

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Nutrição**

**Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos**



**Tese de Doutorado**

**COMPARAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO *AD LIBITUM* DE DIETAS “*VERY LOW FAT*” E CETOGÊNICA EM CAMUNDONGOS E OS REFLEXOS FISIOLÓGICOS DA NÃO ADESÃO**

**Clédia Silveira Flores da Silva**

**Orientador: Carlos Castilho de Barros**

**Coorientador: Simone Pieniz**

**Coorientador: Ines C. Schadock**

**Pelotas, 2024**

**Clédia Silveira Flores da Silva**

**COMPARAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO *AD LIBITUM* DE DIETAS “*VERY LOW FAT*” E CETOGÊNICA EM CAMUNDONGOS E OS REFLEXOS FISIOLÓGICOS DA NÃO ADESÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Carlos Castilho de Barros

Coorientador: Simone Pieniz

Coorientador: Ines C. Schadock

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

S586c Silva, Clédia Silveira Flores da

Comparação da administração Ad Libitum de dietas "Very Low Fat" e Cetogênica em camundongos e os reflexos fisiológicos da não adesão [recurso eletrônico] / Clédia Silveira Flores da Silva ; Carlos Castilho de Barros, orientador ; Simone Pieniz, Ines Schadock, coorientadoras. — Pelotas, 2024.

110 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Ganho de peso. 2. Emagrecimento. 3. Dieta com baixo teor de gordura. 4. Dieta com baixo teor de carboidrato. I. Barros, Carlos Castilho de, orient. II. Pieniz, Simone, coorient. III. Schadock, Ines, coorient. IV. Título.

CDD 641.1

Clédia Silveira Flores da Silva

COMPARAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO *AD LIBITUM* DE DIETAS “*VERY LOW FAT*” E CETOGÊNICA EM CAMUNDONGOS E OS REFLEXOS FISIOLÓGICOS DA NÃO ADESÃO

Tese apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30/10/2024

Banca examinadora:

Professor Dr. Carlos Castilho de Barros (Orientador)

Doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes

Profa. Dra. Simone Pieniz

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ines Schadock

Doutora em Ciências Biológicas pela Humboldt-Universität Zu Berlin, HUB, Alemanha.

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Professor Carlos por todo o aprendizado transmitido ao longo desses quatro anos, bem como pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Alemanha. Durante esse período, tive a chance de aprender novas técnicas, além de participar de seminários e congressos, onde alcancei valioso conhecimento e criei memórias inesquecíveis.

Os meus cordiais agradecimentos a todas os professores que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório pelo apoio prestado durante os experimentos com os animais.

Minha gratidão se estende, com muito carinho, aos meus pais (*in memoriam*), que sempre guiaram meus passos, e ao meu marido, por sua constante parceria e apoio.

## Resumo

SILVA, Clédia Silveira Flores. **Comparação da administração *ad libitum* de dietas “very low fat” e cetogênica em camundongos e os reflexos fisiológicos da não adesão.** Orientador: Carlos Castilhos de Barros. 2024.110f. Tese (Doutorado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

A obesidade constitui uma ameaça significativa à saúde pública, pois eleva o risco de doenças crônicas não transmissíveis, impactando negativamente a qualidade de vida, a produtividade no trabalho e gerando altos custos para o sistema de saúde. Essa condição multifatorial decorre de um balanço energético cronicamente positivo. Nesse contexto, alcançar um balanço energético negativo é essencial para o enfrentamento da obesidade, com recomendações que combinam dieta e exercício físico. Entre as abordagens dietéticas disponíveis, a dieta cetogênica se destaca por sua elevada ingestão de lipídios e baixo consumo de carboidratos. Além disso, há uma escassez de estudos na literatura que investiguem os efeitos de dietas com quantidades muito baixas de lipídios e ricas em carboidratos. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração *ad libitum* de uma dieta *very low fat* (VLF) em comparação com a dieta cetogênica (KD), bem como suas versões intermitentes (IVLF e IKD), em camundongos C57BL/6. Os animais foram alimentados com suas respectivas dietas durante 24 semanas. Os grupos intermitentes alternaram entre a dieta específica e a ração controle. O teste de tolerância à glicose foi realizado na 23<sup>a</sup> semana. Foram avaliadas a composição corporal, as alterações no metabolismo glicêmico e a expressão gênica de enzimas glicolíticas e lipolíticas nos tecidos hepático, renal e muscular, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Os resultados mostraram que o grupo KD reduziu o percentual de gordura corporal a partir da 16<sup>a</sup> semana, apresentando valores significativamente menores na 22<sup>a</sup> semana em comparação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Além disso, a expressão do transportador de glicose 2 foi menor em relação ao Ctrl ( $p=0,0327$ ) e VLF ( $p=0,0128$ ). A expressão de *Stearoyl-CoA reductase 1* também foi menor no grupo KD em comparação ao Ctrl ( $p=0,0244$ ). Em contrapartida, o grupo IKD apresentou aumento na ingestão alimentar e no percentual de gordura corporal nas semanas 17 a 19, além expressão elevada de *Stearoyl-CoA reductase 1* em relação ao grupo KD ( $p=0,0279$ ). A *Stearoyl-CoA reductase 1* estava mais elevada no grupo IVLF do que no KD ( $p=0,0196$ ), e a expressão de *Acetyl-CoA carboxilase 1* também foi maior no IVLF ( $p=0,0243$ ). Conclui-se que a dieta cetogênica promove perda de peso e altera a expressão genética de enzimas lipogênicas. O ganho de peso no grupo IKD sugere que a dificuldade em manter a adesão a dietas restritivas pode levar ao ganho de peso indesejado.

**Palavras-chaves:** ganho de peso; emagrecimento; dieta com baixo teor de gordura; dieta com baixo teor de carboidrato

## Abstract

SILVA, Clédia Silveira Flores. **Comparison of ad libitum administration of “very low fat” and ketogenic diets in mice and the physiological reflexes of adherence.** Orientador: Carlos Castilhos de Barros. 2024.110f. Tese (Doutorado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Obesity poses a significant threat to public health, as it increases the risk of chronic non-communicable diseases, negatively impacting quality of life and work productivity, and generating high costs for the health system. This multifactorial condition results from a chronically positive energy balance. In this context, achieving a negative energy balance is essential to address obesity, with recommendations that combine diet and physical exercise. Among the available dietary approaches, the ketogenic diet stands out for its high lipid intake and low carbohydrate intake. In addition, there is a scarcity of studies in the literature investigating the effects of diets with very low amounts of lipids and rich in carbohydrates. Given this scenario, the present study aimed to analyze the effects of ad libitum administration of a very low fat diet (VLF) compared to the ketogenic diet (KD), as well as its intermittent versions (IVLF and IKD), in C57BL/6 mice. The animals were fed their respective diets for 24 weeks. The intermittent groups alternated between the specific diet and the control diet. The glucose tolerance test was performed at week 23. Body composition, changes in glucose metabolism, and gene expression of glycolytic and lipolytic enzymes in liver, kidney, and muscle tissues were evaluated using the Real-Time Polymerase Chain Reaction technique. The results showed that the KD group reduced the percentage of body fat from the 16th week, presenting significantly lower values at the 22nd week compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). In addition, the expression of glucose transporter 2 was lower in relation to Ctrl ( $p = 0.0327$ ) and VLF ( $p = 0.0128$ ). The expression of Stearoyl-CoA reductase 1 was also lower in the KD group compared to Ctrl ( $p = 0.0244$ ). In contrast, the IKD group showed an increase in food intake and body fat percentage in weeks 17 to 19, in addition to elevated expression of Stearoyl-CoA reductase 1 in relation to the KD group ( $p = 0.0279$ ). Stearoyl-CoA reductase 1 was higher in the IVLF group than in the KD group ( $p=0.0196$ ), and the expression of Acetyl-CoA carboxylase 1 was also higher in the IVLF group ( $p=0.0243$ ). It is concluded that the ketogenic diet promotes weight loss and alters the gene expression of lipogenic enzymes. Weight gain in the IKD group suggests that difficulty in maintaining adherence to restrictive diets may lead to unwanted weight gain.

**Keywords:** weight gain; weight loss; very low-fat diet; ketogenic diet

## Sumário

<b>1.Introdução</b> .....	6
<b>2. Revisão de literatura</b> .....	10
2.1 Obesidade .....	10
2.2 Principais hormônios relacionados à obesidade .....	14
<b>3. Objetivos</b> .....	24
3.1. Objetivo geral .....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	25
<b>5. Anexos</b> .....	31
5.1 Artigo 1:.....	32
5.2 Artigo 2: .....	68
5.3 Artigo 3:.....	71
<b>6. Considerações finais</b> .....	99
6.5 Depósito da patente da APOA2: .....	102
6.6 Depósito da patente MC4R: .....	108



## 1. Introdução

A obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) podendo gerar efeitos negativos na qualidade de vida, produtividade no trabalho e custos de saúde. A obesidade ocorre quando há um desequilíbrio energético em longo prazo, isto é, quando a ingestão de energia na dieta é maior que o gasto energético (CHOOI *et al.*, 2019).

A obesidade foi referida como uma epidemia global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2003 (WHO, 2003). Estatísticas recentes indicam que o sobrepeso e a obesidade continuam com crescimento global rigoroso, com mais de 30% da população mundial com excesso de peso corporal. O *Global Burden of Disease Group* informou em 2017 que desde 1980, a prevalência da obesidade dobrou em mais de 70 países e continuou aumentando na maioria dos outros países (CABALLERO, 2019). Com o aumento da prevalência de sobrepeso e de obesidade também aumentaram o risco de complicações associadas como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e câncer. O aumento da prevalência da obesidade e os graves problemas relacionados à saúde são considerados um grande fardo socioeconômico global (ZOBEL *et al.*, 2016).

Muito tem se estudado sobre as possíveis explicações para o aumento da obesidade nas últimas décadas. Sabe-se que a tecnologia, a urbanização e a mudança de renda foram alguns dos fatores que mudaram profundamente o sistema alimentar global refletindo, assim, no consumo de alimentos processados (POPKIN *et al.*, 2012). Enquanto o padrão alimentar tradicional baseava-se em alimentos frescos, a dieta moderna deriva principalmente de alimentos processados. Os alimentos processados tem maior durabilidade, são convenientes, prontos para o consumo e, muitas vezes, baratos comparados aos alimentos frescos. O processamento de alimentos é um importante contribuinte para a epidemia de obesidade (MONTEIRO *et al.*, 2013). Além disso, os alimentos ultraprocessados possuem uma grande quantidade de gorduras, açúcares adicionados, sal e aditivos, portanto, são alimentos que induzem ao excesso alimentar e possuem alta densidade energética (MONTEIRO, 2010).

Em 1977, o Comitê do Senado dos Estados Unidos referiu como um dos objetivos dietéticos a redução do consumo geral de gordura de 40% para 30% e a redução de gordura saturada de 16% para 10% (DIETARY GOALS FOR THE UNITED STATES, 1977). Dessa forma, surgiu a criação de mercado de alimentos com baixo

teor de gordura e sem gordura. Com o surgimento desses produtos alimentícios verificou-se uma diminuição geral no consumo de gorduras e mesmo assim observou-se um aumento paralelo de sobrepeso e de obesidade. Nos últimos 30 anos, houve uma redução da ingestão de gordura em 10% entre os americanos, porém a taxa de obesidade dobrou (KOCHANNEK *et al.*, 2017). Devido à recomendação de dietas com baixo teor de gordura para que os alimentos continuassem com alta palatabilidade, as indústrias de alimentos substituíram as gorduras pelos carboidratos refinados em muitos produtos (EBBELING *et al.*, 2018). Sendo assim, esses alimentos ultraprocessados são comumente ricos em açúcares adicionados como sacarose e frutose, sal, alta densidade energética, juntamente com gorduras saturadas e *trans*, em contrapartida possuem pequenas quantidades de fibras, proteínas, micronutrientes e fitoquímicos (ASKARI *et al.*, 2020).

A indústria de alimentos desenvolveu e colocou em uso tecnologias que permitem extrair o amido do milho, hidrolisá-lo em glicose e converter parte da glicose em frutose por meio da isomerização enzimática (MARSHALL *et al.*, 1957). Essa técnica repercutiu na produção de adoçantes oriundos do milho, entre os quais o xarope de milho com alto teor de frutose. O alto poder adoçante do xarope de milho rico em frutose, as propriedades organolépticas, a capacidade de conferir uma vida útil maior aos alimentos e de manter uma hidratação duradoura em padarias industriais junto com o baixo custo, contribuiu para um aumento acelerado do seu consumo em substituição a sacarose (TAPPY *et al.*, 2010). Desse modo, o consumo de frutose total aumentou quase 30% entre 1970 e 2000, por conta do aumento na utilização do uso de xarope de milho rico em frutose (VENTURA *et al.*, 2011), a qual está em sua forma livre, seguido por uma diminuição no consumo de frutose ligada à glicose na sacarose (BRAY *et al.*, 2004).

Assim, essa disponibilidade de alimentos altamente variados, saborosos, ricos em frutose e gordurosos foram considerados viciantes. De acordo com a literatura, os indivíduos obesos demonstraram ter uma preferência por esses alimentos altamente calóricos em comparação com os indivíduos de peso saudável (ADAMS *et al.*, 2019).

No início deste século foi observado que as pessoas com obesidade podem apresentar características como compulsão e perda de controle, pois o consumo de alimentos torna-se recompensador por meio da ativação das vias da dopamina mesolímbica do sistema nervoso central (SNC), efeito relacionado principalmente a

alimentos com grande quantidade de açúcar e de gordura, levando ao consumo alimentar compulsivo (LINDGREN *et al.*, 2018). Então, o consumo desses alimentos altamente palatáveis pode afetar o circuito de recompensa, e assim, levar ao desenvolvimento do vício alimentar que resulta na alteração dos mecanismos de controle de ingestão alimentar provocando excessiva ingestão de alimentos que acarreta no balanço energético positivo e como consequência o ganho de peso na forma de tecido adiposo (MEULE, 2015). Além disso, o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura implica no aumento da obesidade, pois a gordura dietética contribui para hiperfagia, ganho de peso e depósito de gordura. Da mesma forma, o consumo excessivo de carboidratos leva a obesidade (DOURMASHKIN *et al.*, 2005).

Sendo assim, tanto dietas com baixo teor de gorduras como dietas com baixo teor de carboidratos foram preconizadas como ferramentas para controle de massa corpórea e emagrecimento. Os tratamentos atuais para a obesidade têm tido sucesso limitado e a maioria dos indivíduos que alcançam a perda de peso bem-sucedida não conseguem mantê-lo (SOLEYMANI *et al.*, 2016). Considera-se que isso ocorra devido às intervenções possuírem como objetivo a redução do excesso de adiposidade, não contemplando uma das causas implícitas mais comuns do aumento do ganho de peso e da obesidade que é o comportamento alimentar descontrolado (LEIGH *et al.*, 2018). Por esse motivo, a obesidade está entre os maiores desafios de saúde pública, pois apenas cerca de 5% dos indivíduos com obesidade conseguem reduzir permanentemente o excesso de peso corporal (LENNERZ *et al.*, 2018). Além disso, na tentativa de perder peso, grande parte dos indivíduos adotam padrões alimentares inadequados como dietas muito restritivas podendo desencadear excessos alimentares, baixo consumo de frutas e de vegetais e inatividade física que são práticas que não auxiliam na redução de peso de forma efetiva (PIETILAINEN *et al.*, 2012). Entretanto, as orientações sobre controle de peso destacam a importância de hábitos alimentares saudáveis incluindo uma variedade de alimentos ricos em nutrientes, limitam as porções de alimentos ricos em energia e reduzem a densidade energética geral (ALISSA *et al.*, 2018).

Neste contexto, entender como os mecanismos de regulação de ingestão são influenciados pela composição de dietas *ad libitum* poderá encontrar a resposta para melhor recomendação dietética no controle da pandemia de obesidade. Assim, este estudo tem como objetivo analisar os efeitos da administração *ad libitum* de duas

dietas diferentes em camundongos: uma dieta *very low fat* (baixa em gorduras) com alto teor de carboidratos e uma dieta cetogênica. Com a intenção de reproduzir a dificuldade de adesão a dietas restritivas observada nos indivíduos foram incluídos dois grupos com consumo intermitente das dietas. Além disso, foram analisados os efeitos das dietas na composição corporal, no metabolismo, na regulação glicêmica, bem como as alterações na expressão gênica em diferentes tecidos, incluindo fígado, tecido adiposo, músculos e rins.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Obesidade

A obesidade é amplamente definida como excesso de massa corporal para uma determinada altura e é vista como uma preocupação de saúde global, pois está relacionada ao aumento do risco de várias DCNT como DM2, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (AFSHIN *et al.*, 2017). Sendo assim, a obesidade é caracterizada por um Índice de Massa Corporal (IMC)  $> 30 \text{ kg/m}^2$  (WHO, 2021). A obesidade pode ser considerada como clinicamente grave que é determinada pelo  $\text{IMC} \geq 35 \text{ kg/m}^2$  com a presença de pelo menos uma comorbidade como DM2, síndrome metabólica e hipertensão ou  $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ . Esse IMC extremo causa um risco alto para comorbidades e mortalidade, e assim reduz a expectativa de vida dos pacientes em 6,5 – 13,7 anos (KITAHARA *et al.*, 2014; NCD-risc, 2016).

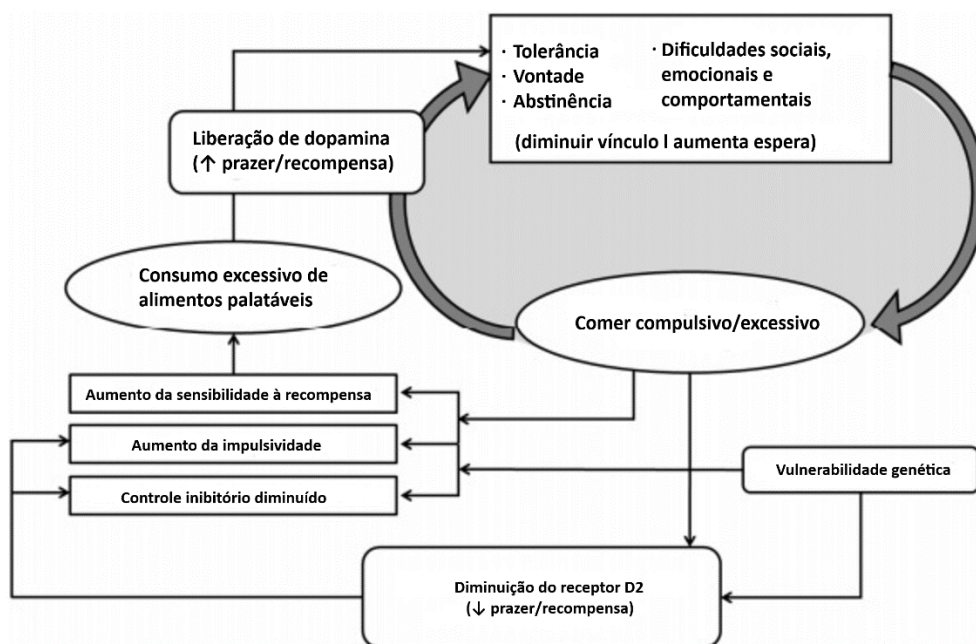
Segundo a OMS, mais de 650 milhões de adultos em todo o mundo são considerados obesos (RAHMANI *et al.*, 2015). A obesidade surge das interações entre um perfil genético de risco e de fatores de risco ambientais como sedentarismo, ingestão calórica excessiva, ambiente intrauterino, medicamentos, status socioeconômico e possivelmente fatores como sono insuficiente, desreguladores endócrinos, microbioma gastrointestinal e entre outros (GOODARZI *et al.*, 2017).

Sabe-se que a causa principal da obesidade é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Além disso, a obesidade envolve uma interação complexa de fatores biológicos, genéticos e psicossociais (FREIRE *et al.*, 2020). Visto que a obesidade é influenciada por fatores poligênicos e ambientais, quanto aos fatores ambientais podemos citar os alimentos com alta densidade energética e estilo de vida sedentário (AHIMA *et al.*, 2008).

Com a urbanização, aumento da renda e avanço da tecnologia, os alimentos prontos para comer e para aquecer tornaram-se opções convenientes e atraentes como os alimentos ultraprocessados. Esses alimentos possuem grande durabilidade, são saborosos e prontos para o consumo, tem alta densidade energética, possuem alta carga glicêmica, são pobres em fibras dietéticas, micronutrientes, fitoquímicos e ricos em tipos não saudáveis de gordura dietética, açúcares livres e sódio (MONTEIRO, 2013). Sendo assim, o consumo excessivo de alimentos ricos em açúcar refinado e gordura levaram alguns pesquisadores a propor que a obesidade pode ser uma forma de compulsão alimentar (VOLKOW *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2011; GEARHARDT *et*

*al.*, 2011) por causa que os alimentos saborosos são capazes de desencadear a liberação de dopamina no *nucleus accumbens* e na área tegmental ventral (ADAMS *et al.*, 2019). Desse modo, os alimentos hiperpalatáveis atuam na via de recompensa, essa via está envolvida nos processos de recompensa, relevância, motivação, tomada de decisão e controle inibitório esses processos são centrais no desenvolvimento do vício e na ingestão excessiva de alimentos (CARTER *et al.*, 2016). Então, o vício alimentar tem se concentrado em alimentos processados com alto teor de energia, alto índice glicêmico e alto teor de gordura.

Quando os alimentos hiperpalatáveis são consumidos, o cérebro libera o hormônio dopamina juntamente com outros neurotransmissores como os opioides. Em longo prazo, esse aumento na dopamina leva à desregulação dos receptores de dopamina, fazendo com que os indivíduos tenham redução do prazer durante o consumo de alimentos palatáveis. Essa diminuição do prazer, associada com sinais de tolerância, desejo, retraimento e outras dificuldades sociais, emocionais e comportamentais desencadeiam um comportamento compensatório, aumentando assim, o consumo de alimentos. Como consequência, o consumo de alimentos pode se tornar compulsivo, criando um ciclo de dependência alimentar como mostra a Figura 1 (ADAMS *et al.*, 2019).



Fonte: Adaptado de Adams *et al.* (2019).

Figura 1. O ciclo proposto para o comportamento alimentar compulsivo.

Corroborando com o exposto acima, Schulte *et al.* (2015), questionaram os participantes saudáveis sobre qual a probabilidade destes apresentarem o vício em alimentos com uma lista composta por 35 itens alimentares. Os alimentos altamente processados contendo macronutrientes mistos ou somente carboidratos de alto índice glicêmico foram classificados em primeiro lugar (SCHULTE *et al.*, 2015). Uma vez que os carboidratos processados têm um alto índice glicêmico e causam mudanças rápidas na glicemia, insulina e nos hormônios metabólicos. Essas mudanças ligeiras são farmacocineticamente semelhantes às mudanças rápidas que acontecem nos neurotransmissores após o consumo de substâncias de abuso (LENNERZ *et al.*, 2018).

No estudo de Stoeckel *et al.* (2008), observaram que ao visualizar imagens de alimentos com alto teor calórico, mulheres obesas manifestaram ativação significativamente maior em uma série de regiões associadas à recompensa, em comparação com as mulheres de peso saudável (STOECKEL *et al.*, 2008). Os participantes obesos também demonstraram maior responsividade aos alimentos nas regiões gustativas e somatossensoriais, propondo uma sensibilidade elevada a alimentos palatáveis que podem contribuir para o excesso de consumo alimentar e ocasionar a obesidade (WANG *et al.*, 2002). Entretanto, os alimentos ricos em gorduras na maioria das vezes também possuem uma grande quantidade de carboidratos porque adicionar açúcar aumenta significativamente a predileção por alimentos ricos em gorduras entre os seres humanos com peso normal. Porém, essa combinação de alto teor de gordura com o alto teor de açúcar é provavelmente mais efetiva para estimular a alimentação excessiva e viciante do que somente a gordura (LUSTIG, 2020).

Com o aumento da obesidade, sobrepeso e doenças crônicas nos países ocidentais, os pesquisadores estão interessados em entender os mecanismos pelo quais as pessoas engordam e como tratar dessas doenças. Ao longo do último meio século, para tentar combater a obesidade foram realizadas diversas estratégias dietéticas (GERSHUNI, 2018) como em 1977, onde o primeiro Guia dietético para os americanos recomendou o aumento do consumo de carboidratos entre 55% a 60% das calorias diárias e a redução do consumo de gordura de 40% para 30%. Essas recomendações estavam apoiadas na ideia de que o consumo de gordura promovia a obesidade, por ser a maior fonte de energia da dieta (EBBELING *et al.*, 2018). Em

decorrência dessa mudança, a indústria de alimentos reformulou seus padrões para contemplar a dieta com baixo teor de gordura e assim, ocorreu à substituição das gorduras pelo açúcar e outros carboidratos refinados (farináceos e xaropes de frutose) e também pelas gorduras vegetais hidrogenadas e do tipo *trans*, atualmente são encontradas em alta porcentagem na composição da maioria dos alimentos industrializados (RIBEIRO *et al.*, 2019).

O consumo de frutose total aumentou quase 30% entre 1970 e 2000, em grande parte devido ao aumento do uso de xarope de milho com alto teor de frutose (VENTURA *et al.*, 2011). Esse aumento deve-se ao uso generalizado em muitos alimentos e bebidas adoçadas com sacarose (50% de frutose) ou xarope de milho com alto teor de frutose (42-55% de frutose) (PUTNAN, 1999).

A frutose possui características metabólicas específicas que podem contribuir potencialmente para um perfil metabólico relacionado ao aumento da adiposidade corporal, resistência à insulina e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (TEFF *et al.*, 2009). Dessa forma, a frutose tem sido bastante estudada devido às propriedades metabólicas e neuroendócrinas específicas: 1) é metabolizada quase exclusivamente no fígado; 2) auxilia como substrato para a lipogênese e direciona a síntese e o acúmulo de triglicerídeos hepáticos; 3) participa da frutação não enzimática e da formação de espécies reativas de oxigênio que levam a disfunção celular; 4) não inibe o hormônio grelina o que acarreta no consumo excessivo e 5) estimula o *nucleus accumbens* resultando em aumento da recompensa e ingestão contínua (LUSTIG *et al.*, 2016). Então, um dos fatores que contribuíram para o aumento do índice de sobrepeso foi a substituição das gorduras por carboidratos refinados e gorduras industrializadas (SIRI-TARINO *et al.*, 2010).

Considerando que a causa primária da obesidade é um desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto energético, dessa forma o caminho para o combate a obesidade é por meio do balanço energético negativo. Estudos mostraram que para alcançar o balanço energético negativo é preciso a modificação do comportamento com a combinação de dieta e atividade física (PETRIDOU *et al.*, 2019). Porém, a maioria das pessoas tem dificuldade em manter a perda de peso clinicamente significativa em longo prazo (KRASCHNEWSK *et al.*, 2010). Uma possível explicação para a recuperação do peso é referente ao comportamento, pois a motivação para seguir uma prescrição dietética geralmente diminui com o tempo e também com a



convivência no ambiente obesogênico. De fato, os estudos de intervenção comportamental apontam uma ligação direta entre adesão e perda de peso, independentemente do tratamento dietético (SACKS *et al.*, 2009).

Nos últimos 30 anos, ocorreram muitos debates sobre a composição ideal da dieta para perda e manutenção de peso. Existem muitos tipos de dietas como as dietas cetogênicas que apresentam muito baixa quantidade de carboidrato (ASTRUP *et al.*, 2004), as dietas que tem uma maior quantidade de proteína e redução do índice glicêmico dos carboidratos (LARSEN *et al.*, 2010; ASTRUP *et al.*, 2017).

Diante do exposto, este estudo comparou a administração *ad libitum* de dietas “*very low fat*” e cetogênica em camundongos a fim de elucidar os efeitos dessas dietas no metabolismo.

## **2.2 Principais hormônios relacionados à obesidade**

### **2.2.1 Leptina**

Nos últimos anos devido ao avanço da obesidade, o tecido adiposo tem sido estudado e foi observado que esse tecido não é apenas um excesso de gordura neutra, mas é a maior glândula endócrina do corpo humano que produz vários hormônios diferentes e interage com quase todos os órgãos e sistemas do organismo. Entre esses hormônios produzidos pelo tecido adiposo temos a leptina que tem papel importante na patogênese do desenvolvimento da resistência à insulina e no DM2 (MARUSYN *et al.*, 2018).

Os receptores de leptina são expressos por todo o corpo, incluindo o SNC onde a leptina atua regulando a função neuroendócrina, o comportamento alimentar e o gasto de energia (KELESIDIS *et al.*, 2010). A leptina exerce seus efeitos por meio da ligação a receptores específicos de leptina (LepRs) localizados em todo o SNC e quatro isoformas com *splicing* alternativo de LepR foram detectados em humanos. A isoforma longa do receptor de leptina (LepRb) é altamente expressa no hipotálamo e outras regiões do cérebro, onde regula a homeostase energética e a função neuroendócrina sendo considerado o principal receptor da leptina (PARK *et al.*, 2015). A ligação da leptina ao LepRb ativa várias vias de sinalização, incluindo Janus quinase 2 (JAK2) - transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), substrato do receptor de insulina (IRS) - fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), proteína tirosina contendo SH2 fosfatase 2 (SHP2) - proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), e 5'adenosina monofosfatada proteína quinase (AMPK)/acetil-CoA carboxilase (ACC)

e outras vias. A cascata de sinalização da leptina é encerrada pela indução do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3), que inibe a via JAK2-STAT3 por meio do ciclo de *feedback* negativo. A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) também está incluída na inibição da sinalização da leptina (DALAMAGA *et al.*, 2013). A sinalização de ativação JAK2-STAT3 desempenha um papel importante na capacidade da leptina de regular a homeostase energética (DARDENO *et al.*, 2010).

A leptina é expressa pelos adipócitos e as concentrações de leptina no tecido adiposo e no plasma são concomitantes à massa do tecido adiposo e conteúdo de triglicérides. Assim, a leptina aumenta na obesidade e diminui com a perda de peso. A leptina é transportada por meio de um processo saturável através da barreira hematoencefálica (AHIMA *et al.*, 2008). Especificamente, a leptina inibe o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à agouti (AgRP) que são orexígenos e aumentam a ingestão de alimentos, e estimula a proopiomelanocortina (POMC) que por sua vez ativa fatores anorexígenos, como o hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) que inibem a ingestão alimentar (FARR *et al.*, 2015). Portanto, a leptina circulante é absorvida pelo cérebro onde atua na regulação da ingestão de alimentos, comportamentos apetitivos e gasto de energia. Além de exercer função na saciedade, a leptina tem sido envolvida em vários processos endocrinológicos e fisiológicos incluindo a regulação da homeostase energética, termogênese, reprodução, hematopoiese, crescimento esquelético, neuroproteção e oncogênese (WANG *et al.*, 2014).

A instalação da resistência à leptina é considerada uma das principais causas do aparecimento da obesidade. Embora que as propriedades anorexígenas e catabólicas da leptina estejam bem caracterizadas, a leptina de ação central é importante para a manutenção da homeostase da glicose sendo um potente sensibilizador à insulina. Como a obesidade causa a insensibilidade à insulina, o primeiro estágio no desenvolvimento do DM2, a resistência à leptina foi proposta como o principal mecanismo que liga essas duas condições. Assim, a perda da função da leptina e suas consequências na manutenção do balanço energético foram bem descritas com o uso dos camundongos (*ob/ob*), que servem como modelo animal de ocorrência natural para essa condição metabólica (KOCH *et al.*, 2014). Portanto, a falta de leptina em camundongos (*ob/ob*) ou de seu receptor funcional em camundongos (*db/db*) acarreta em obesidade e também em distúrbios metabólicos,

incluindo resistência à insulina e diabetes (ROH *et al.*, 2016). Desse modo, a leptina demonstrou contribuir não apenas para a regulação do peso corporal normal, mas também para o controle fisiológico dos níveis de glicose no sangue. Russo *et al.* (2021), relataram recentemente que a leptina pode melhorar a homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina, aumentando os níveis periféricos de captação de glicose nos tecidos e redução da produção de glicose no fígado. No entanto, a resistência à leptina em indivíduos obesos pode colaborar para o desenvolvimento de resistência à insulina.

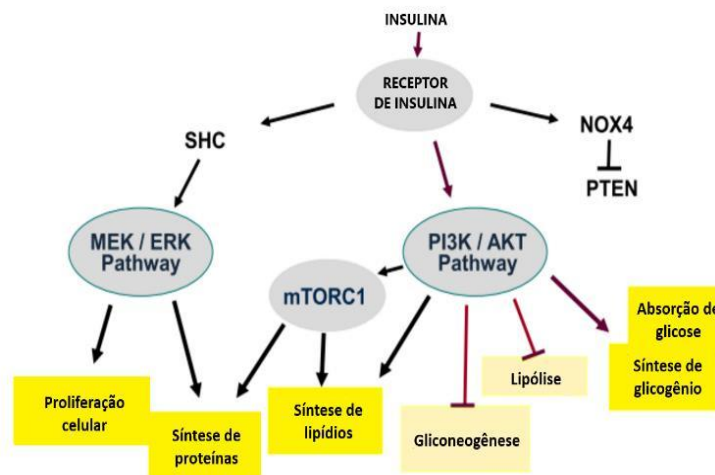
### 2.2.2 Insulina

A insulina é indispensável para manutenção da homeostase da glicose, principalmente por ajudar na captação de glicose após as refeições para os músculos e células de gordura por meio da translocação do transportador de glicose-4 (KLIP *et al.*, 2019). Na ausência de fornecimento de glicose na dieta e após esvaziar os estoques de glicogênio, a glicose na circulação deriva principalmente da gliconeogênese no fígado. No entanto, se os níveis de insulina circulante estiverem abaixo das concentrações necessárias para estimular a captação de glicose do sangue, os estoques endógenos de gordura e de proteína são usados para a produção de energia (LI *et al.*, 2006).

Durante o estado pós-prandial, a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas controla a homeostase sistêmica dos nutrientes, possibilitando os processos anabólicos em vários tecidos. A insulina estimula o influxo de glicose no músculo e na gordura, síntese de proteína e glicogênio no músculo e no fígado, síntese e armazenamento de lipídios no fígado e gordura, enquanto inibe a oxidação de ácidos graxos, glicogenólise e gliconeogênese, tal como apoptose e autofagia em tecidos responsivos à insulina. Já no jejum, a secreção de insulina diminui e os tecidos se organizam com a ajuda dos hormônios contrarreguladores como o glucagon no fígado e na gordura, fazendo uso de ácidos graxos derivados da lipólise de adipócitos para a geração de ATP e manutenção da homeostase da glicose (GUO, 2014). Os efeitos biológicos da insulina são mediados pela ligação ao receptor de insulina que consiste em duas subunidades  $\alpha$  de ligação à insulina extracelular e duas subunidades  $\beta$  da tirosina quinase intracelular. O *splicing* alternativo do gene do receptor de insulina resulta em duas isoformas de receptor de insulina: receptor de insulina A e receptor de insulina B (KELERRER *et al.*, 1992). Essa ativação do receptor mediada por

insulina leva à ativação e autofosforilação do receptor tirosina quinase e inicia várias cascatas de eventos de fosforilação (KASUGA *et al.*, 1982).

Desse modo, a sinalização da insulina através do receptor de insulina envolve várias vias e resulta em um estado anabólico do metabolismo. A via canônica via fosfoquinases *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) e *serine/threonine-specific protein kinase B* (AKT) proporcionam a captação de glicose, glicogênio e lipídios enquanto a lipólise é inibida nos adipócitos assim como a gliconeogênese hepática. Além disso, as quinases AKT ativam *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1), que leva a lipogênese e a síntese de proteínas e também tem a via de sinalização da insulina via SHC e as quinases *mitogen-activated protein kinase* (MEK) e *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). A ERK promove a proliferação celular e a síntese de proteínas, outra via de sinalização da insulina envolve NADPH oxidase 4 (NOX4) e a inibição de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) que é um inibidor da via PI3K-AKT como mostra na Figura 2 (KOLB *et al.*, 2020).



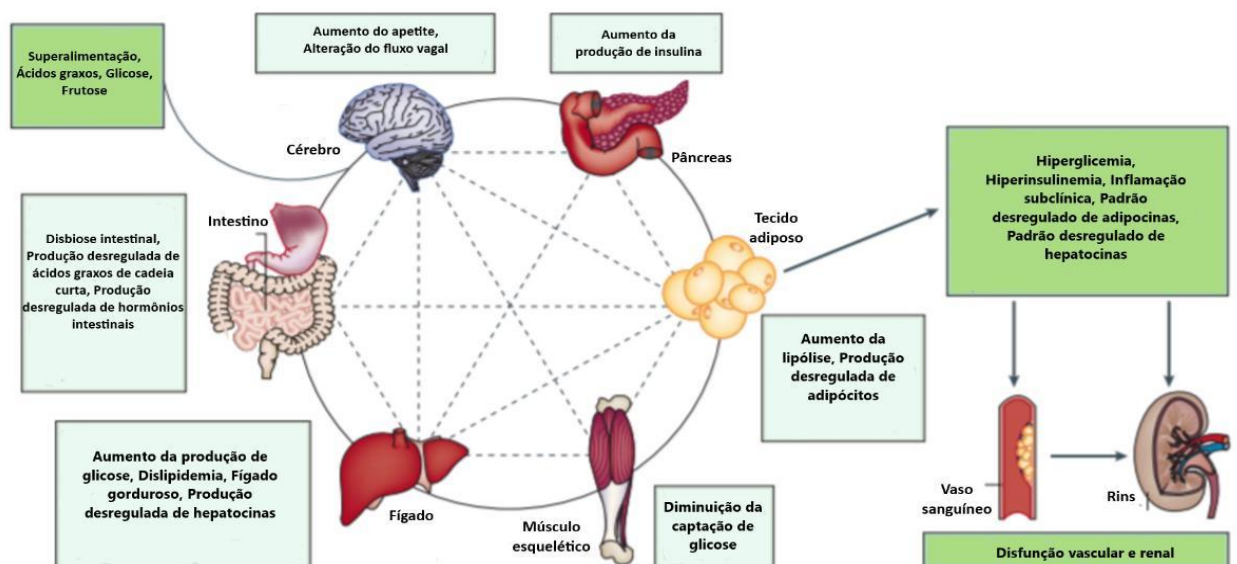
Fonte: Adaptado de KOLB *et al.* (2020).

Figura 2. As vias de sinalização de insulina.

No estado de resistência à insulina, a resposta celular à insulina é reduzida, assim a ativação da via de sinalização da insulina necessita de concentrações aumentadas desta. Existem fatores crônicos que contribuem para a resistência à insulina como a hiperinsulinemia, hiperglicemia, inflamação, excesso de lipídios,

disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático (BOUCHER *et al.*, 2014).

A resistência à insulina é uma condição que está presente na obesidade, síndrome metabólica e no DM2. Neste, o organismo desenvolve resistência às ações biológicas da insulina inclusive no fígado, afetando o controle dos níveis de glicose no sangue e como resultado a hiperglicemia de jejum. Acredita-se que a resistência à insulina no fígado esteja relacionada ao sistema intracelular com acúmulo de lipídios, o que leva a defeitos na sinalização da insulina por meio de mecanismos bioquímicos específicos. A resistência à insulina, quando associada ao comprometimento da secreção de insulina estimulada pela glicose, acaba levando à hiperglicemia de jejum devido ao comprometimento da supressão da produção hepática de glicose (NISWENDER, 2011). Como consequência, a resistência à insulina prejudica muitos órgãos e vias celulares reguladas pela ação da insulina. Além disso, sinais metabólicos ou hormonais ficam alterados favorecendo a disfunção orgânica e o aparecimento de doença como mostra a Figura 3 (ARTUNC *et al.*, 2016).



Fonte: Adaptado de Artunc *et al.* (2016).

**Figura 3.** Efeitos metabólicos da resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético e efeitos não clássicos em outros órgãos, incluindo cérebro, intestino, pâncreas, vaso sanguíneo e rim.

### 2.2.3 Hormônios gastrointestinais relacionados com a obesidade

As sensações de fome e de saciedade são determinantes para o controle da ingestão alimentar e do peso corporal. Os indivíduos saudáveis possuem um equilíbrio entre a sensação de fome que antecede a refeição e a sensação de saciedade que ocorre após a assimilação dos nutrientes. Na obesidade, esse equilíbrio está desregulado promovendo um atraso na sensação de plenitude (LITTLE *et al.*, 2011). Portanto, os mecanismos subjacentes à mudança da sensação de fome para a sensação de saciedade após uma refeição englobam a modulação da distensão gástrica e mudanças na motilidade intestinal (JANSSEN *et al.*, 2011). Além disso, vários hormônios gastrointestinais são secretados em resposta à assimilação da refeição. Esses hormônios têm um papel na supressão progressiva da fome que ocorre após as refeições (MITHIEUX, 2014).

Durante e após as refeições, os nutrientes ingeridos modificam a liberação de peptídeos intestinais que podem modular a ingestão de alimentos e contribuem para um processo composto por três etapas: início da refeição, saciedade dentro da refeição e influências da saciedade entre as refeições (MORAN, 2009).

#### a) Início da refeição:

Durante a fome ou o jejum, o hormônio grelina é liberado do trato gastrointestinal superior para aumentar o apetite e regular o complexo motor de migração gástrica (MMC) que são movimentos no estômago e no intestino delgado influenciado pela ingestão de alimentos. Em humanos, cerca de 80-90% da grelina está localizada no estômago, onde é liberada pelas células endócrinas nas glândulas oxínticas do fundo e do corpo e, em menor extensão, do antro, duodeno, jejuno, íleo e cólon (SANGER *et al.*, 2015).

A grelina estimula a síntese do NPY e da proteína AgRP em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, que por sua vez aumentam a ingestão de alimentos (GIL-CAMPOS *et al.*, 2006).

Ademais, a grelina estimula muitas regiões do cérebro que estão ligadas a recompensa e motivação, incluindo a área tegmental ventral e o hipocampo e também propicia o consumo de alimentos hedônicos ao aumentar a via de sinalização da recompensa. A secreção de grelina compreende o sistema nervoso simpático e é mediada por receptores  $\beta 1$  na célula de grelina. Os níveis plasmáticos de grelina são mais baixos em pacientes obesos, essa diminuição é vista mais como compensatória

do que causal e reflete uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo (FARHADIPOUR *et al.*, 2021). Além disso, os pacientes obesos quase não apresentam declínio pós-prandial em resposta à ingestão de alimentos e tem ausência de flutuações associadas às refeições o que pode estimular continuamente o apetite (ENGLISH *et al.*, 2002). No entanto, os pacientes obesos após perda de peso por meio de dieta podem reestabelecer a sensibilidade à grelina que é acompanhada por um aumento nos níveis de grelina no plasma (DRUCE *et al.*, 2005).

b) Sinalização de saciedade dentro da refeição:

Após a refeição, os nutrientes transitam para o estômago e intestino liberando múltiplos sinais gastrointestinais. Os peptídeos intestinais estão presentes para otimizar o processo digestivo como a colecistocinina (CCK), glucagon pancreático e amilina. A CCK é amplamente distribuída no trato gastrointestinal, mas a maioria é sintetizada no duodeno e jejuno. É rapidamente liberada nos tecidos circundantes e na circulação em resposta aos nutrientes, principalmente em refeições ricas em gordura e proteínas no intestino, com os níveis aumentando aproximadamente cinco vezes no pós-prandial. Suas principais ações incluem retardar o esvaziamento gástrico, estimular a secreção de enzimas pancreáticas e estimular a contração da vesícula biliar e também favorecer a digestão das gorduras e proteínas no intestino delgado. Além disso, inibe a ingestão de alimentos (DEL PRETE *et al.*, 2012).

Os peptídeos pancreáticos como o glucagon e amilina, compartilham várias propriedades com a CCK. Estes possuem padrões semelhantes de liberação em resposta à ingestão de alimentos onde os níveis plasmáticos aumentam rapidamente com a alimentação e retornam aos níveis próximos à linha de base com o término da refeição (LUTZ *et al.*, 1995).

As ações inibitórias do glucagon na alimentação são mediadas periféricamente e dependem da sinalização vagal hepática intacta e as ações da amilina são mediadas centralmente. As ações da amilina são mediadas pela área postrema, um órgão circunventricular com uma barreira hematoencefálica porosa. A área postrema expressa receptores de amilina e as lesões da área postrema bloqueiam as ações de saciedade da amilina (MORAN, 2009).

c) Sinalização da saciedade ao longo da refeição:

Outros peptídeos intestinais atuam após as refeições, estimulando a liberação como o peptídeo YY e o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) que são

sintetizados e liberados pelas células L localizadas no intestino distal. As elevações no plasma do PYY e GLP-1 ocorrem mais lentamente, não atingindo o pico até o final da refeição e permanecendo alto por várias horas após a refeição. Então, o PYY é liberado na circulação após as refeições e é suprimido pelo jejum (BALLATYNE *et al.*, 2006). O GLP-1 desempenha uma série de ações gastrointestinais: estimula a secreção de insulina induzida por glicose e regula positivamente a expressão do gene da insulina; potencializa todas as etapas da biossíntese da insulina; melhora a sensibilidade à glicose das células  $\beta$  pancreáticas resistentes e redução no esvaziamento gástrico (BURCELIN *et al.*, 2010).

#### **2.2.4 Outros hormônios peptídicos relacionados com a obesidade**

Os hormônios peptídicos desempenham um papel importante no controle da homeostase energética e do metabolismo. Adropina é um produto do gene associado à homeostase energética (*ENHO*) identificado recentemente como um novo fator envolvido na ingestão de nutrientes e homeostase metabólica em camundongos obesos resistentes à insulina (KUMAR *et al.*, 2008). Um declínio nos níveis de adropina pode estar relacionado a um maior risco de obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica, já altos níveis de adropina pode contribuir para promover a utilização de glicose, melhora da hiperinsulinemia, esteatose hepática e dislipidemia na obesidade (YIN *et al.*, 2020).

Os níveis de adropina são afetados pelo peso corporal, composição da dieta e várias preferências alimentares. Foi visto que os baixos níveis de adropina são preditores de ganho de peso corporal em animais com uma dieta enriquecida com frutose. Há evidências indicando que os níveis de adropina podem ser afetados pelo diabetes, assim os níveis séricos de adropina são mais baixos em pacientes DM2 comparados aos controles saudáveis e também baixos níveis de adropina no DM2 é considerado um fator de risco para disfunção endotelial (JASASZWILI *et al.*, 2021). Corroborando com o exposto, o estudo de Stevens *et al.* (2016), observaram que indivíduos com baixas concentrações plasmáticas de adropina apresentaram maior ingestão de carboidratos como açúcares simples e carboidratos complexos sem diferença na ingestão de fibras.

O tecido adiposo, o intestino, a pele e o músculo são todos órgãos endócrinos dinâmicos que secretam uma série de hormônios ou substâncias semelhantes a hormônios com atribuições consideráveis na manutenção da homeostase da energia



celular e na regulação das funções metabólicas. Um desses hormônios é o polipeptídeo irisina recentemente descoberto, mais conhecido como a quimiocina induzida por exercício que é liberada principalmente pelo músculo e tecido adiposo. A irisina favorece a captação de glicose pelos músculos esqueléticos, melhora a glicose hepática e o metabolismo lipídico, tendo um efeito positivo na hiperlipidemia e hiperglicemia causada pela obesidade e síndrome metabólica e, portanto, atua como um hormônio sensibilizador da insulina (ARHIRE *et al.*, 2019).

A apelina pertence à família das adipocinas que são mediadores bioativos liberados pelo tecido adiposo. A expressão de apelina transcorre amplamente em muitos tipos de tecidos fazendo com que a apelina esteja envolvida em vários processos fisiológicos como angiogênese, metabolismo energético e regulação da homeostase dos fluídos e do sistema cardiovascular. Portanto, o sistema apelinérgico pode participar de algumas patologias incluindo insuficiência cardíaca, doenças relacionadas à hipóxia, obesidade, diabetes e câncer (WYSOCKA *et al.*, 2018). Como observou o estudo de Krist *et al.* (2013), onde as concentrações séricas altas de apelina em humanos estavam associadas ao IMC mais alto, assim como glicose plasmática elevada, triglicerídeos e resistência à insulina.

A galanina, spexina e kisspeptina são três peptídeos bioativos relacionados que ganharam atenção considerável por suas funções na regulação da homeostase energética, humor e no comportamento. A galanina tem efeitos na homeostase da glicose em várias espécies, a galanina pode desempenhar um papel inibidor na secreção de insulina mediada neuralmente, em oposição a ser um regulador positivo da secreção de insulina regulada por nutriente (MILLS *et al.*, 2021).

Quanto a spexina, Kolodziejcki *et al.* (2018), encontraram uma correlação negativa com spexina e resistência à insulina (HOMA-IR), insulina sérica, glucagon, grelina ativa, leptina e orexina-A. Os níveis séricos de spexina são baixos em pacientes com DM2 e se correlacionam negativamente com os níveis de glicose no sangue em jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), triglicerídeos e colesterol LDL (GU *et al.*, 2015).

A kisspeptina tem sido reconhecida como um importante fator de maturação e reprodução atuando no SNC. Sua expressão também foi demonstrada em tecidos periféricos envolvidos no metabolismo de carboidratos e de lipídios, ou seja, no tecido adiposo, fígado e pâncreas. Kisspeptina também tem sido vista como uma conexão

entre a reprodução e o estado de energia do corpo. Para reprodução é necessário alto consumo de energia e a maturação requer um suprimento adequado de nutrientes (KOŁODZIEJSKI *et al.*, 2021).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

Comparar o impacto das dietas: *very low fat*, cetogênica, intermitente *very low fat* e cetogênica no metabolismo de camundongos C57BL/6.

#### 3.2 Objetivos específicos

a) Comparar dieta com baixíssimo teor de lipídios e rica em carboidratos (*very low fat*); dieta com baixíssima quantidade de carboidratos e alta quantidade de gorduras (cetogênica) com a dieta controle balanceada em relação ao ganho de peso, composição corporal, parâmetros bioquímicos e morfológicos;

b) Comparar administração intermitente destas dietas (*very low fat* e cetogênica) intercalando períodos com dietas balanceadas, assim representando a falta de adesão dos seres humanos às intervenções dietéticas;

c) Avaliar regulação da glicemia e da resistência à insulina entre as diferentes dietas;

d) Avaliar alterações na expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico nos tecidos do fígado, músculo e rins.

#### 4. Referências Bibliográficas

1. ADAMS, R.C. *et al.* Food Addiction: Implications for the Diagnosis and Treatment of Overeating. **Nutrients**, v.11, n.9, 2019.
2. AHIMA, R.S.; ANTWI, D.A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.37, n.4, p.811-823, 2008.
3. ALISSA, D.S.; BARBARA, J.R. Dietary management of obesity: Cornerstones of healthy eating patterns. **Medical Clinics of North America**, v.102, n.1, p.107-124, 2018.
4. ASKARI, M. *et al.* Ultra-processed food and the risk of overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **International Journal of Obesity**, v.44, n.10, p.2080-2091, 2020.
5. ARHIRE, L.I.; MIHALACHE, L.; COVASA, M. Irisin: A Hope in Understanding and Managing Obesity and Metabolic Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v.10, 2019.
6. ARTUNC, F. *et al.* The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. **Nature Reviews**, v.12, 2016.
7. ASTRUP, A. *et al.* The role of low-fat diets in body weight control: a meta-analysis of ad libitum dietary intervention studies. **International Journal of obesity and related metabolic disorders**, v.24, n.12, p. 1545-1552, 2000.
8. ASTRUP, A.; LARSEN, T.M.; HARPER, A. Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss? **Lancet**, v. 364, p.897-899, 2004.
9. ASTRUP, A.; HJORTH, M.F. Low-Fat or Low Carb for Weight Loss? It Depends on Your Glucose Metabolism. **EBioMedicine**, v.22, p.20-21, 2017.
10. BARROS, C.C. *et al.* Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. **PLoS One**, v.7, 2012.
11. BALLATYNE, G.H. Peptide YY (1-36) and Peptide YY (3-36): Part I. Distribution, Release and Actions. **Obesity Surgery**, v.16, n.5, p.651-658, 2006.
12. BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C.R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v.6, n.1, 2014.
13. BURCELIN, R.; DEJAGER, S. GLP-1 What is known, new and controversial in 2010? **Diabetes & Metabolism**, v.36, p.503-509, 2010.
14. BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPKIN, B.M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n. 4, p. 537-543, 2004.
15. CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Advances in Nutrition**, v.10, S4-S9, 2019.
16. CARTER, A. *et al.* The Neurobiology of "Food Addiction" and Its Implications for Obesity Treatment and Policy. **Annual Review of Nutrition**, v.17, n.36, p.105-128, 2016.
17. CHOOI, Y.C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v.92, p.06-10, 2019.
18. DALAMAGA, M. *et al.* Leptin at the Intersection of Neuroendocrinology and Metabolism: Current Evidence and Therapeutic Perspectives. **Cell Metabolism**, v.18, n.1, p.29-42, 2013.
19. DARDENO, T.A. *et al.* Leptin in human physiology and therapeutics. **Frontiers Neuroendocrinology**, v.31, p. 377-393, 2010.

20. DAVIS, C. *et al.* Evidence that 'Food Addiction' is a Valid Phenotype of Obesity. **Appetite**, 57, n.3, p.711–717, 2011.
21. DEL PRETE, A.; IADEVAIA, M.; LOGUERCIO, C. The role of gut hormones in controlling the food intake. What is their role in emerging diseases? **Endocrinología Y Nutrición**, v.59, n.3, p.197-206, 2012.
22. DOURMASHKIN, J.T. *et al.* Different forms of obesity as a function of diet composition. **International Journal of Obesity**, v.29, n.11, 1368-1378, 2005.
23. DRUCE, M.R. *et al.* Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. **International Journal of Obesity**, v.29, p.1130–1136, 2005.
24. EBBELING, C.B.; YOUNG, I.S. Dietary fat: friend or foe? **Clinical Chemistry**, v.64, n.1, p.34-41, 2018.
25. ENGLISH, P.J.; GHATEI, M.A.; MALIK, I.A.; WILDING, J.P. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.6, p.2984-2987, 2002.
26. FARR, O.M.; GAVRIELI, A.; MANTZOROS, C.S. Leptin applications in 2015: What have we learned about leptin and obesity? **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v.22, n.5, p.353-359, 2015.
27. FARHADIPUR, M.; DEPOORTERE, I. The Function of Gastrointestinal Hormones in Obesity—Implications for the Regulation of Energy Intake. **Nutrients**, v.13, n.6, 2021.
28. FREIRE, R. Scientific evidence of diets for weight loss: Different macronutrient composition, intermittent fasting, and popular diets. **Nutrition**, 2020.
29. GEARHARDT, A.N.; DAVIS, C.; KUSCHNER, R.; BROWNELL, K.D. The addiction potential of hyperpalatable foods. **Current Drug Abuse Reviews**, v.4, n.3, p.14-145, 2011.
30. GERSHUNI, V.M. Saturated Fat: Part of a Healthy Diet. **Current Nutrition Reports**, v.7, n.3, p.85-96, 2018.
31. GIL-CAMPOS, M.; AGUILERA, C.M.; CANETE, R.; GIL, A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. **British Journal of Nutrition**, v.96, p.201-226, 2006.
32. GOODARZI, M.O. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. **Lancet Diabetes Endocrinology**, 2017.
33. GU, L. *et al.* Spexin peptide is expressed in human endocrine and epithelial tissues and reduced after glucose load in type 2 diabetes. **Peptides**, v.71, p.232-239, 2015.
34. GUO, S. Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v.220, n.2, 2014.
35. JANSSEN, P. *et al.* Review article: the role of gastric motility in the control of food intake. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.33, n.8, p. 880-894, 2011.
36. JASASZWILI, M. *et al.* Adropin as a Fat-Burning Hormone with Multiple Functions—Review of a Decade of Research. **Molecules**, v.25, n.3, 2021.
37. KASUGA, M.; KARLSSON, A.; KAHN, C.R. Insulin Stimulates the Phosphorylation of the 95,000-Dalton Subunit of Its Own Receptor. **Science**, v.215, n.4529, p.185-187, 1982.
38. KELERRER, M. *et al.* Distinct  $\alpha$ -Subunit Structures of Human Insulin Receptor A and B Variants Determine Differences in Tyrosine Kinase Activities. **Biochemistry**, v.31, p.4588-4596, 1992.

39. KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; CHOU, S.; MANTZOROS, C.S. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. **Annals of Internal Medicine**, v.152, n.2, p.93-100, 2010.
40. KITAHARA, C.M. *et al.* Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m<sup>2</sup>) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. **PLoS Med**, v.11, n.7, 2014.
41. KOCH, C.E. *et al.* High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v.26.n.2, p. 58-67, 2014.
42. KOCHANEK, K.D.; MURPHY, S.; XU, J.; ARIAS, E. Mortality in the United States, 2016. **NCHS Data Brief**, v.293, p.01–08, 2017.
43. KOLB, H.; KEMPF, K.; ROHLING, M.; MARTIN, S. Insulin: too much of a good thing is bad. **BMC Medicine**, v.18, n.224, 2020.
44. KOLODZIEJSKI, P.A. *et al.* Serum Levels of Spexin and Kisspeptin Negatively Correlate With Obesity and Insulin Resistance in Women. **Physiological Research**, v.67, n.1, p.45-56, 2018.
45. KOLODZIEJSKI, P.A. *et al.* The Role of Peptide Hormones Discovered in the 21st Century in the Regulation of Adipose Tissue Functions. **Genes**, v.12, n.5, 2021.
46. KONG, C. *et al.* Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high fat or high-sucrose diet. **Nutrition**, v.60, p.175-184, 2019.
47. KUMAR, K.G. *et al.* Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. **Cell Metabolism**, v.8, n.6, p.468-481, 2008.
48. KLIP, A.; MCGRAW, T.E.; JAMES, D.E. Thirty sweet years of GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, v.294, n.30, p.11369-1138, 2019.
49. KRASCHNEWSKI, J.L. *et al.* Long-term weight loss maintenance in the United States. **International Journal of Obesity**, v. 34, n.11, p.1644-1654, 2010.
50. KRIST, J. *et al.* Effects of Weight Loss and Exercise on Apelin Serum Concentrations and Adipose Tissue Expression in Human Obesity. **Obesity Facts**, v.6, n.1, p.57-69, 2013.
51. LARSEN, T.M. *et al.* For the diet, obesity, and genes (Diogenes) project. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. **New England Journal of Medicine**, v.362, p.2102–2113, 2010.
52. LEIGH, S.J.; MORRIS, M.J. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. **Biological Psychology**, v.131, p.31-42, 2018.
53. LENNERZ, B.; LENNERZ, J.K. Food Addiction, High Glycemic Index Carbohydrates and Obesity. **Clinical Chemistry**, v. 64, n.1, p.64-71, 2018.
54. LI, C. *et al.* Trends in Hyperinsulinemia Among Nondiabetic Adults in the U.S. **Diabetes Care**, v.29, p. 2396-2402, 2006.
55. LINDGREN, E. *et al.* Food addiction: A common neurobiological mechanism with drug abuse. **Frontiers in Bioscience**, v.23, p.811-836, 2018.
56. LITTLE, T.J.; FEINLE-BISSET, C. Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity – Oral and gastrointestinal sensory contributions. **Physiology & Behavior**, v.104, n.4, p.613-620, 2011.
57. LUSTIG, R.H. *et al.* Isocaloric fructose restriction and metabolic improvement in children with obesity and metabolic syndrome. **Obesity**, v.24, n.2, p.453-460, 2016.
58. LUSTIG, R.H. Ultraprocessed Food: Addictive, Toxic, and Ready for Regulation. **Nutrients**, v.12, n.11, 3401, 2020.

59. LUTZ, T.A. *et al.* Amylin Decreases Meal Size in Rats. **Physiology & Behavior**, v.58, n.6, p.1197-1202, 1995.
60. MARUSYN, O.V. The relationship between obesity, glycemia and leptin level of type 2 diabetes mellitus patients with metabolic syndrome. **Wiad Lek Journal**, v.71, n.6, p. 1165-1168, 2018.
61. MEULE, A. Back by Popular Demand: A Narrative Review on the History of Food Addiction Research. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.88, p.295-302, 2015.
62. MILLS, E.G. *et al.* Functions of galanin, spexin and kisspeptin in metabolism, mood and behaviour. **Nature Reviews**, v.17, n.2, p.97-113, 2021.
63. MITHIEUX, G. Metabolic effects of portal vein sensing. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.16, p.56-60, 2014.
64. MONTEIRO, C. The big issue is ultra-processing. **World Nutrition**, v.1, n. 6, p. 237-269, 2010.
65. MONTEIRO, C.A. *et al.* Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity reviews**, v.14, p.21-18, 2013.
66. MORAN, T.H. Gut peptides in the control of food intake. **International Journal of Obesity**, v.33, S7–S10, 2009.
67. MOREIRA, A.P.B.; *et al.* Evolução e interpretação das recomendações nutricionais para os macronutrientes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.27, n.1, p.51-59, 2012.
68. MARSHALL, R.O.; KOOI, E.R. Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose. **Science**, v.125, n. 3249, p. 648-649, 1957.
69. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-Risc). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n.10026, p.1377–1396, 2016.
70. NISWENDER, K.D. Basal Insulin: Physiology, Pharmacology, and Clinical Implications. **Postgraduate Medicine**, v.123, n.4, p.17-26, 2011.
71. PAOLI, A. *et al.* Ketogenic diet and microbiota: Friends or Enemies? **Genes**, v.10, n.7, 2019.
72. PARK, H.K.; AHIMA, R.S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism**, v.64, n.1, p.24-34, 2015.
73. PETRIDOU, A.; SIOPI, A.; MOUGIOS, V. Exercise in the management of obesity. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.92, p. 163-169, 2019.
74. PIETILAINEN, K.H.; SAARNI, S.E.; KAPRIO, J.; RISSANEN, A. Does dieting make you fat? A twin study. **International Journal of Obesity**, v.36, p.456-464, 2012.
75. POPKIN, M.B.; ADAIR, L.S.; NG, S.W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n.1, p.03-21, 2012.
76. PUTNAM, J.J.; ALLSHOUSE, J.E. Food consumption, prices and expenditures, 1970–1997. **Economic Research Service**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 1999.
77. RAHMANI, A. *et al.* Investigation of the prevalence of obesity in Iran: a systematic review and meta-analysis study. **Acta Medica Iranica**, v.53, 596–607, 2015.75.
78. RIBEIRO, L.G.T.; OLIVO, R. O mito das gorduras saturadas e do colesterol: seis décadas de enganação que têm prejudicado a saúde e o bem-estar das pessoas- Parte 1: desvendando o mito. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.27, n.2, p-52-65, 2019.

79. ROH, E.; SONG, DK.; KIM, M.S. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. **Experimental & Molecular Medicine**, v.48, 2016.
80. RUSSO, B. *et al.* Autonomic Nervous System in Obesity and Insulin-Resistance — The Complex Interplay between Leptin and Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.10, 2021.
81. SACKS, F.M.; BRAY, G.A.; CAREY, V.J.; SMITH, S.R.; RYAN, D.H.; ANTON, S.D. *et al.* Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n.9, p. 859-873, 2009.
82. SANGER, G.J.; FURNESS, J.B. Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.13, n.1, p.38-48, 2016.
83. SIRI-TARINO, P.W.; SUN, Q.; HU, F.B.; KRAUSS, R.M. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.3, p.502-509, 2010.
84. SOLEYMANI, T.; DANIEL, S.; GARVEY, W.T. Weight maintenance: challenges, tools and strategies for primary care physicians. **Obesity Reviews**, v.17, n.1, p.81-93, 2016.
85. SULAITI, H. *et al.* Metabolic signature of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. **Journal of Translational Medicine**, v.17, n.348, 2019.
86. SCHULTE, E.M.; AVENA, N.M.; GEARHARDT, A.N. Which foods may be addictive? The roles of processing, fat content, and glycemic load. **PLoS One**, v.10, n.2, 2015.
87. STEVENS, J. R. *et al.* Inverse association between carbohydrate consumption and plasma adiponin concentrations in humans. **Obesity (Silver Spring)**, v. 24, n.8, p. 1731-1740, 2016.
88. STOECKEL, L.E. *et al.* Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods. **NeuroImage**, v.41, 636–647, 2008.
89. TAPPY, L.; LÉ, K.A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological Reviews**, v.90, n.1, p. 23-46, 2010.
90. TEFF, K.L. *et al.* Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.94, n.5, p.1562-1569, 2009.
91. The GBD 2015 Obesity Collaborators, AFSHIN, A.; FOROUNZANFAR, M.H.; REITSMA, M.B. *et al.* Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **The New England Journal of Medicine**, v.377, n.1, p.13-27, 2017.
92. US Senate Select Committee on Nutrition and Human Needs, *Dietary Goals for the United States*, 2nd ed. (Washington, DC: US Government Printing Office, 1977).
93. VENTURA, E.E.; DAVIS, J.N.; GORAN, M.I. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: Focus on fructose content. **Obesity**, v.19, n.4, p. 868–874, 2011.
94. VOLKOW, N.D.; O'BRIEN, CP. Issues for DSM-V: should obesity be included as a brain disorder? **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, n.5, p. 708-710, 2007.



95. WANG, B.; CHANDRASEKERA, C.; PIPPIN, J.J. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v.10, n.2, p.131-145, 2014.
96. WANG, G.J. *et al.* Enhanced resting activity of the oral somatosensory cortex in obese subjects. **Neuroreport**, v.13, p.1151-1155, 2002.
97. WEBER, D.D. *et al.* Ketogenic diet in treatment of cancer – Where do we stand? **Molecular Metabolism**, v.33, p.102-121, 2019.
98. WYSOCKA, M.B.; PIETRASZEK-GREMPLEWICZ, K.; NOWAK, D. The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. **Frontiers in Physiology**, v.9, 2018.
99. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916. Geneva: WHO, 2003.
100. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight; 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em maio, 2021.
101. YIN, C.; ZHANG, H.; ZHANG, M.; XIAO, Y. Adropin and apelin-12 efficiently predict metabolic syndrome in obese children. **Pediatric Diabetes**, v.21, n.7, p. 1132-1139, 2020.
102. ZOBEL, E.H; HANSEN, T. W.; ROSSING, P.; SCHOLTEN, B.J. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. **Current Obesity Report**, v.5, n.4, p.449-455, 2016.

## 5. Anexos

### 5.1 Artigo 1:

Artigo redigido nas normas da revista *Journal of Nutrition and Metabolism*,  
disponível em:

[Author Guidelines - Journal of Nutrition and Metabolism - Wiley Online Library](#)

**COMPARAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO *AD LIBITUM* DE DIETAS “*VERY LOW FAT*” E CETOGÊNICA EM CAMUNDONGOS E OS REFLEXOS FISIOLÓGICOS DA NÃO ADESÃO**

Clédia Silveira Flores da Silva<sup>1\*</sup> | Alice Künzgen Scheer<sup>1</sup> | Amanda Barbosa Atrib<sup>1</sup> | Marcello de Souza Alves<sup>1</sup> | André Felipe Rodrigues <sup>2</sup> | Michael Bader<sup>2</sup> | Ines Shadock<sup>3</sup> | Simone Pieniz<sup>1</sup> | Augusto Schneider<sup>1</sup> | Carlos Castilho de Barros <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul - Brasil.

<sup>2</sup> Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Campus Buch, Berlim - Alemanha.

<sup>3</sup> Instituto Federal de Acesoamento de Riscos, Berlim - Alemanha.

\*Correspondente: R Gomes Carneiro- Campus Porto-RS-Brasil CEP96010 900

Endereço de email: [clediajag@gmail.com](mailto:clediajag@gmail.com)

Título curto: Comparação da dieta *very low fat* e cetogênica

Short title: Very Low Fat vs. Ketogenic Diet

## Resumo

Tem sido comum no tratamento para obesidade a adoção de estratégias dietéticas por meio de dietas com baixo teor de gordura ou carboidratos. Este estudo comparou dieta *ad libitum very low fat* com dieta cetogênica, analisando seus efeitos metabólicos e as consequências da falta de adesão por meio de grupos intermitentes. Foram usados 26 camundongos machos, divididos em cinco grupos: controle (Ctrl), *very low fat* (VLF), cetogênica (KD), intermitente *very low fat* (IVLF) e intermitente cetogênica (IKD). A expressão de enzimas glicolíticas e lipolíticas nos tecidos hepático, renal e muscular foi avaliada por PCR quantitativo. O grupo KD reduziu o percentual de gordura corporal a partir da 16<sup>a</sup> semana, apresentando valores significativamente menores na 22<sup>a</sup> semana em comparação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Além disso, a expressão do transportador de glicose 2 foi menor em relação ao Ctrl ( $p = 0,0327$ ) e VLF ( $p = 0,0128$ ). A expressão de *Stearyl-CoA reductase 1* também foi menor no grupo KD em comparação ao Ctrl ( $p = 0,0244$ ). Em contrapartida, o grupo IKD apresentou aumento na ingestão alimentar e no percentual de gordura corporal nas semanas 17 a 19, além expressão elevada de *Stearyl-CoA reductase 1* em relação ao grupo KD ( $p = 0,0279$ ). A *Stearyl-CoA reductase 1* estava mais elevada no grupo IVLF do que no KD ( $p = 0,0196$ ), e a expressão de *Acetyl-CoA carboxilase 1* também foi maior no IVLF ( $p = 0,0243$ ). Conclui-se que a dieta cetogênica promove perda de peso e altera a expressão genética de enzimas lipogênicas. O ganho de peso no grupo IKD sugere que a dificuldade em manter a adesão a dietas restritivas pode levar ao ganho de peso indesejado.

**Palavras-chave:** ganho de peso; emagrecimento; dieta com baixo teor de gordura; dieta com baixo teor de carboidrato

## Abstract

It has become common in obesity treatment to adopt dietary strategies through low-fat or low-carbohydrate diets. This study compared an ad libitum very low-fat diet with a ketogenic diet, analyzing their metabolic effects and the consequences of non-adherence through intermittent groups. Twenty-six male mice were used, divided into five groups: control (Ctrl), very low fat (VLF), ketogenic (KD), intermittent very low fat (IVLF), and intermittent ketogenic (IKD). The expression of glycolytic and lipolytic enzymes in liver, kidney, and muscle tissues was evaluated by quantitative PCR. The KD group reduced body fat percentage from the 16<sup>th</sup> week, showing significantly lower values by the 22<sup>nd</sup> week compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). Furthermore, glucose transporter 2 expression was lower compared to Ctrl ( $p = 0.0327$ ) and VLF ( $p = 0.0128$ ). The expression of Stearoyl-CoA reductase 1 was also lower in the KD group compared to Ctrl ( $p = 0.0244$ ). In contrast, the IKD group showed increased food intake and body fat percentage between weeks 17 and 19, as well as elevated expression of Stearoyl-CoA reductase 1 compared to the KD group ( $p = 0.0279$ ). Stearoyl-CoA reductase 1 was higher in the IVLF group than in the KD group ( $p = 0.0196$ ), and the expression of Acetyl-CoA carboxylase 1 was also higher in IVLF ( $p = 0.0243$ ). It is concluded that the ketogenic diet promotes weight loss and alters the genetic expression of lipogenic enzymes. Weight gain in the IKD group suggests that difficulty in maintaining adherence to restrictive diets can lead to unwanted weight gain.

**Keywords:** weight gain; weight loss; very low-fat diet; ketogenic diet

## 1. Introdução

A prevalência de obesidade está aumentando principalmente em áreas urbanas. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos tinham sobrepeso e destes mais de 650 milhões eram obesos, enquanto 39 milhões de crianças com menos de 5 anos tinham excesso de peso ou obesidade em 2020, mostrando que existe uma pandemia de obesidade e que é um grande problema de saúde [1].

A obesidade é amplamente definida como excesso de massa corporal e é vista como uma preocupação de saúde global, pois está relacionada ao aumento do risco de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial (HAS) e doenças cardiovasculares. Sendo assim, a obesidade é caracterizada por um Índice de Massa Corporal (IMC)  $> 30 \text{ kg/m}^2$  [2]. Esses níveis elevados de IMC estão associados ao desenvolvimento de comorbidades e aumento da mortalidade, resultando em uma redução na expectativa de vida dos pacientes, que varia entre 6,5 e 13,7 anos [3,4]. Com o aumento da obesidade, sobrepeso e doenças crônicas nos países ocidentais, os pesquisadores estão interessados em entender os mecanismos pelo quais os indivíduos aumentam a massa corporal e como tratar essas doenças. Ao longo do último meio século, para tentar combater a obesidade foram realizadas diversas estratégias dietéticas [5] como em 1977, onde o primeiro Guia dietético para os americanos recomendou o aumento do consumo de carboidratos entre 55% a 60% das calorias diárias e a redução do consumo de gordura de 40% para 30%. Essas recomendações estavam apoiadas na ideia de que o consumo de gordura promovia a obesidade, por ser a maior fonte de energia da dieta [6].

Considerando que a causa primária da obesidade é um desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto energético, dessa forma o caminho para combater a obesidade é por meio do balanço energético negativo. Estudos mostraram que para alcançar o balanço energético negativo é preciso a modificação do comportamento com a combinação de dieta e de exercícios físicos [7].

Nos últimos 30 anos, ocorreram muitos debates sobre a composição ideal da dieta para perda e manutenção de peso. Alguns alegam que a dieta mais convencional com baixo teor de gordura e alto teor de carboidratos [8] é uma boa estratégia, enquanto outros apontam a restrição de carboidratos como sendo mais eficaz. Existem diferentes tipos de dietas como a dieta cetogênica que apresentam muito

baixa quantidade de carboidrato [9] e também as dietas que tem uma maior quantidade de proteína e redução do índice glicêmico [10,11]. Dessa forma, tanto dietas com baixo teor de gorduras como dietas com baixo teor de carboidratos foram preconizadas como ferramentas para controle de massa corpórea e emagrecimento. Os tratamentos atuais para a obesidade têm tido sucesso limitado e a maioria das pessoas que alcançam a perda de peso bem-sucedida não conseguem mantê-lo [12]. Considera-se que isso ocorra devido às intervenções possuírem como objetivo a redução do excesso de adiposidade não contemplando uma das causas implícitas mais comuns do aumento do ganho de peso e da obesidade que é o comportamento alimentar desregulado [13]. Além disso, na tentativa de perder peso, grande parte dos indivíduos adotam padrões alimentares inadequados como dietas muito restritivas, podendo desencadear excessos alimentares, baixo consumo de alimentos saudáveis como frutas e vegetais e inatividade física, que são práticas que dificultam a redução de peso de forma efetiva [14].

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo comparar o impacto da administração de dietas *ad libitum* “*very low fat*”, com alta quantidade de carboidratos, e cetogênica, com baixa quantidade de carboidratos, em camundongos, a fim de elucidar os efeitos dessas dietas no metabolismo, e também de reproduzir a falta de adesão a essas dietas por meio de grupos intermitentes que recebiam suas respectivas dietas *very low fat* e cetogênica durante o período de quatro semanas e após recebiam a dieta controle.

## **2. Metodologia**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pelotas sob o número 131/2022. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA - Resolução Normativa 30, 2016, CONCEA). A eutanásia foi realizada seguindo as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do CONCEA (Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013).

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, devidamente credenciado junto ao CONCEA, em estantes ventiladas com umidade e temperatura controladas. Os animais foram mantidos em



estantes ventiladas, com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar de 40-60%, ciclo de luz de 12 h claro/12 h escuro, sistema de exaustão de ar, e livre acesso à alimentação (ração padrão ou dietas experimentais) e água. Foram 26 camundongos C57BL/6, machos com 03 meses de idade divididos em 05 grupos: grupo controle (Ctrl), grupo *very low fat* (VLF), grupo cetogênico (KD), grupo intermitente *very low fat* (IVLF) e grupo intermitente cetogênico (IKD). Os animais dos grupos intermitentes receberam dieta controle nas semanas 10-15 e de 19-24. As dietas foram administradas durante 24 semanas. Os animais foram monitorados quanto ao ganho de peso e consumo de alimentos durante todo o estudo. Para isso, cada camundongo foi pesado individualmente em balança de precisão semanalmente. O consumo alimentar foi verificado a partir da diferença semanal entre os alimentos oferecidos e os restantes. Após a eutanásia dos animais, os principais órgãos foram coletados e pesados, incluindo rins, fígado, tecido adiposo epididimal e peri-renal, além de músculo. Posteriormente, foi realizada a análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para os genes listados na Tabela 4.

### **2.1 Dietas experimentais:**

A dieta utilizada como controle possuía 63,2% de carboidratos, 19% proteínas e 4,2% de lipídios. Densidade calórica: 3,61 kcal/100g (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição nutricional da ração para dieta padrão em 1000 gramas.

	Quantidade (g)	Carboidratos (g)	Açúcares (g)	Proteínas (g)	Lipídios (g)	Fibras (g)	Quilocalorias (kcal)
Farinha de trigo integral	400	288	1,6	52	10	44	1360
Farinha de trigo	200	152	0,6	20	2	5,4	728
Tapioca granulada	100	90	–	–	–	–	360
Amido de milho	100	91	–	0,3	0,1	0,9	381
Albumina	150	10,68	–	117,84	–	–	514,05
Fermento químico	20	–	–	–	–	–	–
Óleo de canola	05	–	–	–	05	–	45
Banha	25	–	–	–	25	–	225,5
Açúcar refinado	–	–	–	–	–	–	–
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	<b>63,2%</b>	<b>0,2%</b>	<b>19,0%</b>	<b>4,2%</b>	<b>5,0%</b>	<b>3614</b>

\* Valores de referência: Tabela Brasileira de Composição de alimentos (TACO) e rótulos dos alimentos.

Os animais dos grupos *VLF* receberam ração com máximo 1% de lipídios em gramas do alimento, visto que o padrão para roedores é 4%, e grande quantidade de carboidratos acima de 65% das calorias totais [15]. A ração foi composta de 65,6% de carboidratos simples, 19,2% de proteínas e 1,7% de lipídios poli-insaturados das calorias totais. Densidade calórica= 3,48 kcal/100g (Tabela 2). Já a ração dos animais da dieta cetogênica foi composta por grande quantidade de lipídios, ou seja, mais do que 50% das calorias totais provenientes das gorduras [16]. A dieta cetogênica permite um consumo muito baixo de carboidratos (em torno de 5% a 10% da ingestão calórica total ou abaixo de 50g por dia) como meio de aumentar a produção de cetonas [17]. Esta ração foi composta por 15,6% de carboidratos complexos, 18,6% de proteínas e 51,2% de lipídios saturados e poli-insaturados provenientes do total de calorias. Densidade calórica= 6,46kcal/100g (Tabela 3).

**Tabela 2.** Composição nutricional da ração para dieta *very low fat* 1000 gramas.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Carboidratos (g)</b>	<b>Açúcares (g)</b>	<b>Proteínas (g)</b>	<b>Lipídios (g)</b>	<b>Fibras (g)</b>	<b>Quilocalorias (kcal)</b>
Farinha de trigo integral	400	288	1,6	52	10	44	1360
Farinha de trigo	200	152	0,6	20	2	5,4	728
Tapioca granulada	125	112,5	–	–	–	–	450
Amido de milho	100	91	–	2	0,1	0,9	381
Albumina	150	10,68	–	117,84	–	–	514,05
Fermento químico	20	–	–	–	–	–	–
Óleo de canola	05	–	–	–	05	–	45
Banha	–	–	–	–	–	–	–
Açúcar	–	–	–	–	–	–	–
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	<b>65,4%</b>	<b>0,2%</b>	<b>19,2%</b>	<b>1,7%</b>	<b>5,0%</b>	<b>3478</b>

\*Valores de referência: Tabela Brasileira de Composição de alimentos (TACO) e rótulos

**Tabela 3.** Composição nutricional da ração para dieta cetogênica em 1000 gramas.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Carboidratos (g)</b>	<b>Açúcares (g)</b>	<b>Proteínas (g)</b>	<b>Lipídios (g)</b>	<b>Fibras (g)</b>	<b>Quilocalorias (kcal)</b>
Farinha de trigo integral	120	86,4	0,48	15,6	3	13,2	408
Farelo de trigo	85	54,825	0,34	13,26	3,6125	36,55	183,6
Tapioca granulada	0	0	–	–	–	–	0
Amido de milho	0	0	–	0	0	0	0
Albumina	200	14,24	–	157,12	–	–	685,4
Fermento químico	20	–	–	–	–	–	–
Óleo de canola	05	–	–	–	05	–	45
Banha	570	–	–	–	500	–	5141,4
Açúcar	–	–	–	–	–	–	–
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	<b>15,5%</b>	<b>0,1%</b>	<b>18,6%</b>	<b>51,2%</b>	<b>5,0%</b>	<b>6463</b>

\*Valores de referência: Tabela Brasileira de Composição de alimentos (TACO) e rótulos

## **2.2 Teste tolerância à glicose**

Na 23ª semana foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG) com o objetivo de avaliar a resistência à insulina e o metabolismo de glicose. Para isso, foi aplicada uma solução de glicose (2g/kg de peso corporal intraperitonealmente), após 6h de jejum, e a glicemia medida nos tempos -15, 0, 15, 30 e 60 minutos relativos ao momento da aplicação. A área sob a curva (AUC) foi calculada usando o software GraphPad 8.0.

## **2.3 Análise da expressão gênica com método RT-PCR**

### **2.3.1 Extração de RNA**

Para a extração de RNA total, cerca de 50 a 100mg de tecido foi homogeneizado em 1mL de trizol por homogeneização mecânica (beads magnéticas). Após a homogeneização, 200µL de clorofórmio foi adicionado ao trizol e, posteriormente, misturado por vórtex por, aproximadamente, 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por, aproximadamente, 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rotações por minuto por 10 minutos a 4°C. Para precipitação do RNA, a fase aquosa, aproximadamente 500µL, foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5mL contendo 500µL de isopropanol gelado. O isopropanol foi misturado com a fase aquosa por inversão e as amostras incubadas por 10 minutos a 4°C para concentrar o RNA por precipitação. Após as amostras serem centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o máximo de isopropanol foi removido; e 1mL de etanol 75% adicionado ao precipitado e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, seguido da remoção do máximo de etanol e da repetição da adição de etanol 75% para maior purificação do RNA. Posterior à remoção do máximo de etanol, o pellet secou ao ar por 15 a 20 minutos; e foi ressuscitado com 20 a 50µL de água livre de nuclease, seguida da incubação das amostras a 55°C por 10 minutos. Após a ressuspensão, a dosagem da concentração de RNA e a verificação da qualidade do ácido nucleico das amostras foram realizadas no espectrofotômetro para ácidos nucleicos. A qualidade do material genético extraído foi analisada por meio das razões das absorbâncias em 260nm e 280nm (260/280), que indica o grau de contaminação por proteínas e solventes orgânicos, como resíduos de fenol, sendo selecionadas somente as amostras cuja razão era de aproximadamente 2, que é o indicativo de pureza para RNA; e em 260nm e 230nm (260/230), que é o indicativo secundário de contaminação por solventes

orgânicos, como o fenol, cuja razão apresenta-se entre 2 e 2,2. Depois da análise do RNA no espectrofotômetro, as amostras foram armazenadas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.2 Tratamento com DNase e síntese do DNA complementar (cDNA)**

Para assegurar que no processo de RT-PCR não haja DNA genômico, somente cDNA sintetizado a partir do RNA, as amostras foram submetidas à digestão com DNase para posterior síntese de cDNA.

### **2.3.3 Digestão com Dnase**

A digestão com DNase foi realizada com 5  $\mu\text{g}$  de RNA, sendo utilizado 1U de DNase recombinante I por  $\mu\text{g}$  de RNA. A quantidade de inibidor de RNase empregado variou de acordo com as informações do fabricante, 15U de inibidor de ribonuclease, livre de RNase (Roboklon) ou 20U de inibidor de RNase (Applied Biosystems). Foi utilizado o tampão de incubação da DNase (10x) em volume final da reação de 20 $\mu\text{L}$ , completado com água livre de nuclease. O protocolo utilizado no termociclador dependeu da DNase recombinante I utilizada na reação. Com a DNase do fabricante Takara (2270B), as amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e a reação parada pela adição de solução de parada e aquecimento a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Ao final, a concentração de RNA das amostras foi dosada por espectrofotometria no espectrofotômetro de ácidos nucleicos e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.4 Síntese de cDNA**

O cDNA foi sintetizado por meio do Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Em conjunto ao 1 $\mu\text{g}$  de RNA tratado com DNase, foi adicionado 50U da transcriptase reversa MultiScribe, 0,8 $\mu\text{L}$  do dNTP mix (25x) (100mM), 20U de inibidor de RNase, 2 $\mu\text{L}$  de *primers* randômicos (10x), 2 $\mu\text{L}$  do tampão de incubação da transcriptase reversa MultiScribe (10x) e completado com água para o volume final de 20 $\mu\text{L}$ . A reação foi submetida a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$  por 120 minutos e a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. O cDNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.5 PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A análise de expressão gênica dos tecidos foi feita por RT-PCR pelo sistema *Sybr Green*. Nos experimentos, foram utilizados 20ng de cDNA e 10 $\mu$ M dos *primers* descritos na Tabela 4, sendo amplificado em ciclos variados de temperatura 53°C para desnaturação, anelamento e extensão. A quantidade de mRNA dos genes de interesse foi normalizada pela expressão de Rna- Beta-actina (gene de referência) calculada pela divisão dos valores referentes ao  $2 - \Delta\Delta CT$  [18] do gene de interesse relativo ao gene de referência. A representação gráfica dos valores foi expressa em taxa de alteração relativa ao grupo controle (*fold-change*). As sequências dos *primers* foram desenhadas por meio da utilização de ferramentas de bioinformática.

**Tabela 4.** Lista de *primers* utilizados para análise da expressão gênica.

Gene	Foward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Beta-Actina	CTGGCCTCACTGTCCACCTT	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	TTGACCCTGCTTCCACCAA	TGTCATTCTCAGCCTGGG
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	CTAACTTGGCCATGATGAACC	CTTCACTGAGGTGCCAGGAG
Glucose- 6-phosphatase	TCGGAGACTGGTTCAACCTC	ACAGGTGACAGGGAAGTCTGCT
Glucose transporter 2	CATTGGCACATCCTACTTGG	TTCAAGCTTTTCTTTGCCCT
Acetyl- Coa-carboxilase	CACATCCATCCAAACAGAG	GCGTTGTCCAACAGAACATC
Carnitine Palmitoyltransferase 1	CTTCCATGACTCGGCTCTTC	AGCTTGAACCTCTGCTCTGC
Stearoyl Coa Desaturase 1	CCTGCGGATCTTCCTTATCA	GTCGGCGTGTGTTTCTGAG
Hepatic Nuclear factor 4	CTCACCTCAGCAATGGACAG	GGCAGGAGCTTGTAGGATTC
Cholesterol 7 alpha-hydroxylase	TGTAGCCCTCTTTCCTCCA	GCTTGTTCGAGTCCAAAAG

Sterol regulatory element-binding protein 1	GAACTGGACACAGCGGTTTT	GGCCAGAGAAGCAGAAGAGA
Fatty acid Synthase	GAGGACACTCAAGTGGCTGA	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT
Forkhead box protein O1	GCTTTTGTACGATGGAGGT	CGCACAGAGCACTCCATAAA
Forkhead box protein O3	ACAGAATGCCTCAGGATCTGG	TGAAGTCCAGTCCCTCACCAT
HMG-CoA reductase	AAAGTTTGCCCTCAGTTCA	AAAGTTTGCCCTCAGTTCA
Forkhead box protein O4	TCTACGAATGGATGGTCCGCAC	CTTGCTGTGCAAGGACAGGTTG
Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )	GCCTCTTCTCATTCTGCTTG	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

### 2.3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Graph Pad Prism 8.0. O teste prévio de normalidade foi feito para verificar a distribuição dos dados antes de prosseguir com as análises estatísticas. Para os testes estatísticos entre os grupos foram utilizados o teste One-way ANOVA e Teste-T para analisar duas amostras. Os dados são apresentados com média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para o TTG, foi realizado o cálculo da área sob a curva e posteriormente o teste One-way ANOVA. Foi considerado significativo quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

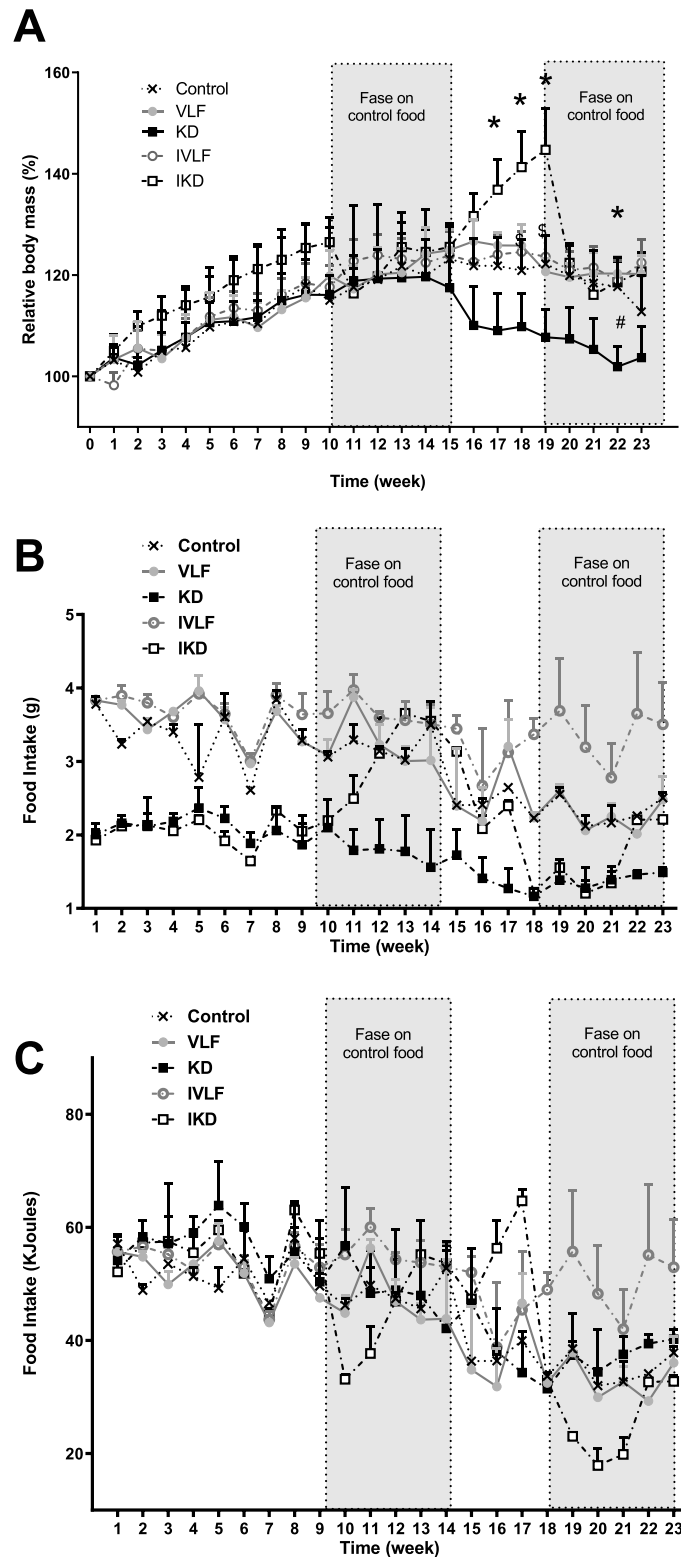
### 3.1 Variações de ganho de peso foram observadas nos dois grupos com dieta cetogênica

Em relação ao ganho de peso corporal (Figura 1A), os animais do grupo IKD, entre as semanas 10 e 15, quando entraram no período de intermitência e passaram a consumir a dieta controle, aumentaram o consumo alimentar em gramas (Figura 1B). Esse aumento pode ser explicado pelo fato da dieta controle possuir menor densidade calórica em comparação à dieta cetogênica. No entanto, quando esses animais retornaram à dieta cetogênica a partir da semana 16 até a semana 19, o consumo alimentar permaneceu elevado. Apesar da dieta cetogênica ser hipercalórica devido ao seu alto teor de lipídios (Figura 1BC). Nesse período, o aumento na ingestão

da dieta cetogênica rica em calorias resulta em um rápido ganho de peso corporal, como observado na Figura 1A.

Por outro lado, os animais do grupo KD apresentaram uma diminuição no ganho de peso corporal após a 16ª semana de experimento. Na 22ª semana, o percentual de ganho de peso desse grupo foi significativamente menor quando comparado aos grupos VLF, IKD e IVLF. Além disso, quando comparado ao grupo controle, o grupo KD também mostrou uma redução significativa no ganho de peso corporal, conforme demonstrado na Figura 1A.

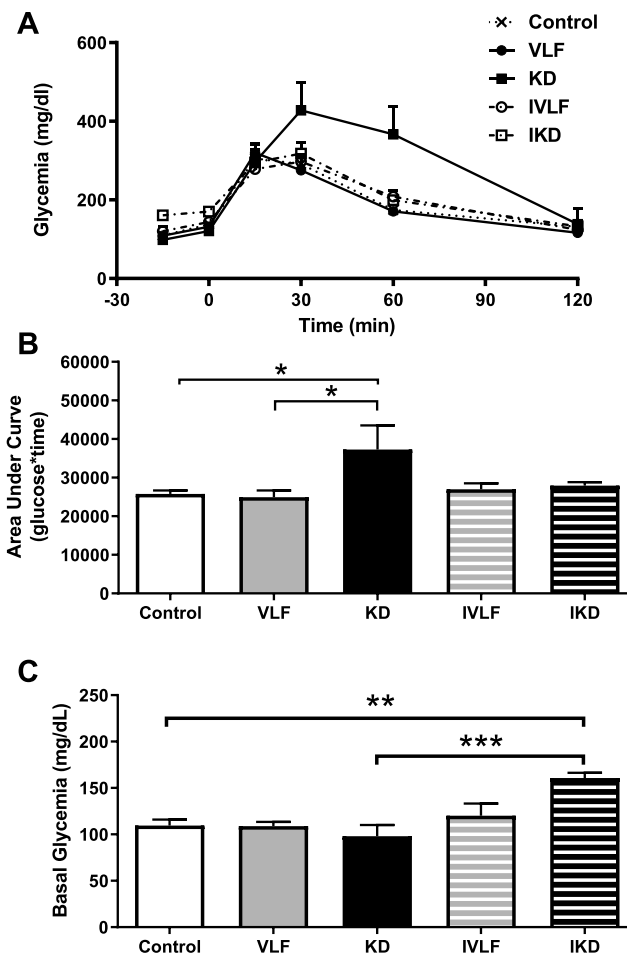




**Figura 1: Ganho de peso e consumo de ração.** (A) Porcentagem de massa corporal. Os animais do grupo IKD apresentaram aumento no peso corporal na semana 17 à 19. Os animais do grupo KD apresentaram menor massa relativa na semana 22. \*,  $p < 0,05$  usando ANOVA de uma via; #,  $p < 0,05$  usando Test-T em comparação ao grupo controle. VLF = grupo dieta *very low fat*; IVLF = grupo dieta *very low fat* intermitente; KD = grupo dieta cetogênica; IKD = grupo dieta cetogênica intermitente.

### 3.2 Variações glicêmicas foram observadas nos grupos com dieta cetogênica

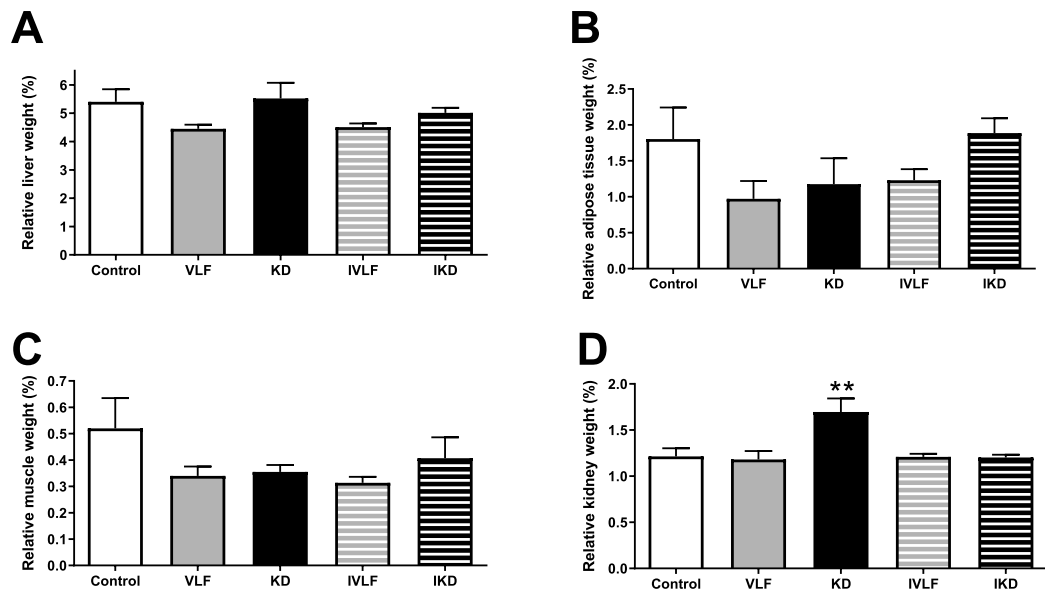
O TTG foi realizado na 23<sup>a</sup> semana do experimento. A glicemia basal foi medida no tempo -15 minutos. Um grama de glicose/kg peso foi aplicado no tempo zero. A curva glicêmica do grupo KD apresentou uma área muito maior que dos outros grupos, os quais fizeram curvas quase idênticas. Esse resultado indica uma menor captação de glicose pelos músculos dos animais do grupo KD, o que se torna evidente após o tempo 30 minutos (Figura 2A e 2B). Por outro lado, a glicemia basal aumentou somente no grupo IKD conforme mostra a Figura 2C, sendo que apesar do grupo KD ter tido uma excursão de glicose maior no teste de tolerância a glicose, conseguiu regular sua glicemia em jejum, diferentemente do grupo relativo intermitente (IKD).



**Figura 2: Testes glicêmicos.** (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) realizado na semana 23 do experimento com injeção I.P. de 1g glicose/kg peso. (B) Área sob a curva (AUC) para os resultados do TTG. (C) Níveis de glicemia basal. ANOVA 1 via, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; VLF = grupo dieta *very low fat*; IVLF = grupo dieta *very low fat* intermitente; KD = grupo dieta cetogênica; IKD = grupo dieta cetogênica intermitente; I.P = injeção intraperitoneal.

### 3.3 Dieta cetogênica causou aumento na massa renal

A Figura 3 mostra as massas relativas do fígado (A), tecido adiposo epididimal (B), tríceps sural (C) e rins (D). Verificamos que a massa total e relativa dos rins dos animais da dieta cetogênica é maior comparado a todos os outros grupos ( $p < 0,01$ ).



**Figura 3: Massas relativas de alguns órgãos relacionados ao metabolismo energético** - Massa relativas do fígado (A), tecido adiposo (B), músculo (C) e rins (D) de camundongos C57BL6, \*\*,  $p < 0,01$ ,  $n = 5-6$ . VLF = grupo dieta *very low fat*; IVLF = grupo dieta *very low fat* intermitente; KD = grupo dieta cetogênica; IKD = grupo dieta cetogênica intermitente.

### 3.4 Variações de expressão genética no fígado

Os níveis de expressão dos fatores de transcrição FoxO1a (*forkhead box protein O1*) e FoxO3a (*forkhead box protein O3*) não apresentaram diferenças significativas (Figura 4A e 4C). Da mesma maneira, os níveis de expressão de PGC1 $\alpha$  (figura 4B), TNF- $\alpha$  (Figura 4F), PEPCK (figura 4D) e G6P (figura 4E) também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

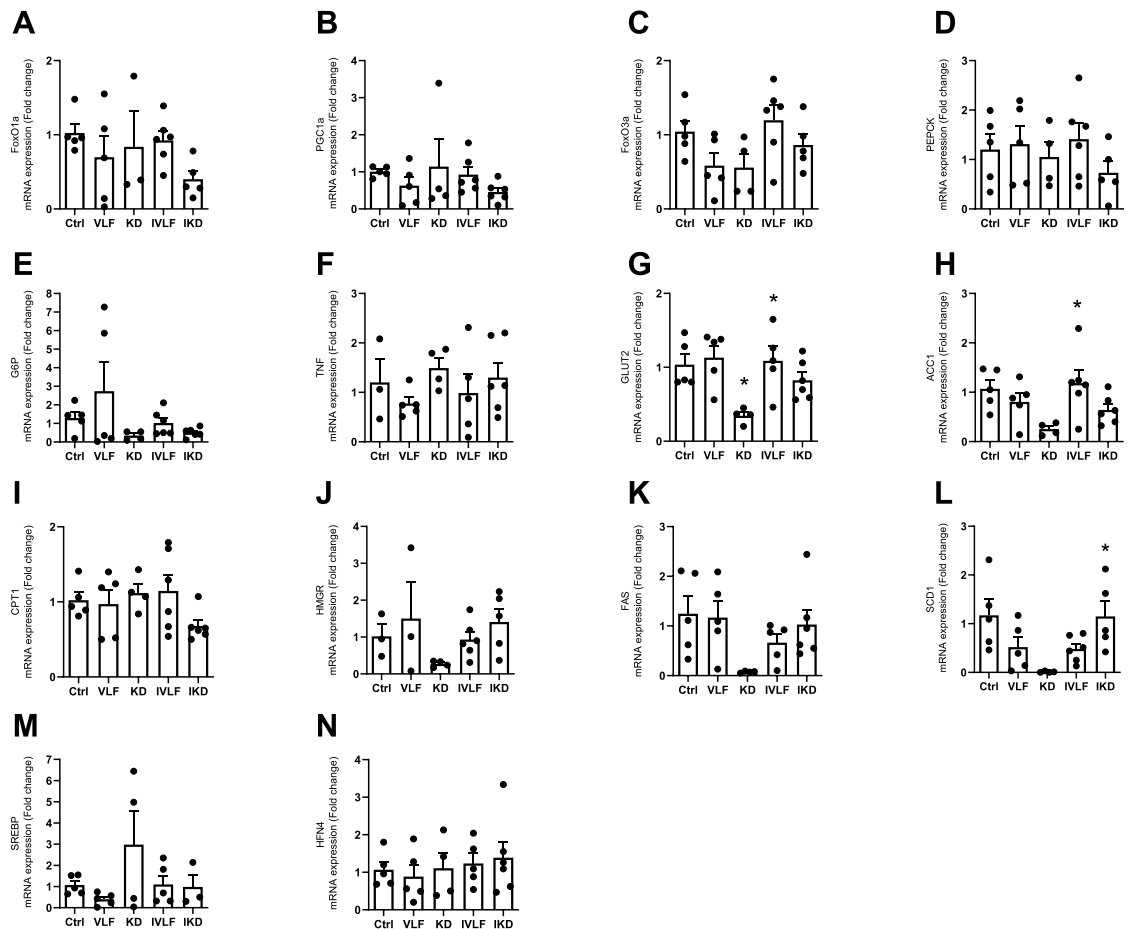
*Glucose transporter 2* (GLUT2), no fígado, desempenham um papel fundamental na regulação dos níveis de glicose no sangue, facilitando tanto a entrada quanto a saída de glicose no fígado, e contribuindo assim para a manutenção da homeostase glicêmica. Observou-se que os níveis de expressão do GLUT2 foram reduzidos no grupo KD em comparação ao grupo controle ( $p^* = 0,0327$ ) e *very low fat* ( $p^* = 0,0128$ ). Esse efeito provavelmente decorre da baixa quantidade de carboidratos

presentes na dieta KD, o que resulta em menor disponibilidade de glicose e leva o organismo a recorrer a outras fontes de energia, como a produção de corpos cetônicos. Adicionalmente, o grupo IVLF apresentou níveis de expressão significativamente maiores de GLUT2 em relação ao grupo KD ( $p^*=0,0196$ ), conforme mostrado na Figura 4G. Esse resultado pode ser atribuído à maior quantidade de carboidratos presentes na dieta VLF, em contraste com a dieta KD, que possui uma quantidade reduzida.

Em relação ao metabolismo lipídico, foram analisadas as enzimas *Acetyl-CoA carboxilase (ACC1)*, *Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)*, *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR)*, *Fatty Acid Synthase (FAS)*, *Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)*, *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 $\alpha$ )* e o fator de transcrição *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1a (SREBP1A)*, que regula a expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios.

Ao analisar os níveis de expressão gênica da ACC1 no fígado, os animais alimentados com a dieta IVLF apresentaram níveis significativamente maiores em comparação ao grupo KD ( $p^*=0,0243$ ) (Figura 4H). No entanto, para os níveis de CPT1 (Figura 4I), HMGR (Figura 4J), FAS (Figura 4K) e SREBP1A (Figura 4M), HNF4 $\alpha$  (Figura 4N) não foram encontradas diferenças significativas. Entretanto, observou-se uma tendência de diminuição dos níveis de expressão da HMGR no grupo KD, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística.

Os animais submetidos à dieta KD apresentaram níveis significativamente menores de SCD1 no fígado, em comparação ao grupo controle ( $p^*=0,0244$ ), indicando uma redução na síntese de ácidos graxos monoinsaturados, que são importantes para a produção de triglicerídeos e colesterol no fígado. Por outro lado, o grupo IKD exibiu níveis aumentados de SCD1 em relação ao grupo KD ( $p^*=0,00279$ ), sugerindo um efeito diferencial da dieta intermitente na regulação dessa enzima (Figura 4L).



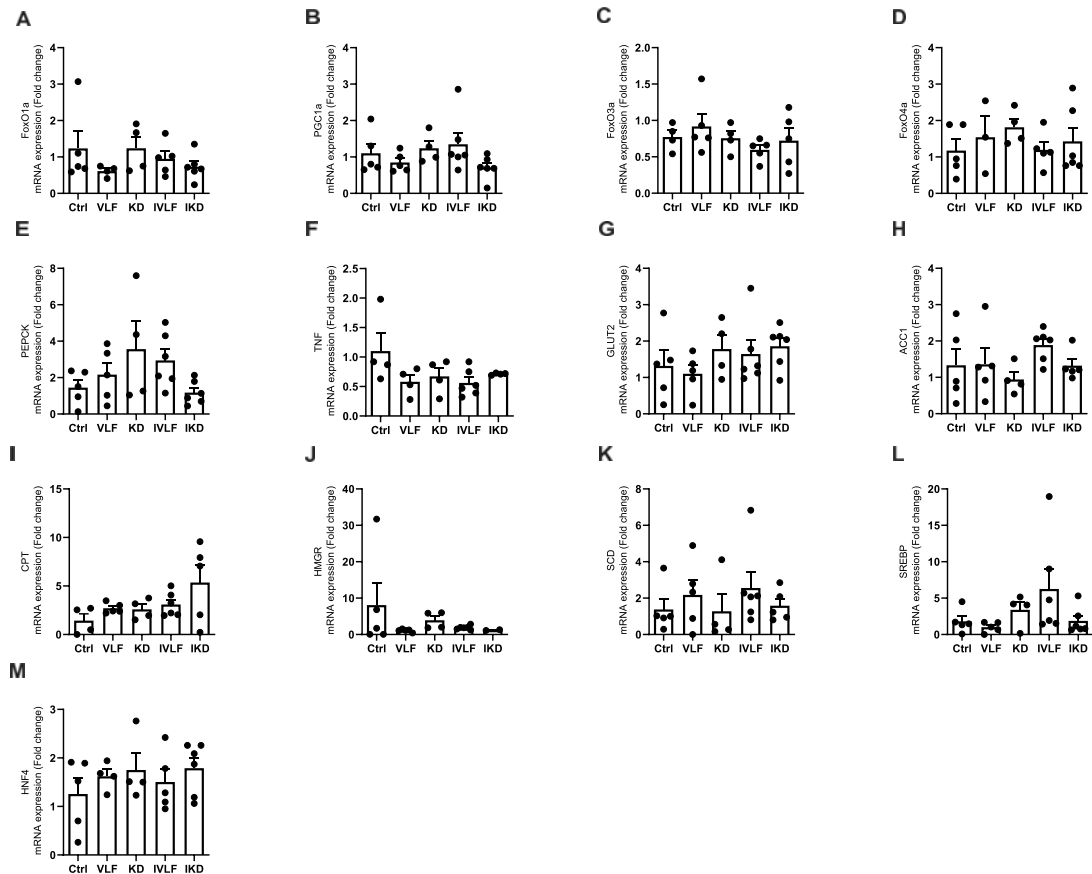
**Figura 4: Variações de expressão gênica no fígado.** Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição, enzimas glicolíticas e lipolíticas no fígado dos animais que consumiram as dietas controle, *very low fat*, cetogênica, intermitente *very low fat* e intermitente cetogênica. Os dados estão representados por suas médias e erro padrão foram analisados de acordo com ANOVA de uma via e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de \* $p < 0,05$  foram considerados significativo

### 3.5 Variações de expressão gênica nos rins

A avaliação dos níveis de expressão gênica dos fatores de transcrição FoxO1, FoxO3 e FoxO4 nos rins não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figuras 5A, 5C e 5D). Da mesma forma, os níveis de expressão do PGC1 $\alpha$  (Figura 5B) não apresentaram variações significativas.

Em relação às enzimas glicolíticas, a expressão da PEPCK (Figura 5E) e do transportador de glicose GLUT2 (Figura 5G) também não apresentou diferença significativa entre os grupos. No que diz respeito aos parâmetros inflamatórios, os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 5F) permaneceu sem alterações relevantes entre os grupos analisados.

Além disso, as enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico, como ACC1 (Figura 5H), CPT1 (Figura 5I), HMGR (Figura 5J), SCD1 (Figura 5K), e o fator de transcrição SREBP1A (Figura 5L), assim como o HNF4 $\alpha$  (Figura 5M), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 5: Variações de expressão gênica nos rins.** Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição, enzimas glicolíticas e lipolíticas nos rins dos animais que consumiram as dietas controle, *very low fat*, cetogênica, intermitente *very low fat* e intermitente cetogênica. Os dados estão representados por suas médias e erro padrão foram analisados de acordo com ANOVA de uma via e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados significativos

### 3.6 Variações de expressão gênica no músculo

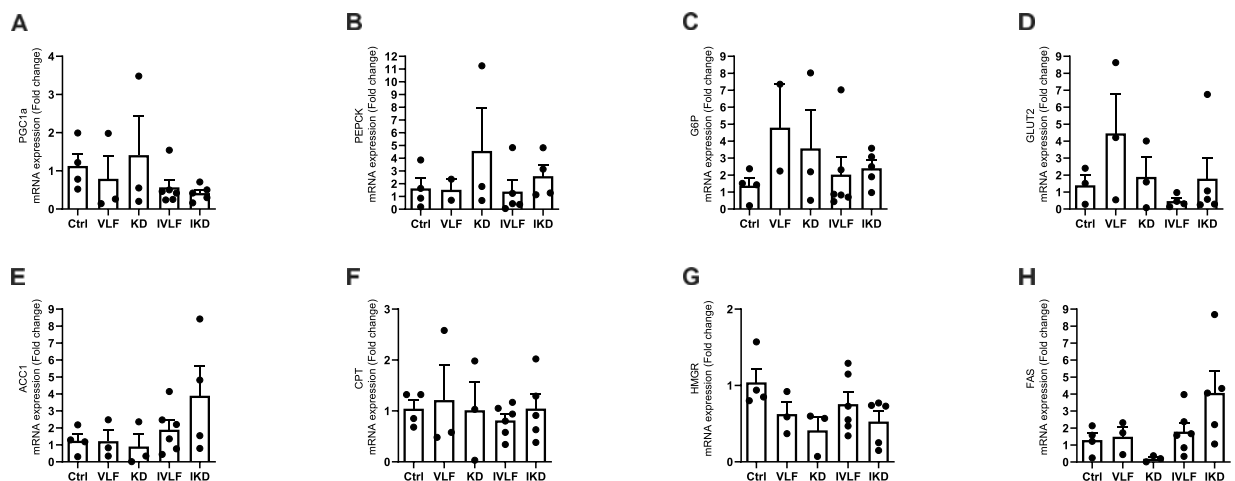
A análise dos níveis de PGC1 $\alpha$  no músculo dos animais revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 6A). Da mesma forma, a expressão gênica das enzimas glicolíticas, como PEPCK e G6P, não apresentou variações significativas entre os grupos avaliados (Figuras 6B e 6C).

Notavelmente, os níveis de GLUT2 estavam mais elevados no grupo *very low fat*, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística (Figura 6D).

Além disso, a enzima lipolítica ACC1 mostrou níveis superiores no grupo IKD em comparação aos demais grupos, mas essa diferença também não foi significativa (Figura 6E).

As enzimas CPT (Figura 6F) e HMGR (Figura 6G) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. No entanto, o grupo KD demonstrou níveis reduzidos da enzima FAS, embora essa diferença também não tenha alcançado significância estatística, conforme evidenciado na Figura 6H.

Esses resultados sugerem que, apesar das variações observadas, não houve evidências suficientes para estabelecer diferenças significativas entre os grupos, indicando uma possível uniformidade na regulação dos marcadores metabólicos analisados.



**Figura 6: Variações de expressão gênica no músculo.** Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição, enzimas glicolíticas e lipolíticas no músculo dos animais que consumiram as dietas controle, *very low fat*, cetogênica, intermitente *very low fat* e intermitente cetogênica. Os dados estão representados por suas médias e erro padrão foram analisados de acordo com ANOVA de uma via e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados significativos

#### 4. Discussão

A obesidade é um problema de saúde pública que está crescendo cada vez mais e está associada ao aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis como DM2, HAS e dislipidemias, assim reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos e gerando altos custos ao sistema público de saúde. No presente trabalho avaliamos a administração *ad libitum* da dieta com baixa quantidade de lipídios e alta quantidade de carboidratos (*very low fat*) em comparação a dieta cetogênica, a fim de verificar os

possíveis efeitos no metabolismo, ingestão calórica e ganho de peso em camundongos, também adicionando dois grupos intermitentes das mesmas dietas, na tentativa de representar a falta de adesão destas dietas restritivas em humanos. Os principais resultados mostraram uma perda de peso no grupo KD, com aumento de massa renal e tendência de maior expressão de enzimas reguladoras da gliconeogênese. Estes animais também tiveram dificuldade na captação da glicose injetada no TTG. Apesar disso, conseguiram manter níveis normais de glicemia basal. Diferentemente, os animais do grupo IKD apresentaram ganho de peso ao retornarem à dieta cetogênica após a intermitência com dieta controle, e apresentaram glicemia basal aumentada, apesar de terem uma incursão de glicose semelhante ao grupo controle no TTG. Juntos estes dados mostram a importância e o cuidado que se deve ter com dietas restritivas quanto à questão da adesão ao tratamento.

O ganho de peso observado no grupo IKD após o retorno à dieta cetogênica parece ser devido ao aumento do consumo alimentar (em gramas) durante o período em que receberam a dieta controle. Ao retornarem à dieta cetogênica, entre a 16<sup>a</sup> e a 19<sup>a</sup> semana, mantiveram um consumo alimentar elevado, e desta forma, tiveram uma ingestão calórica aumentada na nova fase de adaptação a dieta cetogênica. Por outro lado, animais do grupo KD tiveram um grande período de adaptação e só começaram a perder peso a partir da 16<sup>a</sup> semana culminando na 22<sup>a</sup> semana o momento de observar uma diferença significativa em relação aos outros grupos. Esse resultado corrobora com os estudos de Her *et al.*, [20] e de Arsyad *et al.*, [21] que observaram diminuição do peso corporal dos animais tratados com dieta cetogênica. Os animais dessa dieta também apresentaram menor consumo alimentar (gramas) em relação aos demais grupos. Essa diminuição da ingestão alimentar pode estar associada a presença de grande quantidade de gorduras e fibras levando a sensação de saciedade e redução do apetite, manutenção de secreção da colecistoquinina pós-prandial e redução dos níveis de grelina [22]. Outra explicação é pela presença de corpos cetônicos que tem demonstrado reduzir o apetite por meio da regulação hormonal, como visto no estudo de Martins *et al.*, [23], no qual foi observado que os indivíduos que apresentavam altas concentrações de corpos cetônicos possuíam redução dos níveis de grelina, um hormônio relacionado a fome, e um aumento dos hormônios da saciedade, como colecistoquinina e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1).



O aumento do peso relativo e absoluto dos rins no grupo KD pode ser explicado por um aumento da gliconeogênese renal nestes animais, uma vez que não receberam fontes de carboidratos suficientes para manter a glicemia basal. A gliconeogênese é uma via metabólica crucial na manutenção dos níveis de glicose a níveis adequados, gerando glicose a partir de aminoácidos, lactato, piruvato e glicerol, entre outras moléculas do metabolismo intermediário. A gliconeogênese é induzida por hormônios antagonistas da insulina como glucagon, glicocorticoides, epinefrina e hormônio do crescimento por meio da transativação de enzimas ativadoras da via como G6P e PEPCK. A expressão dessas enzimas é importante especialmente nos hepatócitos, células do túbulo proximal renal e células epiteliais intestinais, que são essenciais para a regulação sistêmica da glicose no sangue em condições de jejum [24]. Sendo assim, a gliconeogênese renal desempenha um papel crítico na homeostase da glicose, particularmente em condições de jejum contribuindo em torno de 20% a 25% da produção de glicose [25]. Como os níveis de glicose regulam a gliconeogênese renal. Dessa forma, os túbulos proximais reabsorvem glicose por meio de transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLTs) 1 e 2. Em um meio rico em glicose, a reabsorção de glicose aumenta, aumentando a razão entre a forma oxidada e reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>/NADH), inibindo a desacetilação do coativador do receptor PGC1 $\alpha$  de maneira dependente de sirtuína-1, levando a uma regulação negativa da expressão do gene *Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1* (PCK1). Assim, os inibidores de SGLT2 estimulam a gliconeogênese renal no túbulo proximal [26]. Outro mecanismo que regula a gliconeogênese renal é a acidose, onde o beta-hidroxibutirato que é um corpo cetônico, medeia a interação hepatorenal para manter a regulação homeostática da glicose sanguínea e do equilíbrio ácido-base sistêmico [27].

A redução dos níveis de GLUT2 observada no fígado dos animais KD pode ser devido à baixa ingestão de carboidratos, causando níveis reduzidos de glicemia, e influenciando na expressão desses transportadores. O transportador de GLUT2 é a isoforma mais abundante em hepatócitos, responsável pela maior captação de glicose, mas não pela produção direta de glicose hepática. O papel desse transportador é absorver glicose durante a fase de absorção e liberá-la no sangue durante o jejum. Então, a dieta cetogênica pode reduzir a expressão de GLUT2,

especialmente no fígado, devido à menor disponibilidade de glicose e maior dependência de corpos cetônicos como fonte de energia [28].

Em contrapartida, no grupo IVLF, os níveis de GLUT2 estavam aumentados comparado ao grupo KD. Esse efeito é compatível com o fato da dieta *very low fat* ser rica em carboidratos, acarretando no aumento da necessidade de transporte de glicose principalmente no fígado. Nos hepatócitos, o transportador de glicose GLUT2 tem uma função central, mediando a maior parte da captação de glicose do sangue de maneira dependente da concentração de glicose circulante. Esse processo garante que, quando os níveis de glicose no sangue estão elevados, os hepatócitos possam absorver glicose de forma eficiente e utilizá-la para processos como glicogênese e lipogênese. Sabe-se que os hepatócitos compartilham um mecanismo essencial de resposta a altos níveis de glicose no sangue, que envolve a ativação do fator de transcrição *Carbohydrate response element binding protein* (ChREBP). Esse fator é fundamental para a indução de genes envolvidos na glicólise e na lipogênese. O papel do ChREBP é regular a conversão de glicose em componentes energéticos e de armazenamento. A ativação do ChREBP nos hepatócitos é essencial para a manutenção da homeostase energética, ajustando as atividades de glicólise e síntese lipídica em resposta às variações nos níveis de glicose [29,30].

Em nossos resultados mostramos que a enzima ACC1 apresenta-se com os níveis de expressão aumentada no fígado dos animais que receberam dieta IVLF comparado ao grupo KD. Esse efeito ocorre devido a dieta *very low fat* ser rica em carboidratos levando a ativação de vias lipogênicas devido ao excesso de glicose. Esse efeito acontece por conta do fator de transcrição ChREBP, que é ativado em resposta ao aumento dos níveis de glicose no fígado. Assim, ChREBP se liga aos elementos de resposta ao carboidrato nos promotores de genes lipogênicos, incluindo o ACC1, estimulando a sua transcrição. Essa ativação resulta no aumento da síntese de ácidos graxos, utilizando o acetil-CoA gerado pela metabolização da glicose. Além disso, a insulina liberada em resposta a uma dieta rica em carboidratos também ativa a proteína SREBP-1c, que colabora na indução de genes lipogênicos, como o ACC1. A combinação de glicose elevada e sinais de insulina amplifica a síntese de ácidos graxos, contribuindo para o aumento da ACC1. Esse processo é parte da lipogênese *de novo*, um mecanismo pelo qual o organismo converte carboidratos em lipídios,

especialmente quando tem excesso de energia. Estudos mostram que a glicose ativa diretamente o ChREBP, enquanto a insulina regula a expressão do SREBP-1c, o que forma uma rede coordenada para aumentar a síntese de ácidos graxos em resposta a dietas ricas em carboidratos [31,32,33].

Em contraste, os níveis de ACC1 no grupo KD estavam diminuídos em virtude da restrição de carboidratos nessa dieta, assim temos níveis de insulina menores e conseqüentemente as enzimas envolvidas nas sínteses como ACC que participa da síntese de ácidos graxos de cadeia longa está diminuída. ACC1 é uma moeda global que pode mediar as transações de carbono entre vias metabólicas, incluindo glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo de aminoácidos, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos. Em geral, o nível de proteína e as atividades enzimáticas são reguladas positivamente em condições de nutrientes e energia abundantes, visando armazenar o excesso de nutrientes e energia na forma de ácidos graxos. Correspondentemente, o nível de proteína e as atividades enzimáticas de ACCs são suprimidos em condições de nutrientes e energia deficientes, visando garantir a energia e os nutrientes limitados que são utilizados para a sobrevivência [34]. Dessa forma, na dieta KD temos níveis de ACC1 diminuídos e a *AMP-activated protein kinase* (AMPK) aumentada, funcionando como um sensor de energia que detecta o estado de nutrientes, a energia das células e é um regulador importante de ACC1. Quando as células sofrem estresses metabólicos, como privação de glicose ou hipóxia, AMPK é ativado, o que pode fosforilar os resíduos de serina-79 em ACC1. A fosforilação do resíduo Ser-79 bloqueia efetivamente a formação do homodímero ACC1, deixando as moléculas ACC1 como monômeros que são incapazes de catalisar a carboxilação de acetil-CoA, suprimindo a via de síntese de ácidos graxos [35].

Outra enzima que participa do metabolismo de lipídios é a SCD1, os animais do grupo IKD tiveram níveis maiores dessa enzima comparada ao grupo KD. Como os animais do grupo IKD tiveram períodos intercalados com a dieta controle onde possuía quantidades de carboidratos maiores comparada a dieta KD. Acreditamos que por causa do consumo da dieta controle na intermitência esse grupo apresentou níveis mais altos de SCD1. Essa enzima lipogênica catalisa a síntese de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente oleato e palmitoleato, a partir de ácidos graxos saturados, palmitato e estearato, respectivamente. Os ácidos graxos monoinsaturados são produtos de SCD1 são preferencialmente incorporados em

espécies lipídicas importantes, como triglicerídeos, éster de colesterol e fosfolipídios. Além de suas funções estruturais, os ácidos graxos monoinsaturados têm funções de sinalização e podem regular o metabolismo sistêmico e modular doenças metabólicas crônicas [36]. Já nos animais da KD, os níveis dessa enzima estavam bastante reduzidos devido a ingestão de carboidratos ser mínima e assim a gordura passa a ser a principal fonte de energia conseqüentemente diminuindo a lipogênese, ou seja, porque não tem quantidades significativas de carboidratos disponível para converter em ácidos graxos. Por causa dessa diminuição nos níveis da SCD1 na dieta cetogênica, esse efeito pode promover a oxidação de gordura em vez de seu armazenamento e melhorar a sensibilidade à insulina em tecidos como o músculo esquelético. Assim, a dieta cetogênica torna-se uma opção dietética para condições associadas ao excesso de síntese de gordura, como a doença hepática gordurosa não alcoólica [37,38]. Como mostrou o estudo de Silva-Santi et al., comparou uma dieta rica em carboidratos e uma dieta rica em lipídios e observaram que os animais alimentados com dieta rica em carboidratos aumentaram a atividade SCD1 e tiveram níveis mais altos de ácidos graxos monoinsaturados no fígado em relação aos ratos alimentados com dieta rica em gordura [39].

Esse estudo traz resultados relevantes quanto ao consumo de dietas restritivas e também quanto a falta de adesão e posterior retomada dessas dietas. Porém, o número pequeno de animais pode limitar a generalização dos resultados.

## **5. Conclusão**

Os resultados mostraram que a dieta KD foi eficaz na perda de peso a partir da décima sexta semana de tratamento, apresentando alterações no metabolismo lipídico e glicídico com redução de expressão gênica das enzimas que atuam na lipogênese e nos transportadores de glicose.

Por outro lado, os animais do grupo IKD, ao entrarem no período de transição para a dieta controle, aumentaram significativamente o consumo alimentar. Mesmo após retornarem à dieta KD, esse aumento no consumo persistiu, resultando em ganho de peso. Esses achados sugerem que a interrupção e a posterior retomada de uma dieta restritiva podem induzir um aumento no peso corporal, possivelmente devido a um mecanismo compensatório no comportamento alimentar.

Embora este estudo apresente resultados importantes sobre dietas restritivas e a falta de adesão ao tratamento dietético, são necessárias pesquisas adicionais para compreender melhor os efeitos dessas dietas a longo prazo.

### Referências

- [1] CARUSO, A. *et al.* Leptin: A Heavyweight Player in Obesity Related Cancers. **Biomolecules**, v.13, 1084, 2023.
- [2] The GBD 2015 Obesity Collaborators, AFSHIN, A; FOROUNZANFAR, M.H.; REITSMA, M.B. *et al.* Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **The New England Journal of Medicine**, v.377, n.1, p.13-27, 2017.
- [3] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight; 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em maio, 2021.
- [4] KITAHARA, C.M. *et al.* Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m<sup>2</sup>) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. **PLoS Medicine**, v.11, n.7, 2014.
- [5] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-Risc). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. **Lancet**, v. 387, n.10026, p.1377–1396, 2016.
- [6] GERSHUNI, V.M. Saturated Fat: Part of a Healthy Diet. **Current Nutrition Reports**, v.7, n.3, p.85-96, 2018.
- [7] EBBELING, C.B.; YOUNG, I.S. Dietary fat: friend or foe? **Clinical Chemistry**, v.64, n.1, p.34-41, 2018.
- [8] PETRIDOU, A.; SIOPI, A.; MOUGIOS, V. Exercise in the management of obesity. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.92, p. 163-169, 2019.
- [9] GRAVE, R.D. *et al.* A Randomized Trial of Energy-Restricted High-Protein versus High-Carbohydrate, Low-Fat Diet in Morbid Obesity. **Obesity**, v.9, 2013.
- [10] GERSHUNI, V.M.; YAN, S.L.; MEDICI, V. Nutritional ketosis for weight management and reversal of metabolic syndrome. **Current Nutrition Reports**, v.7, p.97–106, 2018.
- [11] LARSEN, T.M. *et al.* For the diet, obesity, and genes (Diogenes) project. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. **New England Journal of Medicine**, v.362, p.2102–2113, 2010.
- [12] ASTRUP, A.; HJORTH, M.F. Low-Fat or Low Carb for Weight Loss? It Depends on Your Glucose Metabolism. **EBioMedicine**, v.22, p.20-21, 2017.
- [13] SOLEYMANI, T.; DANIEL, S.; GARVEY, W.T. Weight maintenance: challenges, tools and strategies for primary care physicians. **Obesity Reviews**, v.17, n.1, p.81-93, 2016.
- [14] LEIGH, S.J.; MORRIS, M.J. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. **Biological Psychology**, v.131, p.31-42, 2018.
- [15] MOREIRA, A.P.B.; *et al.* Evolução e interpretação das recomendações nutricionais para os macronutrientes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.27, n.1, p.51-59, 2012.
- [16] WEBER, D.D. *et al.* Ketogenic diet in treatment of cancer – Where do we stand? **Molecular Metabolism**, v.33, p.102-121, 2019.
- [17] PAOLI, A. *et al.* Ketogenic diet and microbiota: Friends or Enemies? **Genes**, v. 10, n.7, 2019.
- [18] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402–8, 2001.

- [19] PIETILAINEN, K.H.; SAARNI, S.E.; KAPRIO, J.; RISSANEN, A. Does dieting make you fat? A twin study. **International Journal of Obesity**, v.36, p.456-464, 2012.
- [20] HER, T.K. *et al.* Dietary carbohydrates modulate metabolic and  $\beta$ -cell adaptation to high-fat diet-induced obesity. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.318, n.6, E856–E865, 2020.
- [21] ARSYAD, A. *et al.* Long-term ketogenic diet induces metabolic acidosis, anemia, and oxidative stress in healthy wistar rats. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2020.
- [22] SUMITHRAN, P. *et al.* Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. **The New England Journal of Medicine**, v.368, n.10, p. 927-936, 2013.
- [23] MARTINS, C. *et al.* Association between ketosis and changes in appetite markers with weight loss following a very low-energy diet. **Obesity**, v.28, p.2331–2338, 2020.
- [24] GRAY, L.R.; TOMPKINS, S.C.; TAYLOR, E.B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, p. 2577–2604, 2014.
- [25] STUMVOLL, M.; CHINTALAPUDI, U.; PERRIELLO, G.; GERICH, J. E. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 274, n.6, E848-E854, 1998.
- [26] LEGOUIS, D., FAIVRE, A., CIPPA, P.E., DE SEIGNEUX, S. Renal gluconeogenesis: an underestimated role of the kidney in systemic glucose metabolism. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 37, p.1417–1425, 2022.
- [27] HATANO, R. *et al.* Hepatic ketone body regulation of renal gluconeogenesis. **Molecular Metabolism**, v.84, 2024.
- [28] THORENS, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. **Diabetologia**, v.58, p.221–232, 2015.
- [29] AHMAD, Y.; SEO, D.S.; JANG, Y. Metabolic Effects of Ketogenic Diets: Exploring Whole-Body Metabolism in Connection with Adipose Tissue and Other Metabolic Organs. **International Journal of Molecular Sciences**, 25, 7076, 2024.
- [30] CHADT, A.; AL-HASANI, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. **European Journal of Physiology**, v.472, p.1273–1298, 2020.
- [31] SCHMIDL, S.; TAMAYO ROJAS, SA.; IANCU, CV.; CHOE, J-Y.; OREB, M. Functional expression of the human glucose transporters glut2 and glut3 in yeast offers novel screening systems for glut targeting drugs. **Frontiers Molecular Biosciences**, v.7, 2021
- [32] FERRAMOSCA, A.; CONTE, A.; DAMIANO, F.; SICULELLA, L.; ZARA, V. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. **European Journal of Nutrition**, v.53, 2014.
- [33] WANG, X.; YU, W.; LI, S.; GUO, D.; HE, J.; WANG, Y. Acetyl-coA Carboxylases and Diseases. **Frontiers in Oncology**, v.12, 2022.
- [34] RÉGNIER, M.; CARBINATTI, T.; PARLATI, L.; BENHAMED, F.; POSTIC, C. The role of ChREBP in carbohydrate sensing and NAFLD development. **Nature Reviews Endocrinology**, v.19, 336–349, 2023.
- [35] WEI, J.; TONG, L. Crystal Structure of the 500-kDa Yeast Acetyl-coA Carboxylase Holoenzyme Dimer. **Nature**, v.526:723–727, 2015.

- [36] ALJOHANI, A.M.; SYED, D.B.; NTAMBI, J.M. Insights into Stearoyl-Coa Desaturase 1 regulation of systemic metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism** v.8, n.12, p. 831–842, 2017.
- [37] SUN, Q.; XING, X.; WANG, H.; WAN, K. et al. SCD1 is the critical signaling hub to mediate metabolic diseases: Mechanism and the development of its inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.170, 2024.
- [38] ZHANG, J.; LI, X.; YANG, L.; MA, N. et al. New advances in drug development for metabolic dysfunction- associated liver disease. **Cell & Bioscience**, 2024.
- [39] SILVA-SANTI, L.G.; ANTUNES, M.M.; CAPARROZ-ASSEF, S.M. et al. Liver fatty acid composition and Inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. **Nutrients**, v.6, 2018.



5.2 Artigo 2: ““Nomenclature of Genes, Risk Factors, Alleles and Haplotypes Related to Genotyping of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 Risk Alleles”, publicado na revista Austin Journal of Nutrition and Food Sciences ([austinpublishinggroup.com](http://austinpublishinggroup.com))

## Review Article

## Nomenclature of Genes, Risk Factors, Alleles and Haplotypes Related to Genotyping of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 Risk Alleles

Clédia Silveira Flores da Silva<sup>1\*</sup>; Augusto Schneider<sup>1</sup>;  
Ines Schadock<sup>2</sup>; Fabiana Torma Botelho<sup>1</sup>; Carlos Castilho  
Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nutrigenomic Laboratory, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil

<sup>2</sup>Medical Faculty, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brazil

\*Corresponding author: Carlos C Barros

Rua Gomes Carneiro, 01 sala 239, Porto, Pelotas – RS, Brazil.

Tel: +55 53 99192-4081

Email: [barrosccpel@gmail.com](mailto:barrosccpel@gmail.com)

Received: May 17, 2024

Accepted: June 10, 2024

Published: June 17, 2024

## Abstract

The HLA-DQ genotyping test is a simple, non-invasive and reliable method. The identification of risk haplotypes by genotyping contributes to a faster and earlier diagnosis, improving the prognosis of patients and avoiding complications. However, it is a challenge for healthcare professionals, when reading articles about the HLA-DQ test to notice differences in terms of names of alleles, HLA classes, loci, risk factors, genes, haplotypes, arrangement in homologous chromosomes, proteins and heterodimers, which makes it difficult to understand the studies and to interpret genetic tests. This is also difficult for researchers starting in celiac disease studies inhibiting them to join this area. Therefore, the aim of this study is to review the updated nomenclature used in HLA analysis. Therefore, recent bibliographies and nomenclature databases were analyzed to present the updated nomenclature of HLA-related risk factors from molecular to pathophysiological terms. The result is a brief review and simple table showing all levels of HLA risk-related factors and their relationships.

**Keywords:** Genetic markers; Gastroenteritis; Nutrition; Malnutrition

## Introduction

For a better understanding how, genetic factors influence the predisposition to develop typical CD intestinal lesions, it is necessary to understand the molecules involved in the pathogenesis of CD and how the genes encoding them are structured in the human genome. Therefore, we can recognize how allelic variations segregate and how those variations predispose to the risk for disease development.

The immune system is directly involved in the pathogeny of CD. Dendritic cells located in the lamina propria acquire a pro-inflammatory phenotype, migrating to the mesenteric lymph nodes. They present there gluten peptides via MHC class II complex, mainly by HLA heterodimers (combining alpha-1 and beta-1 subunits of HLA-DQ proteins) to naive CD4 T cells and promoting T cell activation [1]. The presentation of gluten peptides depends on genetic predisposition conferred by some risk alleles of alpha-1 and beta-1 HLA-DQ genes. Those alleles gener-

ate the major heterodimer risk for CD predisposition (HLA-DQ2 and HLA-DQ8). The loci of those alleles are very close to each other and they are also very near to the HLA-DR locus [1]. The proximity of those genes reduces the probability for a crossing over recombination, resulting in almost fixed segregation. Therefore, the concept of HLA-haplotype is important for the genetic heritability of those alleles, as they have a very strong genetic linkage and are inherited together during the meiosis phase of the sexual reproduction. In Table 1 it is organized the current nomenclature of the main HLA risk alleles for CD including: loci, genes, risk alleles, haplotypes, heterodimers and risk grade for the disease development.

The main important risky alleles for CD can be located on the same chromosome in cis configuration (DR3-DQ2 haplotype) or separately on homologous chromosomes in trans configuration (DR5-DQ7 plus DR5-DQ2 haplotypes) [2]. The risky haplotypes for CD are those containing the following alleles: A) the DQA1\*05:01 and DQB1\*02:01 alleles (DR3-DQ2 haplotype

that generate DQ2.5 heterodimer associated to a very high risk for CD), B) the combination of the haplotypes containing the DQA1\*05:05 and DQB1\*02:02 alleles (DR5-DQ7 and DR7-DQ2 haplotypes respectively, that combined also generate the DQ2.5 heterodimer), C) the haplotype containing DQA1\*02:01 and DQB1\*02:02 alleles (DR7-DQ2 haplotype that generate DQ2.2 heterodimer associated to a low risk for CD), and D) the haplotype containing the DRB1\*04 allele (DR4-DQ8 haplotype that generates DQ8 heterodimer associated to a high risk for CD). All those allele combinations encode the DQ2 and DQ8 heterodimers, which are part of the antigen recognition site of the HLA molecule present at the surface of the antigen-presenting cells [3] are associated with CD development (Table 1).

The HLA-DQ2 and HLA-DQ8 heterodimers play an important role in the development of CD, as they present the gliadin peptides and the deaminated gliadin peptides, that reach the

lamina propria, to the CD4+ T lymphocytes. This association of CD to the HLA-DQ heterodimers was demonstrated by isolating gliadin-reactive T cells from the intestinal mucosa. An important part of these activated T cells recognizes gluten when in contact with the HLA-DQ heterodimer, demonstrating the association of cells T to the HLA-DQ heterodimer and the CD [4].

Most celiac patients carry HLA-DQ2 heterodimers (90%) encoded by DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 alleles and a minority (5%) carry HLA-DQ8 encoded by DQA1\*03/DQB1\*03:02 alleles [5]. Since most CD patients have HLA-DQ2 and HLA-DQ8 heterodimers, those genetic markers together have a high negative predictive value [6]. **This way, the genotyping test can be used to exclude celiac disease in symptomatic patients who have started a gluten-free diet and can also be useful in clarifying a diagnosis, as well as in patients who had equivocal serology or biopsy findings and/or incomplete gluten elimination [7].**

**Table 1:** Relations between HLA genetic loci and proteins complexes.

Chromosome band	HLA class	Loci	Risk factor group	Haplotype names <sup>1</sup>	Alleles <sup>1,2,3</sup>	Chromosome disposition <sup>1</sup>	HLA-DQ Heterodimer <sup>1</sup>	Celiac disease predisposition <sup>1</sup>
6p21.3	HLA class II	HLA-DQA1 and HLA-DQB1	HLA-DQ2	DR3-DQ2	<b>DQB1*02:01, DQA1*05:01</b> and DRB1*03:01	<i>cis</i>	DQ2.5	Very high
				DR5-DQ7	<b>DQB1*03:01, DQA1*05:05</b> and DRB1*11:12	<i>trans</i>	DQ2.5	Very high
				plus				
				DR7-DQ2	<b>DQB1*02:02, DQA1*02:01</b> and DRB1*07			
			DR7-DQ2	<b>DQB1*02:02, DQA1*02:01</b> and DRB1*07	<i>cis</i>	DQ2.2	Low	
		HLA-DQ8 ->	DR4-DQ8	<b>DQB1*03:02, DQA1*03</b> and DRB1*04	<i>cis</i>	DQ8	High	

1- Data extract from (1)

2- Nomenclature formatted as described on <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html/> at January 2020.

3- The risky alleles for celiac disease are marked in bold.

### Discussion

This work seeks to clarify and understand the nomenclature of genes, factors, risk alleles and haplotypes related to the genotyping of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 and the role of those haplotypes in CD. As a result, an easy-to-read mini-review and a very useful table are presented to visualize all the updated terms used to describe the factors involved in CD. As a result, non-CD healthcare professionals now have now a simple CD factor nomenclature guide to help them understand the terms and interpret the results of several tests measuring the risk for CD development.

The genotyping test is a non-invasive, fast, simple and reliable method that can be performed using blood samples or cells from the oral mucosa. Therefore, this test can be used as a tool in the Nutrition area, for example, where HLA-DQ genotyping can help in the CD diagnosis, because in the presence of risk haplotypes and gastrointestinal symptoms, the nutritionist can guide the patient to seek medical help and thus investigate the possible CD diagnosis, reducing the risk of future complications such as nutritional deficiencies and generalized malnutrition. In the medical field, the genotyping test serves as a contributor to the medical CD diagnosis, as the HLA test can help to exclude the presence of CD in symptomatic patients who started a gluten-free diet and in patients who presented serology or uncertain findings on the biopsy.

With the discovery of the human genome, genotyping tests became more accessible, thus beginning to be inserted into

clinical practice. However, it was observed that the major challenge of ordering genetic tests is the interpretation and connection of these results to the personalized diagnosis and treatment. The difficulty to understand the nomenclature related to the risk factors for CD, such as the names of the haplotypes, alleles, genes, cluster factors, proteins, heterodimers, loci and chromosomal arrangement inhibit health professionals and graduate students, also making it difficult the reading and interpretation of genetic tests, increasing the risk of misinterpretation and delayed diagnosis.

In this sense, this mini review aimed to describe and explain the nomenclature of the risk factors for CD, providing a major understanding and knowledge to non-specialized health professionals.

### Material and Methods

This mini-review aimed to summarize the concepts and nomenclatures involved in the studies of the risk factors for CD. Articles relating CD and the genetic diagnosis of the main risk haplotypes for CD related to HLA-DQ groups were selected, as well as revision articles on pathological mechanisms and description of HLA-DQ groups in the last five years.

The articles were compared to the nomenclature stored on the international organization "HLA Nomenclature" available at <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html/> at January 2020. Therefore, the articles that presented the nomenclature in the old format were discarded. Therefore, the data found were summarized as text in the form of a short review, and the

updated nomenclature summarized in a simple table connecting all levels from chromosome position to the risk level.

#### References

1. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 493–525.
2. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of Celiac Disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am [Internet]*. 2012; 22: 639–60.
3. Roujon P, Guidicelli G, Moreau JF, Taupin JL. Immunogénétique de la maladie cœliaque. *Pathol Biol*. 2013; 61: 5–11.
4. Kaur A, Shimoni O, Wallach M. Celiac disease: from etiological factors to evolving diagnostic approaches. *J Gastroenterol*. 2017; 52: 1001–12.
5. Lionetti E, Castellana S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, et al. Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *N Engl J Med*. 2014; 371: 1295–303.
6. Muniz JG, Sdepanian VL, Fagundes Neto U. Prevalência da predisposição genética para doença celíaca nos doadores de sangue em São Paulo, Brasil. *Arq Gastroenterol*. 2016; 53: 267–72.
7. Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. *Am J Gastroenterol*. 2019; 114: 1587–92.

### 5.3 Artigo 3: “Effects of Resistance Training Combined with a Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis” ([medrxiv.org](https://doi.org/10.1101/2024.06.19.24308878))

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.19.24308878>; this version posted June 20, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

#### **Effects of Resistance Training Combined with a Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis**

Luis Roberto Sinott<sup>†</sup>, Clédia Silveira Flores da Silva<sup>†</sup>, Alice Künzgen Scheer, Amanda Barbosa Atrib, Augusto Scheneider, Carlos Castilho Barros

*Nutrigenomic Laboratory, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

<sup>†</sup> Esses autores contribuíram igualmente para esse trabalho.

**Corresponding author:** Professor Dr. Carlos C. Barros

Address: Rua Gomes Carneiro 01, Room 239, Porto, Pelotas – RS, Brazil.

CEP 96010-610

E-mail: [barrosccpel@gmail.com](mailto:barrosccpel@gmail.com)

Phone: +55 53 99192-4081

### **Abstract**

Weight loss treatments require adherence to physical exercise and diet. Restrictive diets have been proposed for obesity treatment, including a ketogenic diet that are high in lipids, moderate in proteins, and low in carbohydrates. In recent years, there has been criticism of this diet because of the reduction in fat-free mass and, consequently, a reduction in basal energy expenditure, which is considered negative in obesity treatment. However, resistance training is known to promote skeletal muscle hypertrophy. The hypothesis for this review was: "Resistance training is sufficient to maintain lean mass during diets that cause ketosis." Despite the slight reduction in lean mass identified in the meta-analysis, some authors reported no loss in physical performance. Others suggested that this difference in lean mass is associated with water loss in the participants, which aligns with a few studies that reported a final phase with carbohydrate reintroduction into the diet. Our results indicated physical exercise was an important tool for maintaining lean mass in individuals who consumed carbohydrate-restricted diets that cause ketosis.

**Keywords:** high-fat diet; carbohydrate-restricted diet; body composition; physical activity; muscle hypertrophy.

## Introduction

Resistance training is primarily used to gain muscle mass through anaerobic stimulation of muscle hypertrophy (SCHOENFELD et al. 2019). Resistance exercise can also reduce blood pressure (DE SOUSA et al. 2017) and blood glucose levels (TAKENAMI et al. 2019), increase basal metabolic rate (BMR) (DOLEZAL; POTTEIGER 1998), assist in weight loss (GOLDFIELD et al. 2017) and reduce cardiovascular mortality risk (SAEIDIFARD et al. 2019). The increase in total energy expenditure achieved through resistance training and BMR increase are consequences of the metabolic effects from exercise, lean mass gain (ARISTIZABAL et al. 2015; MACKENZIE-SHALDERS et al. 2020), and weight loss (HUNTER et al. 2015; MACKENZIE-SHALDERS et al. 2020).

Weight loss treatments primarily involve a combination of diet and physical exercise (MOZAFFARIAN et al. 2011). Although some professionals contest these restrictive strategies, weight loss diets tend to be constraining (VAN HORN 2014). Dietary restrictions can be based on energy deficits (DE SOUZA et al. 2012) or macronutrient composition (BUENO et al. 2013). Thus, they can include conventional hypocaloric (low energy density) (FOCK; KHOO 2013), low-fat (RAZAVI ZADE et al. 2016), low-carbohydrate (CARE; SUPPL 2020; KELLY; UNWIN; FINUCANE 2020), or high-protein diets (ZHAO et al. 2018).

Among the restrictive diets, the ketogenic diet restricts carbohydrate intake without necessarily restricting the total energy intake (KANG et al. 2020). A ketogenic diet is high in lipids, moderate in proteins, and low in carbohydrates (GIUGLIANO et al. 2018). Carbohydrate intake is typically limited to 50 g/day (MUSCOGIURI et al. 2019) or less than 10% of the total energy value, stimulating the production of ketone bodies that can be used as an energy source to maintain metabolism, although they are also excreted in the urine. Physiological ketosis promotes rapid initial weight loss due to increased diuresis in response to reduced glycogen levels in the tissues. Metabolic changes can occur due to the lack of carbohydrates in the diet or hormonal changes, notably the reduction of insulin release by the pancreas and the consequent reduction of gluconeogenesis stimulation, which requires energy expenditure. After stabilizing water loss, weight reduction can remain constant if the total energy intake is kept below the energy expenditure and other factors, such as metabolic waste and the elimination of ketone

bodies in the urine, are considered. However, this depends on an individual's adaptive process, as few people can endure the adaptation phase or maintain this diet for long periods (MUSCOGIURI et al. 2019). Although a ketogenic diet has several benefits, it can cause adverse effects such as dehydration, hypoglycemia, lethargy, halitosis, and gastrointestinal disturbances (O'NEILL; RAGGI 2020). These side effects are generally moderate and can be overcome with monitoring and adjustments in fiber and vegetable intake.

In recent years, diets that cause ketosis have been criticized because of their tendency to reduce lean mass (fat-free mass [FFM]) and, as a consequence, reduce basal energy expenditure, which is considered a negative effect in obesity treatment.

This study hypothesized that resistance training is an important tool for maintaining FFM during a ketogenic diet. Thus, we reviewed the literature and compiled articles that combined a ketogenic diet with resistance training; thereby conducted a systematic review and meta-analysis using their contents.

### **Methodology**

The preestablished protocol was registered on the PROSPERO website (CRD42018116655). The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines were followed (LIBERATI et al. 2009). To meet the eligibility criteria, articles were required to include experimental studies on ketogenic diets and resistance exercise in humans or animals. A systematic search of scientific works was conducted using three databases (PUBMED, Embase, and SportDiscus) published until June 10, 2020. The search algorithm is described in Supplementary Material (Table S1). In general, the search used the term "OR" between words identifying ketogenic diets and words identifying resistance exercises, and "AND" between the two groups. Adjustments were made to the algorithms for different databases. Duplicate articles, non-English or Portuguese articles, reviews, incomplete articles with only abstracts, and case studies were excluded. The remaining articles were filtered using the following inclusion and exclusion criteria:

**Inclusion criteria:** randomized controlled clinical trials that evaluated resistance training sessions associated with a ketogenic diet in men or women with or without chronic

diseases, trained or untrained, aged >18 years. The diets had to include <50 g of carbohydrates/day (up to 10% total caloric value or confirmed ketosis by circulating  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ HB)  $\geq 0.5$  mmol/L. The resistance training and diet had to be applied for at least 4 weeks, with body composition data read at the start and end of the study.

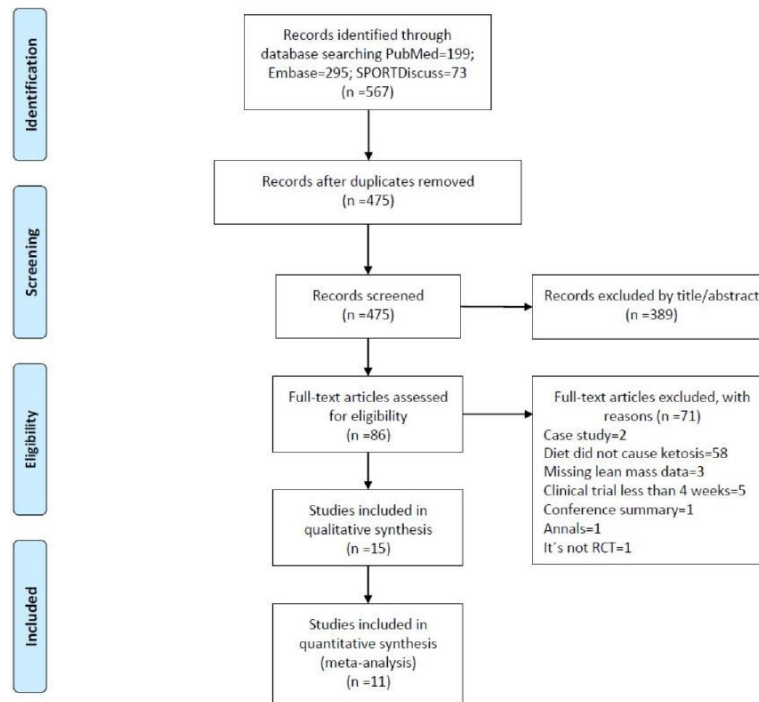
**Exclusion criteria:** Articles that did not report ketosis results for the participants, did not present lean mass values, had treatment durations of less than 4 weeks, or lacked a control group were excluded.

Two authors selected the articles. Group sizes, FFM changes, and standard deviations were extracted for the meta-analysis. When data were presented exclusively in graphs, GetData Graph Digitizer was used to extract them. The meta-analysis was performed using STATA software and the random method. The selected studies underwent bias evaluation using the RoB 2.0 tool (The Cochrane Collaboration, 2019).

A total of 567 articles 295 in EMBASE, 199 in PubMed, and 73 in SPORTDiscus. Of these, 92 duplicates were excluded. Studies in which body composition data were collected only at the beginning or end of the experiment were also excluded (Figure 1). When data were missing from the manuscript, the corresponding authors were contacted.

---





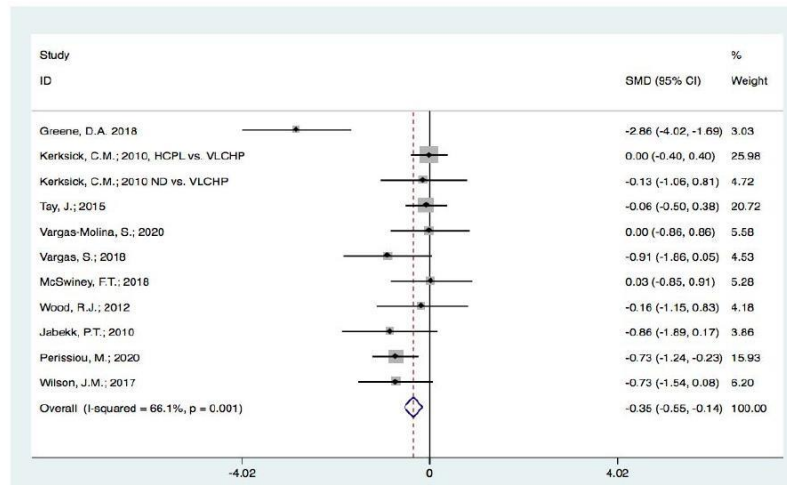
**Figure 1: Flowchart of the article selection process.**

## **Results and Discussion**

### **Effect of Resistance Exercise on Lean Mass Preservation in Humans**

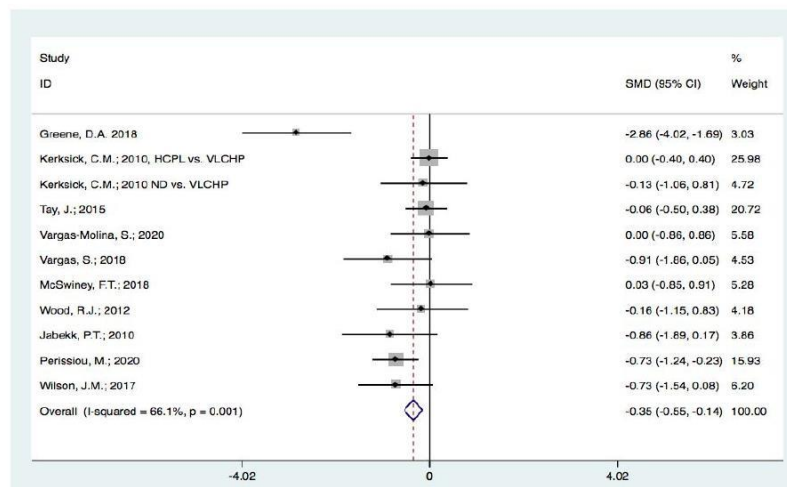
This study initially intended to verify whether resistance exercise was an effective tool for maintaining FFM during weight loss treatment with a ketogenic diet. Studies with experimental designs allowing the comparison of participants who consumed a ketogenic diet with and without resistance exercise were sought. However, such studies were not found in the literature. Therefore, studies presenting only exercise training groups consuming different diets were used to compare the FFM changes among diets.

Ten studies were selected for the meta-analysis. The details of these studies, including the sample population, dietary interventions, exercise protocols, sample size, intervention duration, and main results, are presented in Table 1. Despite the heterogeneity of the studies, the meta-analysis indicated a slight reduction of FFM in participants who consumed a ketogenic diet (Figure 2). The effect represented by the pooled D+L of SMD was -0.347 with a 95% confidence interval between -0.549 and -0.144. This analysis showed 2948 (df =10)  $p=0.001$ , I-squared (variation in SMD attributable to heterogeneity) = 66.1%, and between-study variance estimate tau-squared = 0.1252; SMD=0:  $z=3.36$   $p<0.001$ . The detailed results of the analysis are presented in Table 2.



**Figure 2:** Forest plot graph showing heterogeneity among the studies in the meta-analysis and a small reduction in FFM among the patients in the analyzed studies. Chi-square heterogeneity = 29.48 (df = 10),  $p = 0.001$ ; I-squared (variation in SMD attributable to heterogeneity) = 66.1%; between-study variance estimate T-squared = 0.1252; SMD = 0:  $z = 3.36$ ,  $p < 0.001$ .

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.19.24308878>; this version posted June 20, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



**Figure 2: Forest plot graph showing heterogeneity among the studies in the meta-analysis and a small reduction in FFM among the patients in the analyzed studies. Chi-square heterogeneity = 29.48 (df = 10), p = 0.001; I-squared (variation in SMD attributable to heterogeneity) = 66.1%; between-study variance estimate T-squared = 0.1252; SMD = 0: z = 3.36, p < 0.001.**

**Table 2. Meta-Analysis Results**

Study	SMD	[95% Conf. Interval]		% Weight
Greene, D.A.; 2018	-2.858	-4.022	-1.695	3.03
Kerksick, C.M.; 2010	0.000	-0.397	0.397	25.98
Kerksick, C.M.; 2010	-0.126	-1.057	0.806	4.72
Tay, J.; 2015	-0.060	-0.505	0.384	20.72
Vargas-Molina, S.; 2020	0.000	-0.856	0.856	5.58
Vargas, S.; 2018	-0.906	-1.856	0.045	4.53
McSwiney, F.T.; 2018	0.027	-0.854	0.908	5.28
Wood, R.J.; 2012	-0.164	-1.154	0.825	4.18
Jabekk, P.T.; 2010	-0.857	-1.887	0.173	3.86
Perissiou, M.; 2020	-0.735	-1.242	-0.228	15.93
Wilson, J.M.; 2020	-0.731	-1.544	0.081	6.20
I-V pooled SMD	-0.347	-0.549	-0.144	100.00

### **Effect of Diets on Body Composition and Physical Performance**

Given the results obtained in the meta-analysis, we examined how the authors discussed the causes of the reduction in FFM observed in the studies and whether this loss was reflected in decreased sports performance. Table 3 summarizes the effects observed in the 10 selected articles, highlighting whether carbohydrates were reintroduced at the end of the study, a FFM reduction was observed, the authors attributed this decrease to water loss due to the low-carbohydrate nature of the diets, athletic performance was reduced, and a ketogenic diet had a greater effect on reducing body weight and fat mass than the control diet.

Two studies that reintroduced carbohydrates into the diet at the end of the experiment for at least 1 week reported a small loss or a gain in FFM after carbohydrate reintroduction (KERKSICK et al., 2010; WILSON et al., 2020). Two other studies reported no change in FFM before and after a ketogenic diet despite a difference from the control diet, which showed an increase in FFM after resistance training (VARGAS-MOLINA et al., 2020). Four other studies reported no significant differences in FFM between the control and ketogenic diet groups (VARGAS-MOLINA et al., 2020; MCSWINEY et al., 2018; TAY et al., 2015; WOOD et al., 2012). Of the studies that observed a significant reduction in FFM, both discussed in their results that this effect could have been associated with water loss, a well-known phenomenon caused by diuresis in patients on carbohydrate-restricted diets (PERISSIOU M, BORKOLES E, KOBAYASHI K, 2020; GREENE DA, VARLEY BJ, HARTWIG TB, CHAPMAN P, 2018). Most studies reported that the ketogenic diet groups experienced a reduction in FFM; however in one of the two studies with carbohydrate reintroduction at the end this difference was reversed (WILSON et al., 2020).

**Table 3: Selected Studies and Their Effects Regarding Carbohydrate Reintroduction and Changes in Body Composition**

Study	Carbohydrate Reintroduction	Reduction in FFM	Blame Water*	Performance	Body Weight	Fat Mass
Greene 2018	No	Yes	Yes	Not affected	Reduced	Reduced
Kerksick 2010	Yes	Very small	No	Not evaluated	Reduced	Reduced
Tay 2015	No	No	N/A	Not evaluated	Similar	Similar
Vargas-Molina2020	No	No	N/A	Not affected	Reduced	Reduced
Vargas 2018	No	No difference inside group, but reduced comparing NKD group	Do not discuss water content	Not evaluated	Reduced	Reduced
McSwiney 2018	No	No	N/A	Not affected	Reduced	Reduced
Wood 2012	No	No	N/A	Not affected	Reduced	Reduced
Jabekk 2010	No	No difference inside group, but reduced comparing groups	Do not discuss water content	Not evaluated	Reduced	Reduced
Perissiou 2020	No	Yes	Yes	Not evaluated	Reduced	Similar reduction
Wilson 2020	Yes	Increase muscle in KD	N/A	Increased performance	Similar after reload carbo	Similar

\*Description if the authors commented on the loss of water to justify the differences in FFM.

N/A, not applicable because there was no FFM reduction.

### **Proposed Mechanisms for Lean Mass Maintenance through Exercise**

Among the selected studies, there was evidence related to the mechanisms involved in the effects of the ketogenic diet and resistance exercise on FFM variations. Since the activation of the AKT pathway has often been associated with muscle hypertrophy, a reduction in insulin release in low-carbohydrate diets might be the main cause of muscle mass loss. Although this hypothesis seems evident, studies in humans and animal models have failed to demonstrate this process, and more data are needed to verify this connection. Other compensatory mechanisms are also stimulated by exercise. A study in rats showed that basal levels of (p-rps6, p-4EBP1, and p-AMPK $\alpha$ ) were similar between diets, although serum insulin, serum glucose, and various essential amino acids levels were lower in rats fed a low-carb ketogenic diet (LCKD). Additionally, LCKD-and standard diet-fed rats exhibited increased levels of post-exercise muscle protein synthesis; however, no dietary effects were observed. Animals fed these diets and trained exhibited similar increases in relative hindlimb muscle mass compared to their sedentary counterparts, although there was no difference between the diet groups (ROBERTS et al., 2016).

A review (PAOLI et al., 2019) suggested that the overloaded regulatory systems controlling muscle hypertrophy as an effect of exercise reflect alterations in protein synthesis and degradation and consequent muscle hypertrophy. They also suggested that carbohydrate restriction in the diet involves the reduction of some hormones and their signaling, concluding that the data provided in the scientific literature suggest only a minor or no effect from the ketogenic diet on muscle mass with concurrent resistance training. The results of the present study support this hypothesis.

### **Conclusion**

This study systematically reviewed the literature to verify whether resistance training was an effective tool for maintaining FFM in individuals undergoing carbohydrate-restricted diets to induce ketosis. Although few studies have compared groups of ketogenic diets with or without exercise, we were able to compare individuals who underwent resistance training with or without ketosis-inducing diets. The meta-analysis indicated a slight reduction of FFM in individuals who



consumed ketogenic diets, a reduction that was reversed by carbohydrate reintroduction, or described as a possible effect of water loss due to the low-carbohydrate nature of the diets. In addition, to date, no study has demonstrated a loss of muscle strength associated with FFM loss or a ketogenic diet. These results strongly suggest that resistance training is an efficient tool for preserving lean mass in patients who consume diets that induce ketosis. Clinical trials comparing individuals with or without exercise and those consuming carbohydrate-restricted diets are necessary to confirm this conclusion.

### References

ARISTIZABAL, J. C. *et al.* Effect of resistance training on resting metabolic rate and its estimation by a dual-energy X-ray absorptiometry metabolic map. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], vol. 69, no. 7, p. 831–836, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.216>

BUENO, Nassib Bezerra *et al.* Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: A meta-analysis of Randomised controlled trials. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 110, no. 7, p. 1178–1187, 2013.

CARE, Diabetes; SUPPL, S S. Facilitating behavior change and well-being to improve health outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**, [s. l.], vol. 43, no. January, p. S48–S65, 2020. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc20-S005>

DE SOUSA, Evitom Corrêa *et al.* Resistance training alone reduces systolic and diastolic blood pressure in prehypertensive and hypertensive individuals: Meta-analysis. **Hypertension Research**, [s. l.], vol. 40, no. 11, p. 927–931, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/hr.2017.69>

DE SOUZA, Russell J. *et al.* Effects of 4 weight-loss diets differing in fat, protein, and carbohydrate on fat mass, lean mass, visceral adipose tissue, and hepatic fat: Results from the POUNDS LOST trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], vol. 95, no. 3, p. 614–625, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.026328>

DOLEZAL, Brett A.; POTTEIGER, Jeffrey A. Concurrent resistance and endurance training influence basal metabolic rate in nondieting individuals. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.],

vol. 85, no. 2, p. 695–700, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.2.695>

FOCK, Kwong Ming; KHOO, Joan. Diet and exercise in management of obesity and overweight. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, [s. l.], vol. 28, no. S4, p. 59–63, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/1/jgh.12407>

GIUGLIANO, Dario *et al.* More sugar? No, thank you! The elusive nature of low carbohydrate diets. **Endocrine**, [s. l.], vol. 61, no. 3, p. 383–387, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1580-x>

GOLDFIELD, Gary S. *et al.* Effects of aerobic or resistance training or both on health-related quality of life in youth with obesity: The hearty trial. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], vol. 42, no. 4, p. 361–370, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0386>

GREENE DA, VARLEY BJ, HARTWIG TB, CHAPMAN P, Rigney M. A Low-Carbohydrate Ketogenic Diet Reduces Body Mass Without Compromising Performance in Powerlifting and Olympic Weightlifting Athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], vol. 32, no. 12, p. 1–10, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002904>

HUNTER, Gary R. *et al.* Exercise Training and Energy Expenditure following Weight Loss. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], vol. 47, no. 9, p. 1950–1957, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000622>

KANG, Jie *et al.* Ergogenic Properties of Ketogenic Diets in Normal-Weight Individuals: A Systematic Review. **Journal of the American College of Nutrition**, [s. l.], vol. 39, no. 7, p. 665–675, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1725686>

KELLY, Tara; UNWIN, David; FINUCANE, Francis. Low-carbohydrate diets in the management of obesity and type 2 diabetes: A review from clinicians using the approach in practice. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], vol. 17, no. 7, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph17072557>

KERKSICK, Chad M. *et al.* Changes in weight loss, body composition and cardiovascular disease risk after altering macronutrient distributions during a regular exercise program in obese women. **Nutrition Journal**, [s. l.], vol. 9, no. 1, p. 59, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-59>

LIBERATI, Alessandro *et al.* The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], vol. 339, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.b2700>

MACKENZIE-SHALDERS, Kristen *et al.* The effect of exercise interventions on resting metabolic rate: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Sports Sciences**, [s. l.], vol. 38, no. 14, p. 1635–1649, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/02640414.2020.1754716>

MCSWINEY, Fionn T. *et al.* Keto-adaptation enhances exercise performance and body composition responses to training in endurance athletes. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], vol. 81, p. 25–34, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.10.010>

MOZAFFARIAN, Dariush *et al.* Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], vol. 364, no. 25, p. 2392–2404, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1014296>

MUSCOGIURI, Giovanna *et al.* The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: A practical guide. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], vol. 17, no. 1, p. 1–9, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2104-z>

O'NEILL, Blair; RAGGI, Paolo. The ketogenic diet: Pros and cons. **Atherosclerosis**, [s. l.], vol. 292, p. 119–126, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.021>

PAOLI, Antonio *et al.* Ketogenic diet and skeletal muscle hypertrophy: A Frenemy relationship? **Journal of Human Kinetics**, [s. l.], vol. 68, no. 1, p. 233–247, 2019. Available at: <https://doi.org/10.2478/hukin-2019-0071>

PERISSIOU M, BORKOLES E, KOBAYASHI K, Polman R. The Effect of an 8 Week Prescribed Exercise and Low-Carbohydrate Diet on Cardiorespiratory Fitness, Body Composition and Cardiometabolic Risk Factors in Obese Individuals: A Randomised Controlled Trial. **Nutrients**, [s. l.], p. 1–14, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12020482>

RAZAVI ZADE, Mohsen *et al.* The effects of DASH diet on weight loss and metabolic status in adults with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. **Liver International**, [s. l.], vol. 36, no. 4, p. 563–571, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1111/liv.12990>

ROBERTS, Michael D. *et al.* A putative low-carbohydrate ketogenic diet elicits mild nutritional

ketosis but does not impair the acute or chronic hypertrophic responses to resistance exercise in rodents. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], vol. 120, no. 10, p. 1173–1185, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00837.2015>

SAEIDIFARD, Farzane *et al.* The association of resistance training with mortality: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], vol. 26, no. 15, p. 1647–1665, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1177/2047487319850718>

SCHOENFELD, Brad J. *et al.* Resistance Training Volume Enhances Muscle Hypertrophy but Not Strength in Trained Men. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], vol. 51, no. 1, p. 94–103, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001764>

TAKENAMI, Eri *et al.* Effects of low-intensity resistance training on muscular function and glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, [s. l.], vol. 10, no. 2, p. 331–338, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1111/jdi.12926>

TAY, Jeannie *et al.* Comparison of low- and high-carbohydrate diets for type 2 diabetes management: A randomized trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], vol. 102, no. 4, p. 780–790, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.112581>

THE COCHRANE COLLABORATION. RoB 2 Guidance: Parallel Trial. [s. l.], no. July,p.1–24,2019.Available at: <https://methods.cochrane.org/bias/resources/rob-2-revised-cochrane-risk-bias-tool-randomized-trials>

VAN HORN, Linda. A diet by any other name is still about energy. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], vol. 312, no. 9, p. 900–901, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2014.10837>

VARGAS-MOLINA, Salvador *et al.* Effects of a ketogenic diet on body composition and strength in trained women. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, [s. l.], vol. 17, no. 1, p. 1–10, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00348-7>

WILSON, Jacob M. *et al.* **Effects of Ketogenic Dieting on Body Composition, Strength, Power, and Hormonal Profiles in Resistance Training Men.** [S. l.: s. n.], 2020. ISSN 15334287.vol. 34 Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001935>

WOOD, Richard J. *et al.* Preservation of fat-free mass after two distinct weight loss diets with and without progressive resistance exercise. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, [s.

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.19.24308878>; this version posted June 20, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

*I.*], vol. 10, no. 3, p. 167–174, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1089/met.2011.0104>

ZHAO, Wen Ting *et al.* High protein diet is of benefit for patients with type 2 diabetes. **Medicine (United States)**, [*s. I.*], vol. 97, no. 46, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013149>

### 5.3 Artigo publicado na revista Semear: INGESTÃO DE LÍQUIDOS DURANTE A REFEIÇÃO E AS POSSÍVEIS CAUSAS ASSOCIADAS A ESSA PRÁTICA | SEMEAR: Revista de Alimentação, Nutrição e Saúde (unirio.br)

#### SEMEAR: REVISTA DE ALIMENTAÇÃO, NUTRIÇÃO E SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – ESCOLA DE NUTRIÇÃO

##### INGESTÃO DE LÍQUIDOS DURANTE A REFEIÇÃO E AS POSSÍVEIS CAUSAS ASSOCIADAS A ESSA PRÁTICA

FLUID INGESTION DURING MEAL AND POSSIBLE CAUSES ASSOCIATED WITH THIS PRACTICE

Alice Künzgen Scheer<sup>1</sup>, Clédia Silveira Flores da Silva<sup>2</sup>, Amanda Barbosa Atrib<sup>2</sup>, Augusto Schneider<sup>3</sup>, Carlos Castilho Barros<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluna do curso de Bacharelado em Nutrição/ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil.

<sup>2</sup>Mestre e Doutoranda em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil.

<sup>3</sup>Professor Doutor do curso de Bacharelado em Nutrição/ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil.

##### Resumo

Revisar a literatura com relação à existência de uma contraindicação ou recomendação de evitar beber líquidos durante a refeição. Foi feita uma revisão de literatura, através da base de dados PubMed com as seguintes palavras no idioma inglês "fluids" "water" "juice" "drinking" "beverages" "digestion". Foram eleitos 13 artigos do tipo caso-controle realizados com humanos que analisaram o beber líquidos durante uma refeição. Os resultados mostraram que beber líquidos durante a refeição em determinados casos, pode melhorar a resposta glicêmica e a biodisponibilidade. Concluiu-se que nenhum artigo analisado na revisão de literatura, indicou que, beber líquidos durante a refeição acomete algum malefício para a saúde, inclusive alguns estudos recomendam essa prática.

**Palavras chaves:** Água; Bebidas; Digestão; Saúde.

##### Abstract

*Review the literature regarding the existence of a contraindication or recommendation to avoid drinking fluids during a meal. A literature review was carried out using the PubMed database with the following words in English "fluids" "water" "juice" "drinking" "beverages" "digestion". Thirteen case-control articles were chosen, carried out with humans, who analyzed the drinking of liquids during a meal. The results showed that drinking fluids during the meal in certain cases can improve the glycemic response and bioavailability. It was concluded that no analysed article in the literature review indicated that drinking liquids during the meal causes some harm to health. Actually, some studies recommend this practice.*

**Keywords:** Water; Drinks; Digestion; Health.

SEMEAR. 2023 jul-dez; 5(2): 1-12

## INTRODUÇÃO

Sabe-se que o consumo de água é de suma importância para manter a hidratação e consequentemente o bom funcionamento do organismo, sendo sua ingestão essencial a saúde<sup>1</sup>. Contudo, muitas pessoas questionam se a ingestão de água durante as refeições é contraindicada. Alguns documentos que servem como manual para os profissionais da saúde, como é o caso do *Desmistificando Dúvidas sobre Alimentação e Nutrição*, o qual traz informações sobre a ingestão de líquidos durante a refeição e recomenda evitar líquidos durante a refeição<sup>2</sup>.

Muitos profissionais da saúde, especialmente nutricionistas recomendam a não ingestão de líquidos durante as refeições<sup>3,5</sup>. Porém se observa que este é um hábito que a maioria das pessoas possuem.

Alguns estudos que avaliaram os padrões de consumo de líquidos ao dia encontraram em alguns casos, que a ingestão ao longo do dia pode inclusive ser maior durante as refeições, pois foi durante essa parte do dia em que as pessoas ingeriram mais líquidos. Um desses estudos, foi realizado por Iglesia-Altaba et al.<sup>6</sup> no ano de 2021 na Espanha com crianças e adolescentes, no qual a água foi o líquido mais comum durante as refeições. Em ambas as idades, o consumo de líquidos totais do dia foi maior durante as refeições principais<sup>6</sup>.

Mesmo assim, há constantes recomendações sobre não consumir ou evitar ingerir líquidos durante as refeições, principalmente em cartazes e manuais para profissionais da saúde. No entanto, falta embasamento científico sobre esse tema.

O presente trabalho visa revisar a literatura com relação à existência de uma contraindicação ou recomendação de evitar beber líquidos durante a refeição.

## MÉTODOS

Este trabalho se trata de uma revisão de literatura, realizada através da base de dados PubMed, a qual foi escolhida por abranger uma imensa literatura referente à área da saúde.

A busca de literatura se deu no dia 11 de fevereiro de 2022, no idioma inglês com o seguinte algoritmo de busca: (fluids[Title] OR water[Title] OR juice[Title] OR drinking[Title] OR beverages[Title]) AND (digestion[Title/Abstract]).

Como descrito, usando-se a ferramenta construtor de pesquisa avançada PubMed, foi possível obter um rastreamento pelo título e resumo, e ajustado com os termos “OR” e “AND”, sendo assim as palavras fluids, water, juice, drinking ou beverages apareceram no título e digestion apareceu no título ou no resumo. Foi utilizado o filtro de espécies, sendo escolhido apenas a espécie humana.

Para a seleção dos artigos científicos os critérios de inclusão foram estudos experimentais e do tipo caso-controle, realizados com humanos. Como parâmetros de exclusão, foram descartados aqueles realizados em animais, experimentos in vitro, estudos que falavam exclusivamente sobre álcool e os que não foram pertinentes com o tema.

A busca resultou em 295 artigos, compreendendo o período de 1950 até 11 de fevereiro de 2022. Destes 295, 281 foram descartados por serem realizados in vitro ou animais, por analisar alimentos e líquidos de forma isolada, falar exclusivamente de fluidos corporais, envolver patologias não associadas com o tema ou tratamento de água para consumo humano. Restaram 14 para leitura completa. Desses 14, 10 foram descartados pois não responderam ao objetivo do nosso trabalho, dentre esses 10, 3 não disponibilizavam o conteúdo na íntegra, sendo que a leitura do resumo não foi suficiente para se tirar uma conclusão. Então, ficaram 4 para fazer parte da revisão. Foi realizada uma busca ativa nas referências dos artigos que contemplaram os critérios de inclusão e dos descartados para que pudessem ser encontrados mais estudos para fazer parte da revisão, sendo assim, mais 4 foram adicionados.

Na falta de artigos do tipo caso-controle que pudessem responder à pergunta do presente trabalho, fez-se também busca ativa de artigos seguindo referências de documentos que discutiam sobre a ingestão de líquidos durante a refeição. Utilizou-se também referência do material de apoio<sup>2</sup>, destinado aos profissionais da saúde, desenvolvido pelo Ministério da Saúde juntamente com a Universidade Federal de Minas Gerais, o qual traz referências nas páginas 46 e 47, sendo 1 delas utilizadas para nosso estudo, pois se tratava de estudo de caso-controle referente ao nosso objetivo de estudo, e dentro desse artigo foram analisadas também suas respectivas referências, totalizando a adição de mais 3 estudos. Finalmente, foram utilizados 13 estudos para a realização desta revisão (Figura 1).



Quadro 1 - Principais características dos estudos incluídos na revisão

Autor	Título	Revista	Objetivo	Resultado
Andrade et al. <sup>9</sup>	Eating Slowly Led to Decreases in Energy Intake within Meals in Healthy Women	J Am Diet Assoc.	Comparar o impacto das taxas de alimentação lenta e rápida no desenvolvimento da saciedade, em mulheres saudáveis.	Comer devagar pode ajudar a maximizar a saciedade e reduzir a ingestão de energia nas refeições.
Andrade et al. <sup>10</sup>	Does eating slowly influence appetite and energy intake when water intake is controlled?	J Behav Nutr Phys Act.	Examinar a influência da taxa de alimentação e de água na regulação do apetite e de energia.	Ingestão de água pode ser responsável pelos efeitos da taxa de alimentação na regulação do apetite.
Ministério da Saúde <sup>2</sup>	Desmistificando dúvidas sobre alimentação e nutrição	Material de apoio para profissionais de saúde/MS	Recomendação da ingestão de líquidos durante as refeições principais.	Se esta ingestão for em quantidades moderadas, em geral, não será prejudicial.
Cuomo et al. <sup>11</sup>	Sweetened carbonated drinks do not alter upper digestive tract physiology in healthy subjects	Neurogastroenterol Motil.	Avaliar o efeito de bebidas carbonatadas adoçadas, consumidas com uma refeição padrão, na digestão de indivíduos saudáveis.	Quantidades moderadas de bebida gaseificada adoçada, com diferentes níveis de carbonatação, não modifica a fisiologia do trato digestivo superior.
Della Valle et al. <sup>12</sup>	Does the consumption of caloric and non-caloric beverages with a meal affect energy intake?	Appetite	Conteúdo de nutrientes e propriedades sensoriais de bebidas, consumidas com uma refeição, podem afetar a ingestão.	Bebidas calóricas consumidas com uma refeição, aumentam a ingestão de energia dos alimentos, mas não afetam significativamente as classificações de saciedade.
Freitas et al. <sup>7</sup>	Lemon juice, but not tea, reduces the glycemic response	Eur J Nutr.	Testar o impacto do chá preto e do suco de limão na resposta glicêmica	A inclusão de bebidas ou alimentos ácidos em refeições ricas em amido

	to bread in healthy volunteers: a randomized crossover trial		e energética da subsequente ingestão de pão em adultos saudáveis.	mostra ser uma estratégia simples e eficaz para reduzir o impacto glicêmico.
Freitas et al. <sup>8</sup>	Glycemic response, satiety, gastric secretions and emptying after bread consumption with water, tea or lemon juice: a randomized crossover intervention using MRI	Eur J Nutr.	Estudar concomitantemente o esvaziamento gástrico, a percepção do apetite e as respostas glicêmicas ao pão consumido com água, chá ou suco de limão.	O suco de limão diminuiu a resposta glicêmica e aumenta as secreções gástricas e a taxa de esvaziamento.
Kerimi et al. <sup>13</sup>	Pomegranate juice, but not an extract, confers a lower glycemic response on a high-glycemic index food: randomized, crossover, controlled trials in healthy subjects	Am J Clin Nutr.	Estudar o efeito dos polifenóis da romã na resposta glicêmica de um alimento de alto índice glicêmico quando consumidos juntos.	Os polifenóis da romã, quando presentes em uma bebida, mas não em um suplemento, podem reduzir a resposta glicêmica pós-prandial do pão.
Lappalainen et al. <sup>14</sup>	Drinking water with a meal: a simple method of coping with feelings of hunger, satiety and desire to eat	Eur J Clin Nutr	Examinar se beber água no café da manhã afeta a sensação de saciedade e fome, e quanto tempo após a refeição esse efeito é mantido.	Este estudo não permite, conclusões sobre a possível influência da água potável na ingestão real de alimentos durante e após uma refeição.
Pouderoux et al. <sup>15</sup>	Effect of carbonated water on gastric emptying and intragastric meal distribution	Dig Dis Sci.	Determinar o efeito da água gaseificada no esvaziamento gástrico juntamente com uma refeição mista voluntários	A água com gás não alterou esvaziamento de uma refeição mista de alto valor calórico.

			saudáveis.	
Rolls et al. <sup>16</sup>	Water incorporated into a food but not served with a food decreases energy intake in lean women	Am J Clin Nutr.	Examinar os efeitos da água, tanto servida com um alimento quanto incorporada a um alimento, na resposta da saciedade.	O consumo de alimentos com alto teor de água reduziu mais efetivamente a ingestão energética subsequente, do que a ingestão de água com alimentos.
Sabatier et al. <sup>17</sup>	Meal effect on magnesium bioavailability from mineral water in healthy women	Am J Clin Nutr.	Determinar a biodisponibilidade de magnésio a partir de água mineral, rica em magnésio, em indivíduos saudáveis quando consumidos sozinhos e simultâneo com refeições.	A biodisponibilidade de magnésio da água mineral é aumentada quando a água é consumida com uma refeição.
Te Wierik et al. <sup>18</sup>	Do alcoholic beverages have an additional effect on the postprandial gastrin response in humans?	Alcohol Alcohol.	Avaliar se bebidas alcoólicas combinadas com uma refeição normal, têm efeito adicional na resposta pós-prandial da gastrina.	O estudo não suporta a hipótese de que o consumo de cerveja ou vinho durante uma refeição tenha um efeito positivo na liberação de gastrina.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Dentre os avaliados, foram encontrados estudos que focalizaram em analisar a resposta glicêmica, comparando ingestão de diferentes bebidas com um alimento. Freitas et al.<sup>7</sup>, em seu estudo, testaram o impacto do chá preto e do suco de limão na resposta glicêmica ao pão, portanto foi dado aos participantes cerca de 100 g de pão juntamente com 250 ml de água (como controle), 250 ml de chá preto ou suco de limão. Observaram que, o consumo de pão com suco de limão promoveu um atraso e redução da concentração máxima de glicose no sangue pós-prandial. Nesse mesmo estudo, uma refeição ad libitum foi servida 3 horas após essa refeição teste para investigar se ocorreu algum efeito na ingestão de energia após o consumo da refeição teste, nenhum efeito foi observado. A interrupção precoce da hidrólise do amido no estômago, devido a inativação prematura da amilase salivar induzida pelo ácido, faz com que exista mais amido não hidrolisado, o que consequentemente atrasaria a absorção de glicose derivada do amido<sup>7</sup>. Tal achado, é compatível com um estudo mais recente do ano de 2022 de Freitas et al.<sup>8</sup>, o qual também analisou o consumo de pão com água, chá ou suco de limão.

Kerimi et al.<sup>13</sup>, com essa mesma ênfase na resposta glicêmica, realizaram a comparação da ingestão de extrato de romã em cápsula, juntamente com água e pão, suco de romã e o pão, e viram que os polifenóis da romã quando presentes em bebidas podem ter efeito sobre a redução da resposta glicêmica, já se consumidos em forma de suplemento não tem tal efeito. Trata-se da questão dos polifenóis estarem mais disponíveis quando presentes em alguma bebida do que a análise direta entre alimento e ingestão de líquido, mas que traz como resultado que a ingestão desse determinado suco com pão é mais preferível, pois os polifenóis conseguiram inibir a  $\alpha$ -amilase, sendo assim, reduzindo a resposta glicêmica<sup>13</sup>.

A biodisponibilidade também pode ser alterada ao haver o hábito de ingestão de líquidos durante as refeições, Sabatier et al.<sup>17</sup> analisaram a biodisponibilidade de magnésio a partir da água mineral rica em magnésio quando consumida sozinha ou simultaneamente com a refeição. A refeição era composta por 56 g de torrada, 10 g de manteiga e 30 g de geleia. Quando a água mineral foi ingerida com essa refeição, a absorção e retenção de magnésio foram maiores do que apenas o consumo de água mineral de forma isolada. Com esse resultado o estudo recomendou que a água mineral seja consumida com refeições, a fim de aumentar a biodisponibilidade de magnésio. Uma possível explicação seria de que a refeição torna o trânsito mais lento levando à um aumento da exposição do magnésio às células da mucosa do intestino e assim se tornando mais absorvível<sup>17</sup>.

Já outros dois estudos de Andrade et al.<sup>9,10</sup> se direcionaram a estudar a forma como a refeição é ingerida, rápida e lenta, com a ingestão de água ad libitum ou controlada. Ambos os estudos tiveram o mesmo tipo de refeição que foi massa ditalini com tomate em cubos enlatado,

pastas de tomate, aipo e alho refogados no azeite e queijo parmesão, sendo os dois estudos com mulheres. O estudo que utilizou a água ad libitum na refeição lenta e rápida verificou que as mulheres consumiram mais água quando fizeram a ingestão da refeição de maneira lenta e isso levou a um maior peso total da refeição e que pode ter induzido mais distensão estomacal potencializando a saciedade e diminuindo também a ingestão energética<sup>9</sup>. Já o estudo que fez o controle da água na refeição lenta e rápida, no volume de 300 ml, concluiu que a ingestão de água controlada associada a prática de dar pequenas mordidas, de fazer pausas entre as mordidas e mastigar bem os alimentos está associada a menor fome e maior saciedade, mas que não tem relação com a diminuição de ingestão energética<sup>10</sup>. No entanto, Rolls et al.<sup>16</sup> mostraram que a ingestão energética pode não ser diminuída ao beber grandes quantidades de água em uma refeição. Também recrutaram mulheres para o estudo e compararam a água incorporada em um alimento com a água servida a parte do alimento para analisar a saciedade. As participantes receberam pré-cargas antes do almoço, que consistiam em caçarola de arroz de frango, caçarola de arroz de frango servida com um copo de água (356 ml) ou sopa de arroz de frango (a qual continha os mesmos ingredientes da caçarola servida com água), e então compararam a ingestão de energia posteriormente. Foi observado que elas consumiram menos energia quando consumido a sopa, e não quando consumido a caçarola com ou sem água, ou seja, quando a água é incorporada em um alimento existe uma redução na ingestão de energia, mas quando a água é servida como bebida com um alimento não existe tal efeito. O que pode ser explicado pelo fato de que a sopa gerou diferenças na dispersão dos nutrientes no intestino ou no esvaziamento gástrico, ou também por ela ter um maior volume e causado uma maior distensão gástrica, todas essas possibilidades conduzem a saciedade<sup>16</sup>.

Lapalainen et al.<sup>14</sup> pensando também em saciedade, dirigiram seu estudo para analisar a ingestão de água com uma refeição. Estudo o qual foi realizado com mulheres, as quais tomaram três cafés da manhã com dois copos extras de água e três cafés da manhã semelhantes sem água durante os dias de estudo. Ao final, verificaram que a saciedade foi maior durante a refeição com água, mas que esse efeito não se manteve após a refeição<sup>14</sup>. O consumo de diferentes bebidas juntamente com a refeição também foi estudado a fim de observar se alguma delas afetaria a ingestão de energia.

Uma pesquisa foi realizada com mulheres, as quais almoçaram com a ingestão de bebidas que poderia ser 360 ml de água, de refrigerante diet e normal, de suco de laranja ou de leite, comparando também com a refeição sem a ingestão de bebidas. O almoço consistia em massa com molho de tomate, uma salada com alface romana e tomate cereja, pão branco, biscoitos de creme de baunilha. Esse estudo demonstrou que bebidas com diferenças em

macronutrientes, calorias e características sensoriais, quando consumidas com uma refeição, não afetou significativamente a ingestão total de energia na refeição exceto quando houve adição pelo conteúdo energético da bebida, sem afetar a saciedade, ou seja, apenas o conteúdo energético da bebida é responsável pela maior ingestão de energia, e não o fato do líquido ser o responsável<sup>12</sup>.

Pouderoux et al.<sup>15</sup> analisaram o esvaziamento gástrico de uma refeição referente ao consumo de água carbonatada. A refeição teste consistiu em 2 ovos, 5 g de manteiga, 40 g de pão, 1 fatia de pão americano queijo, 113 g de pudim de chocolate, 250 ml de suco de laranja e 300 ml de água com gás ou água sem gás, as calorias dessa refeição foram de aproximadamente 700 Kcal. Os alimentos sólidos foram consumidos primeiro, em seguida o suco e após a água foi ingerida gradualmente. Ao final, foi descoberto que a água carbonatada não afetou o esvaziamento gástrico da refeição, mas houve mudança na distribuição intragástrica, o que pode ser atribuído à liberação do gás dissolvido<sup>15</sup>. Tal descoberta corrobora com o estudo de Cuomo et al.<sup>11</sup> que observou que bebidas adoçadas ou bebidas adicionadas de dióxido de carbono não influenciam o esvaziamento gástrico de uma refeição com cerca de 480 Kcal.

Por fim, o estudo de Wierik et al.<sup>18</sup> descreveu o impacto da ingestão de água na resposta pós-prandial da gastrina, pois a liberação de gastrina está relacionada também com a distensão gástrica. Foi oferecido cerca de 400 ml de água mineral juntamente com uma janta, a qual não mencionaram os alimentos, deram dois copos antes e dois durante o jantar, e não constaram nenhum efeito da água junto a uma refeição em relação a secreção desse hormônio<sup>18</sup>.

## CONCLUSÃO

O presente estudo não encontrou nenhum artigo que recomendasse que não se possa ingerir líquidos durante a refeição, e não foi visto nenhum efeito negativo sobre essa prática. Pelo contrário, alguns estudos inclusive recomendam tal hábito em determinados casos, melhorar a resposta glicêmica e biodisponibilidade. A literatura ainda é escassa em relação a esse tema, fazendo-se necessário a elaboração de novos estudos que analisem diretamente o consumo com o não consumo de líquidos durante uma refeição, também incluindo mais tipos de populações, pois muitos que encontramos foram com mulheres. Por fim, não foi encontrado estudos que corroboram com a recomendação de evitar ingerir líquidos durante as refeições.

## REFERÊNCIAS

1. Benelam B, Wyness L. Hydration and health: a review. *Nutr Bull.* 2010;35(1): 3-25. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2009.01795.x>.
2. Ministério da Saúde (Brasil). Desmistificando dúvidas sobre alimentação e nutrição: material de apoio para profissionais de saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/desmistificando\\_duvidas\\_sobre\\_alimentacao\\_nutricao.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/desmistificando_duvidas_sobre_alimentacao_nutricao.pdf)
3. Bizerra MV. O consumo de água durante as refeições [internet]. Goiânia: Hospital do Rim; 2020. Disponível em: <https://hospitalhr.com.br/o-consumo-de-agua-durante-as-refeicoes/>.
4. Machado T. Beber durante a refeição faz mal? Nutricionista explica mitos e verdades [internet]. [s.l.]: Instituto de Longevidade MAG; 2020. Disponível em: <https://institudolongevidademag.org/longevidade-e-saude/alimentacao/beber-durante-a-refeicao-faz-mal>
5. Zanin T. Beber água na refeição realmente engorda? [internet]. [s.l.]: Tua Saúde - Revista Eletrônica; 2021. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/beber-durante-as-refeicoes-faz-mal/>
6. Iglesia-Altaba I, Miguel-Berges ML, Morin C, Moreno-Aznar LA. Are Spanish children drinking enough and healthily? An update of the Liq.in7 cross-sectional survey in children and adolescents. *Nutr Hosp.* 2021;38(3):446-457. <https://doi.org/10.20960/nh.03442>.
7. Freitas D, Boué F, Benallaoua M, Airinei G, Benamouzig R, Le Feunteun S. Lemon juice, but not tea, reduces the glycaemic response to bread in healthy volunteers: a randomized crossover trial. *Eur J Nutr.* 2021;60(1):113-122. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02228-x>.
8. Freitas D, Boué F, Benallaoua M, Airinei G, Benamouzig R, Lutton E, et al. Glycemic response, satiety, gastric secretions and emptying after bread consumption with water, tea or lemon juice: a randomized crossover intervention using MRI. *Eur J Nutr.* 2022;61(3):1621-1636. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02762-2>.
9. Andrade AM, Greene GW, Melanson KJ. Eating slowly led to decreases in energy intake within meals in healthy women. *J Am Diet Assoc.* 2008;108(7):1186-1191. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.04.026>.
10. Andrade AM, Kresge DL, Teixeira PJ, Baptista F, Melanson KJ. Does eating slowly influence appetite and energy intake when water intake is controlled? *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2012;9:135. <https://doi.org/10.1186/1479-5868-9-135>

## 6. Considerações finais:

Devido a pandemia do Coronavírus obtivemos atraso na liberação dos animais por parte do Comitê de Ética de Animal fazendo com que ocorresse demora para iniciar o experimento e, assim, prejudicando a realização de todos os testes e análises. Apesar das intercorrências, tive a oportunidade de expandir minha produção acadêmica por meio da publicação de trabalhos. Entre estes, publiquei uma mini revisão relacionada ao meu mestrado sobre alelos associados à doença celíaca, intitulada "*Nomenclature of Genes, Risk Factors, Alleles and Haplotypes Related to Genotyping of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 Risk Alleles*", publicada na revista *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*. Este trabalho teve como objetivo revisar a nomenclatura utilizada na análise do HLA a fim de apresentar a nomenclatura atualizada dos fatores de risco relacionados ao HLA de termos moleculares a fisiopatológicos.

Outro estudo relevante foi sobre os efeitos do exercício físico aliado à dieta cetogênica, um tema alinhado à minha linha de pesquisa no doutorado. Este estudo, intitulado "*Effects of Resistance Training Combined with a Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis*", está disponível como "pre-print" no link <https://doi.org/10.1101/2024.06.19.24308878> e este trabalho foi submetido a revista *Nutrition Bulletin*. Nessa pesquisa, mostramos a importância do exercício físico na manutenção da massa magra em indivíduos submetidos a dietas restritivas de carboidratos que causam cetose.

Além das publicações acima, atuei no desenvolvimento de duas patentes em colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Carlos, ambas registradas no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), sendo: 1) "Método para genotipagem do polimorfismo rs3813627 do gene APOA2; e 2) "Método para genotipagem do polimorfismo rs11872992 do gene MC4R", ambas depositadas em 20/02/2024 conforme comprovantes em anexo.

Também contribuí como membro da banca avaliadora de trabalhos de conclusão de curso de duas alunas: Alice Künzgen Scheer e Gabriela Lopes Garcia. O trabalho da Alice foi publicado na Revista Semear com o título "A ingestão de líquidos durante a refeição e as possíveis causas associadas a essa prática" (v. 5, p. 1-12, 2023). Esse estudo mostrou que beber líquidos durante a refeição em alguns casos, pode melhorar a resposta glicêmica e a



biodisponibilidade de nutrientes. Também mostramos que beber líquidos durante a refeição não causa prejuízo para a saúde.

Além disso, coorientei, junto com a Professora Alessandra Doumid Borges Pretto, a aluna Morgana Pilição da Cruz no curso de Nutrição. Morgana desenvolveu um trabalho sobre os efeitos da doença celíaca em diferentes sistemas orgânicos, atualmente aceito para publicação na Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.

Realizei um período sanduíche no Max Delbrück Center for Molecular Medicine, em Berlim, na Alemanha sob orientação do Professor Michael Bader. Nesse período, participei do estudo sobre a reversibilidade da hipertrofia vascular renal em camundongos tratados cronicamente com Captopril. Essa pesquisa tem como objetivo aprofundar o conhecimento em relação a hipertrofia vascular renal concêntrica. Essa doença que ocorre no rim tem, como característica, o acúmulo de células da renina que se se formam ao longo e dentro das paredes das arteríolas renais, podendo ser causada pela inibição a longo prazo dos genes do sistema renina-angiotensina, e também pelo uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina. Essa hipertrofia é caracterizada pelo espessamento progressivo das artérias interlobulares e arteríolas aferente. Esse evento ocorre principalmente pela conversão e acúmulo interno de células musculares lisas onde as células renais alteram seu próprio fenótipo, a estrutura e a composição de seu ambiente extracelular. A liberação de renina depende da pressão arterial. No caso da utilização prolongada de medicamentos que inibem a enzima conversora de angiotensina causando redução da pressão arterial em pacientes cardíacos, pode levar a um aumento de produção renina gerando acúmulo patológico de células musculares lisas que causam espessamento dos vasos renais e conseqüentemente a perda da função renal. O acúmulo dessas células acontece por meio do estímulo e conversão das células musculares lisas em células produtoras de renina. Diante disso, estudar os mecanismos pelos quais ocorre esta doença é de grande importância.

Parte deste estudo foi realizado por mim no Brasil, onde fizemos a parte do experimento *in vivo* e coleta das amostras. Levamos estas amostras para serem analisadas em Berlim. Essa experiência foi fundamental para aprimorar minhas habilidades em técnicas laboratoriais avançadas, como *Western Blot*, RT-PCR e culturas celulares, além de me permitir participar de congressos

importantes, incluindo a conferência *Nature Meets e Bradykinin*. Esse conjunto de atividades permitiu não apenas o avanço na minha formação científica, mas também o fortalecimento de minhas colaborações e competências em diversas áreas da pesquisa.

## 6.5 Depósito da patente da APOA2:



20/02/2024 870240013982  
15:34  
  
29409162315965280

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 003293 4

---

**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 92242080000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus  
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** Brasil

**Telefone:** (53) 3284 4086

**Fax:**

**Email:** epitte@ufpel.edu.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Método para genotipagem do polimorfismo rs3813627 do gene APOA2

**Resumo:** A presente invenção apresenta um método caracterizado por usar quatro iniciadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para a amplificação de fragmentos de DNA que identificam o polimorfismo rs3813627 do gene APOA2, através da reação em cadeia da enzima DNA-polimerase. O presente método é adequado para a identificação e genotipagem dos alelos G ou T do polimorfismo rs3813627, tornando possível o reconhecimento de indivíduos com maior predisposição genética para desenvolverem obesidade, maior acúmulo de gordura visceral e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Diversos iniciadores foram desenhados com ferramentas de bioinformática e testados em diferentes condições de reação até se alcançar uma condição ótima para o diagnóstico da genotipagem do polimorfismo com uma única reação utilizando os oligonucleotídeos selecionados. A invenção poderá contribuir para identificação dos riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas e obesidade nos indivíduos e contribuir para uma melhor prevenção e tratamento dessas doenças. Este método tem a vantagem, com relação a outros métodos de genotipagem, de ser mais barato e possibilitar a que seja feito em laboratórios comuns de análises clínicas.

**Figura a publicar:** 1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 5**

**Nome:** CARLOS CASTILHO DE BARROS  
**CPF:** 11053432860  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Professor do ensino superior  
**Endereço:** Praça Cel. Pedro Osório 104, Centro  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96010-015  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (53) 991 924081  
**Fax:**  
**Email:** barroscpel@gmail.com

**Inventor 2 de 5**

**Nome:** AMANDA BARBOSA ATRIB  
**CPF:** 02730607080  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Doutorando  
**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves 374, ap. 402, Centro  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96015-560  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (51) 996 923361  
**Fax:**  
**Email:** amanda\_b\_atrib@hotmail.com

**Inventor 3 de 5**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982

**Nome:** MARCELLO DE SOUZA ALVES

**CPF:** 16253106767

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Gal. Osório 860, ap. 101, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (21) 966 725565

**Fax:**

**Email:** alvesmarcello420@gmail.com

**Inventor 4 de 5**

**Nome:** CLÉDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA

**CPF:** 02802114069

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Dr. João Pessoa 361, ap 401, bl A, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-470

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 984 380360

**Fax:**

**Email:** clediajag@gmail.com

**Inventor 5 de 5**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982

**Nome:** ALICE KÜNZGEN SCHEER  
**CPF:** 03427409031  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Mestrando  
**Endereço:** Rua Nilo Peçanha 120, ap 404, bl B  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96055-410  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (53) 984 144150  
**Fax:**  
**Email:** alicekunzgen@gmail.com

**Documentos anexados**

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Resumo	RESUMO_APOA2.pdf
Reivindicação	REINVIDICACOES_APOA.pdf
Relatório Descritivo	DESCRITIVO_APOA2.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Desenho	sequencias.pdf

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982

**Sequências Biológicas**

---

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

<b>Tipos de Sequências Biológicas</b>	<b>Nome</b>
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	sequencias.txt

**Acesso ao Patrimônio Genético**

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

**Declaração de veracidade**

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
20/02/2024 às 15:34, Petição 870240013982



## 6.6 Depósito da patente MC4R:



20/02/2024 870240013996  
15:53  
  
29409162315965248

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 003301 9

---

**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 92242080000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus  
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** Brasil

**Telefone:** (53) 3284 4086

**Fax:**

**Email:** epitte@ufpel.edu.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Método para genotipagem do polimorfismo rs11872992 do gene MC4R

**Resumo:** A presente invenção apresenta um método caracterizado por usar quatro iniciadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para a amplificação de fragmentos de DNA que identificam o polimorfismo rs11872992 do gene MC4R, através da reação em cadeia da enzima DNA-polimerase. O presente método é adequado para a identificação e genotipagem dos alelos G ou A do polimorfismo rs11872992, tornando possível o reconhecimento de indivíduos com maior predisposição genética para desenvolverem obesidade, aumento do IMC, aumento do percentual de gordura corporal, aumento da ingestão de alimentos e diminuição do gasto energético. Diversos iniciadores foram desenhados com ferramentas de bioinformática e testados em diferentes condições de reação até se alcançar uma condição ótima para o diagnóstico da genotipagem do polimorfismo com uma única reação utilizando os oligonucleotídeos selecionados. A invenção poderá contribuir para identificação dos riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas e obesidade nos indivíduos e contribuir para uma melhor prevenção e tratamento dessas doenças. Este método tem a vantagem, com relação a outros métodos de genotipagem, de ser mais barato e possibilitar a que seja feito em laboratórios comuns de análises clínicas.

**Figura a publicar:** 1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 5**

**Nome:** CARLOS CASTILHO DE BARROS  
**CPF:** 11053432860  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Professor do ensino superior  
**Endereço:** Rua São Borja 1114  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96090-660  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (53) 991 924081  
**Fax:**  
**Email:** barroscpel@gmail.com

**Inventor 2 de 5**

**Nome:** AMANDA BARBOSA ATRIB  
**CPF:** 02730607080  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Doutorando  
**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves 374, ap. 402, Centro  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96015-560  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (51) 996 923361  
**Fax:**  
**Email:** amanda\_b\_atrib@hotmail.com

**Inventor 3 de 5**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996

**Nome:** MARCELLO DE SOUZA ALVES

**CPF:** 16253106767

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Endereço residencial completo: Rua Gal. Osório 860, ap. 101, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (21) 966 725565

**Fax:**

**Email:** alvesmarcello420@gmail.com

**Inventor 4 de 5**

**Nome:** CLÉDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA

**CPF:** 02802114069

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Dr. João Pessoa 361, ap 401, bl A, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-470

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 984 380360

**Fax:**

**Email:** clediajag@gmail.com

**Inventor 5 de 5**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996

**Nome:** ALICE KU"NZGEN SCHEER  
**CPF:** 03427409031  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Qualificação Física:** Estudante de Graduação  
**Endereço:** Rua Nilo Peçanha 120, ap 404, bl B  
**Cidade:** Pelotas  
**Estado:** RS  
**CEP:** 96055-410  
**País:** BRASIL  
**Telefone:** (53) 984 144150  
**Fax:**  
**Email:** alicekunzgen@gmail.com

---

**Documentos anexados**

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Resumo	RESUMO_MC4R992.pdf
Relatório Descritivo	RELATORIO.pdf
Reivindicação	reindicacoesMC4R.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Desenho	sequencias.pdf

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996

**Sequências Biológicas**

---

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

<b>Tipos de Sequências Biológicas</b>	<b>Nome</b>
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	sequencias.txt

**Acesso ao Patrimônio Genético**

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

**Declaração de veracidade**

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
20/02/2024 às 15:53, Petição 870240013996