lazar MA. Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erb α . *Genes Dev* [Internet]. 2009 Sep 15;23(18):2201–9. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.1825809>
75. Tamanini, Filippo, Yagita, Kazuhiro, Okamura, Hitoshi, Gijsbertus T J van der Horst GTJ van der. Nucleocytoplasmic Shuttling of Clock Proteins. *Methods Enzymol*. 2005;393:418–35.
76. Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Ono R, et al. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating Mammalian Circadian Output. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
77. Cox, Kimberly H., Takahashi JS. Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism. *J Mol Endocrinol*. 2019;63(4):93–102.
78. Onder Y, Green CB. Rhythms of metabolism in adipose tissue and mitochondria. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythm* [Internet]. 2018;4(February):57–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2018.01.001>
79. Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP. The REV-ERBs and RORs: Molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. *Future Med Chem*. 2011;3(5):623–38.
80. Burke L, Downes M, Carozzi A, Giguère V, Muscat GEO. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb β is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: Functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(18):3481–9.
81. Musiek ES. Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases: Cause and effect? *Front Pharmacol*. 2015;6(FEB):1–7.
82. Griffett K, Bedia-Diaz G, Elgendy B, Burris TP. REV-ERB agonism improves liver pathology in a mouse model of NASH. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(10 October):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0236000>
83. Caratti G, Iqbal M, Hunter L, Kim D, Wang P, Vonslow RM, et al. REVERB α couples

- the circadian clock to hepatic glucocorticoid action. *J Clin Invest*. 2018;128(10):4454–71.
84. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1).
 85. Sundaram S, Yan L. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. *Nutr Res [Internet]*. 2016;36(6):603–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2016.02.005>
 86. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology [Internet]*. 2005 Jun;41(6):1313–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.20701>
 87. Power Guerra N, Leyens K, Müller L, Brauer D, Janowitz D, Schlick S, et al. The effect of different weight loss strategies to treat non-alcoholic fatty liver disease focusing on fibroblast growth factor 21. *Front Nutr [Internet]*. 2022 Aug 10;9(August):1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.935805/full>
 88. Liebig M, Hassanzada A, Kämmerling M, Genz B, Vollmar B, Abshagen K. Microcirculatory disturbances and cellular changes during progression of hepatic steatosis to liver tumors. *Exp Biol Med [Internet]*. 2018 Jan 24;243(1):1–12. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370217738730>
 89. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol [Internet]*. 2020;73(1):202–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>
 90. Fazzino TL, Courville AB, Guo J, Hall KD. Ad libitum meal energy intake is positively influenced by energy density, eating rate and hyper-palatable food across four dietary patterns. *Nat Food [Internet]*. 2023 Jan 30 [cited 2022 May 3];4(2):144–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43016-022-00688-4>
 91. Guan D, Xiong Y, Borck PC, Jang C, Doulias P-T, Papazyan R, et al. Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes. *Cell [Internet]*. 2018 Aug;174(4):831-842.e12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418307992>
 92. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obesity [Internet]*. 2009 Nov 10;17(11):2100–2.

- Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2009.264>
93. Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, Caumo W, Hidalgo MP. Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev* [Internet]. 2010 Jun 2;23(1):155–68. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422410000016/type/journal_article
 94. Marot LP, Lopes T do VC, Balieiro LCT, Crispim CA, Moreno CRC. Impact of Nighttime Food Consumption and Feasibility of Fasting during Night Work: A Narrative Review. *Nutrients* [Internet]. 2023 May 31;15(11):2570. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/11/2570>
 95. Mason IC, Qian J, Adler GK, Scheer FAJL. Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2020;63(3):462–72.
 96. Longo VD, Mattson MP. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Feb;19(2):181–92. Available from: <https://www.padelfip.com/federations/>
 97. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab* [Internet]. 2016 Jun;23(6):1048–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116302509>
 98. Hunter SK, S Angadi S, Bhargava A, Harper J, Hirschberg AL, D Levine B, L Moreau K, J Nokoff N, Stachenfeld NS. The Biological Basis of Sex Differences in Athletic Performance: Consensus Statement for the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2023 Dec;55(12):2328–60. Available from: <https://journals.lww.com/10.1249/MSS.0000000000003300>
 99. Nicolaisen TS, Sjøberg KA, Carl CS, Richter EA, Kiens B, Fritzen AM, et al. Greater molecular potential for glucose metabolism in adipose tissue and skeletal muscle of women compared with men. *FASEB J* [Internet]. 2024 Aug 15;38(15):1–14. Available from: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202302377R>
 100. Della Torre S, Maggi A. Sex Differences: A Resultant of an Evolutionary Pressure? *Cell Metab* [Internet]. 2017;25(3):499–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.01.006>
 101. Palmisano BT, Stafford JM, Pendergast JS. High-Fat feeding does not disrupt daily rhythms in female mice because of protection by ovarian hormones. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(MAR):1–11.
 102. Burra P, Bizzaro D, Gonta A, Shalaby S, Gambato M, Morelli MC, et al. Clinical impact of sexual dimorphism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-

- alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver Int* [Internet]. 2021 Aug 8;41(8):1713–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.14943>
103. Marinho T de S, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition*. 2019;65:103–12.
 104. de Lima RD, Vieira RFL, Muñoz VR, Chaix A, Macedo APA, Antunes GC, et al. Time-restricted feeding combined with resistance exercise prevents obesity and improves lipid metabolism in the liver of mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2023;325(5):E513–28.
 105. Yasumoto Y, Hashimoto C, Nakao R, Yamazaki H, Hiroshima H, Nemoto T, et al. Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism*. 2016;65(5):714–27.
 106. Chaix A, Zarrinpar A. The effects of time-restricted feeding on lipid metabolism and adiposity. *Adipocyte* [Internet]. 2015 Oct 2;4(4):319–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21623945.2015.1025184>
 107. Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology* [Internet]. 2019 Oct 23;70(4):1457–69. Available from: <https://journals.lww.com/10.1002/hep.30626>
 108. Spruss A, Henkel J, Kanuri G, Blank D, Püschel GP, Bischoff SC, et al. Female Mice Are More Susceptible to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Sex-Specific Regulation of the Hepatic AMP-Activated Protein Kinase-Plasminogen Activator Inhibitor 1 Cascade, but Not the Hepatic Endotoxin Response. *Mol Med* [Internet]. 2012 Sep 29;18(9):1346–55. Available from: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.2119/molmed.2012.00223>
 109. Woodie LN, Luo Y, Wayne MJ, Graff EC, Ahmed B, O'Neill AM, et al. Restricted feeding for 9 h in the active period partially abrogates the detrimental metabolic effects of a Western diet with liquid sugar consumption in mice. *Metabolism* [Internet]. 2018 May;82:1–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.12.004>
 110. Gallop MR, Tobin SY, Chaix A. Finding balance: understanding the energetics of time-restricted feeding in mice. *Obesity* [Internet]. 2023 Feb 13;31(S1):22–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.23607>
 111. Guan D, Bae H, Zhou D, Chen Y, Jiang C, La CM, et al. Hepatocyte SREBP signaling mediates clock communication within the liver. *J Clin Invest*. 2023;133(8).

112. Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* [Internet]. 2012;485(7396):123–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11048>
113. Ding G, Li X, Hou X, Zhou W, Gong Y, Liu F, et al. REV-ERB in GABAergic neurons controls diurnal hepatic insulin sensitivity. *Nature* [Internet]. 2021 Apr 29;592(7856):763–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03358-w>
114. Yang Z, Smalling R V., Huang Y, Jiang Y, Kusumanchi P, Bogaert W, et al. The role of SHP/REV-ERB α /CYP4A axis in the pathogenesis of alcohol-associated liver disease. *JCI Insight*. 2021;6(16):1–16.
115. Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Lo Sasso G, et al. REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol*. 2009;7(9).