

RUAN CARLOS MACÊDO DE MORAES

**IMPACTOS DE UMA ESTRATÉGIA DE JEJUM INTERMITENTE
ASSOCIADA A TREINAMENTO DE *ENDURANCE* NA COMPOSIÇÃO
CORPORAL E DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS WISTAR**

UBERABA

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

Ruan Carlos Macêdo de Moraes

**IMPACTOS DE UMA ESTRATÉGIA DE JEJUM INTERMITENTE
ASSOCIADA A TREINAMENTO DE *ENDURANCE* NA COMPOSIÇÃO CORPORAL
E DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e Exercício” (Linha de Pesquisa: Exercício físico, ajustes e adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Dr. Moacir Marocolo Júnior*

UBERABA
2016

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M823i Moraes, Ruan Carlos Macêdo de
Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento
de *endurance* na composição corporal e desempenho físico de ratos Wistar /
Ruan Carlos Macêdo de Moraes. -- 2016.
58 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Prof. Dr. Moacir Marocolo Júnior

1. Exercício. 2. Jejum. 3. Aptidão física. 4. Metabolismo. 5. Ratos Wistar.
I. Marocolo Júnior, Moacir. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

CDU 613.72

Ruan Carlos Macêdo de Moraes

**IMPACTOS DE UMA ESTRATÉGIA DE JEJUM INTERMITENTE
ASSOCIADA A TREINAMENTO DE *ENDURANCE* NA COMPOSIÇÃO CORPORAL
E DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e Exercício” (Linha de Pesquisa: Exercício físico, ajustes e adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 19 de Fevereiro de 2016

Banca Examinadora:

Dr. Moacir Marocolo Júnior
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Orientador

Dr. Guilherme Vannucchi Portari
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Alex Soares Marreiros Ferraz
Universidade Federal do Ceará

UBERABA

2016

*Dedico este manuscrito aos de quem herdei todas as
minhas bases nitrogenadas, meus pais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Moacir Marocolo pela oportunidade concedida para que eu tivesse este período curto, mas bem aproveitado, de engrandecimento pleno. Assim, agradeço também a todos que me ajudaram a concretizar este projeto em meio à tantos problemas e reviravoltas, mas que foram essenciais para que eu tivesse reconhecido grandes amigos que levarei por toda minha vida. Faço aqui um agradecimento especial ao Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari que me acolheu como um filho e me ajudou a seguir em momentos tão difíceis durante a execução do presente trabalho. Assim como também agradeço às grandes contribuições do Prof. Dr. Alex Ferraz, que mesmo de longe pôde ser peça chave em momentos cruciais de minha formação acadêmica e de minha pós-graduação, ajudando em partes essenciais do trabalho.

Agradeço também à Kátia Aparecida, química do laboratório que me ajudou a 'quebrar a cabeça' resolvendo os protocolos, me apoiou nas análises, foi minha companhia durante todo esse processo, e me deu um grande aporte emocional sempre que precisei, para que não desistisse e seguisse sempre com alegria e perseverança. Com certeza se minhas análises saíram com tanta qualidade, grande parte do mérito é dela. Também não posso esquecer das alunas do curso de Nutrição, principalmente da Isadora Lima, que me ajudou durante o treinamento dos animais e a Letícia Wolf, que contribuiu durante as análises bioquímicas.

Agradeço à Isadora, que foi uma pessoa essencial para minha permanência longe de minha família. Foi minha companhia nas horas de agonia e de alegria e nunca deixou minha autoestima ruir. Ela foi meu alicerce em Uberaba, e mostrou que é uma mineirinha com coração de nordestina. Se hoje apresento esse trabalho com tanto esmero, com certeza ela tem uma grande parcela de culpa nisso, não apenas por me apoiar, mas por ser meu braço direito quando necessitei durante as análises e discussões do trabalho. Com certeza essa será uma pessoa que levarei no meu coração para sempre.

Agradeço a principalmente minha mãe, Maria de Nazaré Oliveira Macedo, que, com seus grandes esforços, foi capaz de com a ajuda de meus irmãos Rodrigo e Rafael, me criar e me formar um cidadão íntegro, possibilitando-me o futuro sonhado, através das lições de cada dia. Aprendi que nada conquistado sem esforço e suor vale realmente a pena! Aproveito a oportunidade para agradecer, com este fruto de meu trabalho, ao Sr. Izabedeu Marques dos Santos (*in memoriam*), meu avô de coração que, através de nossas longas tardes de conversa após as aulas da graduação, sempre me incentivou e deu apoio para continuar esta jornada, e nunca desistir de meus sonhos, pois se posso sonhá-los, também posso alcançá-los. Sua lembrança é uma de minhas motivações para sempre continuar, apesar dos pesares.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

—ISAAC NEWTON

Resumo

A utilização de estratégias de emagrecimento para controle da composição corporal é bastante utilizada em esportes de alto desempenho em que o controle do peso é primordial para o bom desempenho atlético. Além disso, a prevenção e o tratamento de doenças crônico-degenerativas e seus fatores de risco são recomendados sempre através de aumento do nível de atividades físicas e controle alimentar. Dentre as práticas de controle alimentar, vem se destacando o uso do jejum intermitente. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos do jejum intermitente em praticantes de atividades físicas e atletas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do treinamento de *endurance* associado à prática do Jejum Intermitente em aspectos metabólicos do desempenho físico, composição corporal e equilíbrio redox de ratos Wistar adultos. Para tanto, utilizou-se 26 ratos divididos em 4 grupos: Jejum Intermitente (JI) – N=7, Jejum Intermitente + Exercício (JI+EX) – N=7, Exercício (EX) – N=6 e Controle (CON) – N=6. Os animais foram submetidos a 6 semanas de treinamento de natação durante jejum diário de 18 horas. Ao final do período experimental os ratos do grupo JI+EX obtiveram maior desempenho no teste de carga progressiva em relação aos grupos CON e JI sem alterações no lactato do ponto de fadiga. Como adaptação ao treinamento em JI, também houve um aumento da atividade de citrato sintase no grupo JI+EX em relação aos grupos EX e CON. Também foi encontrado um aumento no acúmulo de gordura intramuscular no grupo JI+EX comparado com o grupo CON e ao grupo JI. Os animais do grupo JI+EX apresentaram menor massa magra ao compará-los com os animais CON e EX, porém, sem alterações no consumo alimentar. Ao avaliar a eficiência alimentar, os grupos JI e JI+EX tiveram menor eficiência alimentar em comparação com os grupos que não realizaram JI. Quando avaliada a composição corporal, o grupo JI apresentou um menor percentual do conteúdo de proteínas e maior de lipídeos em relação aos grupos EX e JI+EX; também foi encontrado uma maior massa relativa do Tecido Adiposo Marrom (TAM) dos animais JI e JI+EX tanto em relação aos CON quanto ao grupo EX. Nas análises relacionadas ao metabolismo hepático, foi encontrado um aumento dos colesteróis HDL no grupo JI+EX e ao avaliar parâmetros relacionados à atividade oxidante, o grupo JI apresentou maior peroxidação lipídica e maior carbonilação proteica em relação ao controle, enquanto os grupos que realizaram exercício apresentaram uma menor carbonilação proteica que os animais CON. Assim, foi observado que ao realizar exercício de *endurance* somado ao JI, os animais obtiveram um maior ganho de desempenho físico que parece ser sido a partir de adaptações metabólicas que permitiram maior utilização de energia quando necessário, como uma maior disponibilidade de colesterol HDL e maiores estoques de lipídeos no músculo esquelético. Também pôde-se perceber que o JI mostrou-se uma estratégia metabolicamente danosa, visto o grande desequilíbrio redox encontrado no fígado dos animais submetidos à estratégia. Porém, pudemos observar também o efeito benéfico encontrado na combinação dessa estratégia com o exercício de *endurance* no período de jejum.

Palavras-chave: Jejum. Exercício. Aptidão Física. Metabolismo. Exercícios Aeróbicos.

Abstract

The use of weight loss strategies and control of body composition is widely used in high performance sports where weight control is paramount for good athletic performance. In addition, the prevention and treatment of chronic diseases and their risk factors are always recommended by increasing the level of physical activity and food control. Among the food control practices, has been increasing the use of intermittent fasting. However, little is known about the effects of intermittent fasting in practicing physical activities and athletes. The objective of this study was to evaluate the effect of endurance training associated with the practice of intermittent fasting on metabolic aspects of physical performance, body composition and redox balance of adult Wistar rats. For this, we used 26 rats divided into 4 groups: Intermittent Fasting (JI) – N = 7, Intermittent Fasting + Exercise (JI + EX) – N = 7, Exercise (EX) – N = 6 and control (CON) – n = 6. The animals were subjected to six weeks of swimming training during fasting 18 hours daily. After the trial period the JI+EX group rats had higher performance in progressive load test in relation to JI and CON groups without changes in the lactate point of fatigue. As adaptation to training during JI, there was also an increase in citrate synthase activity in the JI+EX group in relation to EX and CON groups. It was also found an increase in intramuscular fat accumulation in the JI+EX group compared to the EX group and the JI group. The animals JI+EX had lower lean body mass by comparing them with the EX and CON animals but without changes in food consumption. In assessing feed efficiency, the JI and JI+EX groups had lower feed efficiency compared to the groups that not performed JI. By assessing body composition, the JI group had a lower percentage of protein content and increased lipid in relation to JI+EX groups and EX; It was also found greater relative mass of Brown Adipose Tissue (BAT) animal JI and JI+EX both in relation to CON as the EX group. In the analyzes related to hepatic metabolism, an increase in HDL cholesterol found in JI+EX group: in the parameters related to oxidative activity, the JI group had increased lipid peroxidation and protein carbonylation compared to control, while the groups that performed exercise had a lower protein carbonyls than the CON animals. Thus, it was observed that when performing endurance exercise plus JI, the animals had the highest gain of physical performance that seems to have been the result of metabolic adaptations that allowed greater use of energy when needed, such as greater availability of HDL cholesterol and lipids largest stocks in skeletal muscle. Also it could be seen that the JI proved to be a metabolically harmful strategy, given the large redox imbalance found in the liver of animals undergoing strategy. However, we also note the beneficial effects found in combining this strategy with endurance exercise in the fasting period.

Keywords: Fasting. Exercise. Physical Fitness. Metabolism. Aerobic Exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Gráfico representativo do ciclo estímulo/supercompensação após um estresse.17
2. Gráfico representativo do ciclo estímulo/supercompensação de Jejum Intermitente e Exercício 19
3. Linha do tempo da atividade diária do Jejum e do treinamento para o grupoJI+EXe o grupo JI.23
4. Interação de compartimentos corporais diferentes imersos em meio líquido de acordo com a Lei de Arquimedes. O peso subaquático da gordura (A) é menor que o de Músculo e Gordura juntos (B), que por sua vez é menor que o peso subaquático apenas do músculo (C).24
5. Massa dos animais durante o período experimental. (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo EX 33
6. Consumo relativo semanal de ração (A) e Coeficiente de Eficiência Alimentar(CEA)(B) durante período experimental. (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo EX34
7. Peroxidação Lipídica Hepática por quantificação das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (A) e carbonilação de proteínas hepáticas (B). (**) indica $p < 0,005$; (***) indica $p < 0,0001$36
8. Níveis hepáticos de tióis não proteicos. 36
9. Carga relativa de sobrecarga em percentual do peso corporal (A) e lactato sérico no ponto de exaustão no teste de esforço progressivo (B).(**) indica $p < 0,01$37
10. Atividade de Citrato Sintase no m. sóleo (A) e concentração de gordura intramuscular na porção vermelha do m. gastrocnêmio (B). (*) indica $p < 0,05$ e (**) indica $p < 0,01$ 38

LISTA DE TABELAS

Tabela

- 1 Percentual da composição total de Lipídios, Proteínas, Minerais e Água da carcaça dos animais 34
- 2 Índice de Massa Corporal (índice de massa corpórea (IMC)), Circunferência Abdominal (circunferência abdominal (CA)) e Massa dos órgãos Coração, Fígado, Pâncreas e Tecido adiposo marrom (TAM) relativizada pelo peso total dos animais. 35
- 3 Gorduras totais e colesterol total, LDL e HDL hepáticos (mg/g). 35

LISTA DE ACRÔNIMOS

JI Jejum Intermitente.	13
AMPK Proteína quinase ativada por AMP.	14
SM Síndrome Metabólica	14
TAB Tecido Adiposo Branco	15
TAM Tecido Adiposo Marrom	15
ERRO espécies reativas de oxigênio.	15
PGC1-α Coativador 1 α do receptor ativado pelo proliferador de peroxisoma.	16
NFκB fator nuclear <i>kappa</i> B	17
VO₂máx volume de oxigenação máxima.. . . .	18
JDA jejum em dias alternados	18
CEUA Comitê de Ética em Uso de Animais.	22
EX Exercício	22
COM Controle	22
JI+EX Jejum Intermitente + Exercício.	22
D densidade	24
CEA coeficiente de eficácia alimentar	25
CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.	25
CNA cumprimento nasu-anal.	25
CA circunferência abdominal.. . . .	25
IMC índice de massa corpórea	25
SH sulfidrina.	28
MDA ácido malondialdeído	30
HSL lipase sensível a hormônio	41
ATGL lipase de triglicerídeo do adipócito.	41
AMP adenosina monofosfato.	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 TREINAMENTO DE <i>ENDURANCE</i>	14
1.2 JEJUM INTERMITENTE	16
1.3 TREINAMENTO DE <i>ENDURANCE</i> E JEJUM INTERMITENTE	17
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MÉTODOS	22
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	22
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	22
4.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO	22
4.3.1 Teste de Carga Progressiva	24
4.4 EFICIÊNCIA ALIMENTAR	25
4.5 EUTANÁSIA	25
4.6 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL	25
4.6.1 Líquidos Corporais	26
4.6.2 Minerais	26
4.6.3 Lipídios	26
4.6.4 Proteínas	26
4.6.5 Gordura Intramuscular	27
4.7 ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE	28
4.8 PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO	29
4.9 ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO	30
4.9.1 Tióis não proteicos	30
4.9.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)	30
4.9.3 Proteínas carboniladas	31
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31

5	RESULTADOS	33
5.1	PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR	33
5.2	COMPOSIÇÃO CORPORAL	34
5.3	PERFIL LIPÍDICO E METABOLISMO HEPÁTICO	35
5.4	DESEMPENHO FÍSICO	37
6	DISCUSSÃO	39
6.1	PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR	39
6.2	COMPOSIÇÃO CORPORAL	40
6.3	PERFIL LIPÍDICO E METABOLISMO HEPÁTICO	41
6.4	DESEMPENHO FÍSICO	44
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

A utilização de estratégias de emagrecimento é de grande importância para melhoria da saúde, controle da massa e composição corporal, ganho de desempenho físico, além de melhora do metabolismo e eficiência bioenergética de maneira saudável. Dentro disso, como formas mais utilizadas comumente estão o treinamento de *Endurance*, caracterizado como atividade aeróbia com tempo mínimo de 30 minutos (COYLE, 1999); e a restrição calórica (ABETE et al., 2011). Ultimamente vem sendo crescente a divulgação na literatura científica o benefício da utilização do Jejum Intermitente (JI) como uma boa alternativa de alteração do padrão alimentar que resulta em benefícios metabólicos importantes para o organismo (TINSLEY; LA BOUNTY, 2015).

Atualmente a obesidade é considerada o maior desafio da saúde global; precursora de outras doenças metabólicas crônico-degenerativas como diabetes, hipertensão e doenças neurometabólicas, sendo responsável por uma média de 3,5 milhões de mortes por ano no mundo (NG et al., 2014). A prevenção e o tratamento dessas doenças endêmicas são recomendados sempre através de um aumento da prática de atividades físicas e melhoria dos hábitos alimentares (JAKICIC et al., 2001; PATTYN et al., 2013). A utilização de estratégias de emagrecimento e controle da composição corporal também é amplamente utilizada durante períodos competitivos em esportes de alto desempenho, considerando que a massa corporal pode influenciar diretamente no desempenho dos atletas, como nas modalidades de Ciclismo, Hipismo e Lutas, que são divididas em categorias de peso.

Outro conceito importante diz respeito a atletas de *endurance*, que necessitam de uma maior capacidade de energia por peso, sendo primordial uma maior eficiência energética para o sucesso atlético. Assim, deve-se manter um equilíbrio entre peso e potência aeróbia que possibilite uma maior aptidão para concluir a prova com eficiência.

Potência Aeróbica é a capacidade do organismo de utilizar vias aeróbicas para gerar energia para o trabalho. São fatores que influenciam a potência aeróbica do organismo, o volume de tecidos metabolicamente ativos aerobiamente, e a massa do indivíduo, fazendo com que tanto o aperfeiçoamento do transporte de oxigênio, quanto a captação pelo organismo, sejam fatores determinantes para uma maior potência aeróbia.

A relação desta potência aeróbia com o peso total do indivíduo reflete na capacidade de trabalho e economia de energia, pois o trabalho motor sendo

$$T = F * d$$

em que trabalho (T) é dado em Joules, e a Força (F) é a soma dos vetores do movimento e da força peso, quanto mais força necessária para o deslocamento, maior o gasto energético. Sendo assim, quanto maior a potência por massa, menor o esforço total para realizar um deslocamento (KOMI; COMMISSION et al., 1993). Deste modo, a diminuição da massa gorda, e aumento relativo da massa muscular, assim como a maior capacidade oxidativa celular, provoca um aumento da capacidade de trabalho. Portanto, ao avaliar a potencialidade da utilização do JI e a necessidade de atividade física preconizada para o bom funcionamento do organismo, deve se observar também os efeitos metabólicas das duas estratégias em conjunto. Assim, torna-se válida a avaliação dos efeitos dessa estratégia de JI aliado a um treinamento de *endurance* na capacidade de *endurance* e no metabolismo energético relacionado à performance física aeróbia, visto que são pouco elucidados até o momento.

1.1 TREINAMENTO DE *ENDURANCE*

De modo geral, uma maior capacidade de *endurance* é associada a diminuição da incidência de doenças crônico-degenerativas e a melhoria da vida funcional (SEALS et al., 1984; AMORIM; DANTAS, 2002). Os mecanismos fisiológicos relacionados ao desempenho aeróbico são principalmente associados à quantidade de mitocôndrias e da atividade das enzimas oxidativas (DAVIES; PACKER; BROOKS, 1981; INGJER, 1979). Sabe-se ainda que o treinamento de *endurance* também provoca adaptações no sistema nervoso (CHALIMONIUK et al., 2015; ZGHAL et al., 2015), mudanças da bioenergética muscular (TAMURA et al., 2014; ROSENKILDE et al., 2015), na eficiência cardiocirculatória (LEVY et al., 1998) e ganhos estruturais na morfologia celular (DAVIES; PACKER; BROOKS, 1981).

A capacidade de *endurance* é reflexo de uma maior produção e atividade de mitocôndrias, principalmente no músculo esquelético, que é estimulada pela via de sinalização da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK), com papel crucial na regulação da homeostase celular (WINDER; TAYLOR; THOMSON, 2006). NARKAR et al. (2008) observaram que ao administrar via oral agonistas de AMPK, a capacidade de *endurance* aumentava independente da realização de exercícios, demonstrando que o ganho de desempenho poderia ser aprimorado por estimulação desta via.

É bem estabelecido na literatura o uso do treinamento de *endurance* para controle da composição corporal e de doenças metabólicas. Melhorias no metabolismo de glicose, efeito cardioprotetor, melhora do perfil lipídico e concomitante prevenção da Síndrome Metabólica (SM) e seus precursores são adaptações importantes associadas a essa prática (VESTERINEN et al., 2013; LOUCHE et al., 2013; WANG et al., 2014).

A ativação das vias da AMPK e consequente maior biogênese e atividade mitocondrial, torna o tecido metabolicamente ativo, mostrando ser o efeito celular mais significativo na utilização do exercício como forma de prevenção e tratamento da obesidade e doenças metabólicas, promovendo o emagrecimento através de uma maior taxa metabólica basal e atividade metabólica dos tecidos (O'NEILL; HOLLOWAY; STEINBERG, 2013; LI; LI, 2014).

Ainda no contexto das adaptações metabólicas, o exercício de *endurance* também promove no músculo a secreção de uma miocina denominada Irisina, importante reguladora do metabolismo de lipídios, que ao reagir com o Tecido Adiposo Branco (TAB) estimula a biogênese mitocondrial e o consequente gasto energético, em um processo denominado Escurecimento do TAB, em que as características do mesmo aproximam-se das do Tecido Adiposo Marrom (TAM) (HOFMANN; ELBELT; STENGEL, 2014).

Esse escurecimento do TAB, além de aumentar o gasto energético e a termogênese, tem efeitos benéficos na sensibilidade celular à insulina. GUNAWARDANA; PISTON (2012) ao realizarem transplante de tecido adiposo marrom em ratos induzidos ao diabetes tipo I, encontraram tolerância à glicose normalizada, euglicemia, redução na inflamação do tecido adiposo, e reversão de parâmetros clínicos marcadores clássicos de diabetes, como poliúria, polidipsia e polifagia, sendo esses efeitos independentes da quantidade de insulina secretada no organismo, o que reforça a importância do exercício de *endurance* na prevenção e tratamento de Diabetes (LIU et al., 2013; STANFORD et al., 2013).

Estudando a relação do exercício com o metabolismo do tecido adiposo, CZARKOWSKAPACZEK et al. (2014) demonstraram que a secreção de irisina pelo músculo, e o consequente escurecimento do TAB modulada pelo exercício de *endurance* não ocorre com estímulo agudo, sugerindo que os benefícios desse tipo de exercício estão no efeito crônico e intermitente do mesmo, estimulando adaptação do organismo ao estresse.

Como adaptações ao estresse do exercício, o balanço redox, bastante afetado de maneira aguda com o exercício, no exercício crônico torna-se mais resistente ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ERO) por um aperfeiçoamento da barreira antioxidante (SVENSSON et al., 2002). É bem estabelecido na literatura que a atividade das enzimas antioxidantes do

organismo, principalmente superóxido desmutase, glutathiona peroxidase e catalase, tem função primordial nesta adaptação (JI, 1993), sendo auxiliados pelos antioxidantes não-enzimáticos, como GSH, ácido úrico e bilirubina, aumentando assim a capacidade de ceder elétrons às ERO e diminuir o estresse oxidativo na célula (JI, 2002; POWERS; JACKSON, 2008; GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012). Estas modificações enzimáticas e não-enzimáticas são caracterizadas como resposta adaptativa ao estresse intermitente, a fim de manter a homeostase redox na célula.

1.2 JEJUM INTERMITENTE

O JI é uma estratégia de diminuição da frequência alimentar que começou a ser estudada em Muçulmanos, durante o período do Ramadan, caracterizado pela permanência em jejum durante o dia (e alimentando-se apenas à noite) ao longo de um mês. Ao final do período, os mesmos apresentavam modificações do perfil metabólico como melhoras no perfil lipídico, diminuição da frequência cardíaca e diminuição da massa gorda (GUMAA et al., 1978; HALLAK; NOMANI, 1988; SALEH et al., 2005), levando à hipótese de que permanecer por períodos intermitentes em jejum pode trazer benefícios à saúde.

Desta forma, os estudos de JI consistem em metodologias de avaliação do efeito de períodos alternados de privação alimentar e realimentação ad libitum, de geralmente doze a 24 horas. A maioria dos estudos relacionados à JI apresenta aperfeiçoamento geral no metabolismo do indivíduo, incluindo melhora da sensibilidade à insulina (HALBERG et al., 2005; CARLSON et al., 2007; CARLSON; SNEAD; CAMPBELL, 1994), aumento do tempo de sobrevivência (GOODRICK et al., 1990), efeito cardioprotetor (VARADY et al., 2009), e maior utilização de lipídios como combustível metabólico (VARADY et al., 2007; HEILBRONN et al., 2005).

Esta estratégia é responsável por uma série de reações que promovem uma situação favorável para o ganho de desempenho aeróbio (CANTÓ et al., 2010). Mais intimamente, há um aumento na expressão da proteína sirt1, uma classe de proteínas que influencia em uma variedade de processos celulares como diminuição da apoptose celular, resistência a stress metabólico e maior eficiência energética em situações de privação energética e estresse através da ativação da via de síntese mitocondrial (TIKOO et al., 2007; CANTÓ et al., 2010).

Uma reação importante à uma maior expressão de sirt1, é a maior ativação da proteína AMPK, estimulando a oxidação de ácidos graxos no músculo, maior captação de glicose e modulação da secreção de insulina nas células beta-pancreáticas (WINDER; HARDIE, 1999).

Uma das respostas celulares à uma maior ativação de AMPK é o aumento da expressão também da proteína Coativador 1 α do receptor ativado pelo ploriferador de peroxisoma (PGC1- α), um coativador transcricional que regula os genes envolvidos no metabolismo energético. O PGC1- α provoca uma maior resistência muscular ao lactato e uma maior eficiência do ciclo de Cori através do aumento da produção de mitocôndrias no tecido estimulado (SUMMERMATTER et al., 2013).

Além da ativação da via de síntese mitocondrial, a proteína Sirt1 também tem um importante papel na atividade antioxidante do organismo por participar diretamente da ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B), um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição que está envolvido na resposta celular a estímulos como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos. A transcrição de genes dependentes de NF κ B influencia os níveis de ERO na célula, podendo assim o JI gerar um efeito antioxidante semelhante ao já conhecido resultado do treinamento de *endurance* (BROOKS; GU, 2009; MORGAN; LIU, 2011).

Sistemicamente, as reações moleculares do JI nos tecidos levam à uma maior preservação e eficiência celular, com diminuição de fatores apoptóticos, menor stress oxidativo e aperfeiçoamento da captação de energia pelas mitocôndrias (CASTELLO et al., 2010).

Entendido como uma intervenção estressora do metabolismo (WASSELIN et al., 2014; NAKAMURA; WALKER; IKUTA, 2015), assim como uma sessão de exercícios, sugere-se que o jejum, de maneira intermitente, possa ter efeitos metabólicos adaptativos semelhantes ao de um treinamento físico (PRAAG et al., 2014), podendo-se aplicar o modelo de síndrome geral da adaptação à estratégia (Figura 1), abrindo a possibilidade de modulação do estímulo e manipulação das variáveis metabólicas. Isto sugere que podem existir possíveis efeitos resultantes da sinergia entre o jejum intermitente e o exercício (TINSLEY; LA BOUNTY, 2015).

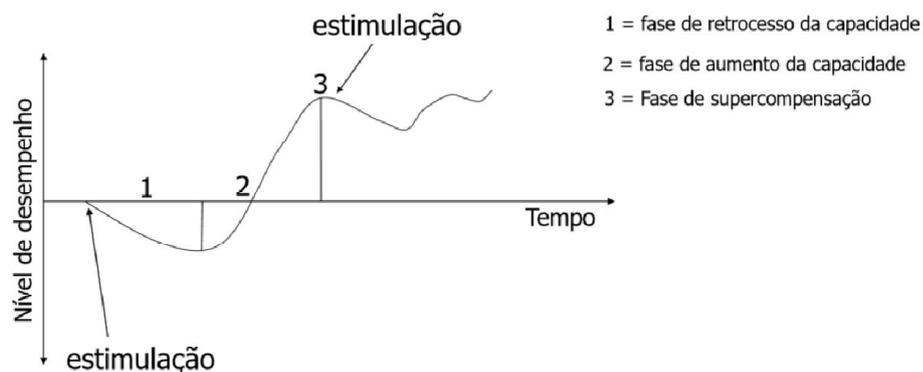


Figura1: Gráfico representativo do ciclo estímulo/supercompensação após um estresse.

1.3 TREINAMENTO DE *ENDURANCE* E JEJUM INTERMITENTE

É interessante ressaltar que RYAN et al. (2013) demonstraram que o treinamento de *endurance* em combinação com restrição calórica em idosos obesos, melhoram a resistência à insulina e diminuem o percentual de massa gorda, mantendo a massa magra. O exercício físico é provavelmente o maior ativador fisiológico da proteína AMPK e da via de síntese mitocondrial e homeostase glicêmica. Uma co-estimulação das intervenções do exercício de *endurance* com o JI pode ser um importante mecanismo para ganhos de desempenho através do aumento da eficiência do metabolismo aeróbico (HARDIE, 2007; KAHN et al., 2005).

Apesar da ligação dos efeitos metabólicos do JI a um possível favorecimento no ganho de desempenho e uma melhora da composição corporal, poucos estudos procuraram entender os efeitos da associação de JI e Exercício Físico. AZIZ et al. (2010) ao submeterem 30 homens a 30 minutos de exercício de *endurance* (60% do consumo máximo de oxigênio), seguidos de 30 minutos contrarrelógio, antes e depois do Ramadan, perceberam que houve uma diminuição na distância percorrida durante o contrarrelógio, assim como uma diminuição da velocidade média durante os últimos minutos do teste. Isto pode sugerir a ocorrência de uma fadiga mais rápida e redução do volume de oxigenação máxima (VO₂máx) e/ou limiar anaeróbio, o que vai contra as adaptações fisiológicas normalmente encontradas como consequência do aumento das sirtuínas e suas consequências, que deveriam manter ou melhorar a resistência aeróbica e aumentar o limiar de lactato (SUMMERMATTER et al., 2013; ROMANINO et al., 2011).

Porém, KLEMPPEL et al. (2010) submeteram 16 indivíduos obesos (12 mulheres / 4 homens) a um estudo de 10 semanas, composto por 3 fases: 1) fase de controle de 2 semanas, 2) fase de alimentação com jejum em dias alternados (JDA) com controle da alimentação do dia alimentado por 4 semanas, e 3) de 4 semanas de JDA e alimentação *ad libitum* no dia alimentado. Durante o período experimental o nível de atividade física dos indivíduos permaneceu o mesmo independente da fase do estudo, sugerindo que o jejum não influenciou na disposição para atividade física.

Ao observar a relação do JI com treinamento resistido, TRABELSI e tal. (2013) avaliaram o comportamento da composição corporal de fisiculturistas muçulmanos (N=10) submetidos à um treinamento de força alimentados (a noite) ou em jejum (de dia) durante o Ramadan, e os resultados demonstraram que não houve alteração na composição corporal nem no desempenho dos mesmos de acordo com a opção do treino em jejum ou alimentado e DANNECKER et al. (2013) não encontraram diferenças nos indicadores de dano muscular

após uma sessão de exercícios resistidos, sugerindo que o jejum também não influencia na recuperação muscular pós-treino dos indivíduos.

BHUTANI et al. (2013) ao randomizarem 64 indivíduos obesos em 4 grupos durante 12 semanas: 1) combinação (JDA mais exercício de *endurance*), 2) JDA, 3) o exercício, ou 4) controle, perceberam que a massa gorda e a circunferência do quadril dos indivíduos dos grupos 1 2 e 3 diminuiu, e que no grupo 1 não houve alterações na composição de massa magra, o que significa que houve um aumento percentual da massa magra como efeito do JDA com exercício de *endurance*.

Em animais, o único estudo encontrado, realizado por SAKAMOTO; GRUNEWALD (1987), demonstrou que, em ratos wistar, a combinação do JI de 24 horas com 75 minutos de corrida à 24 m/min, 5 dias por semana, durante 8 semanas, resultou em 29% mais peso, 29% mais massa magra e 18% menos massa gorda comparado a apenas o JI.

Observando que os poucos estudos existentes na literatura que buscam associar JI com exercício apresentam resultados controversos sobre o benefício da associação destas duas estratégias, nossa hipótese é que os resultados negativos ligados ao JI e treinamento estão associados a avaliações agudas, e que o caráter intermitente de ambos, de maneira crônica (Figura 2), provocará uma melhora no desempenho físico de ratos Wistar, assim como no metabolismo mitocondrial e composição corporal.

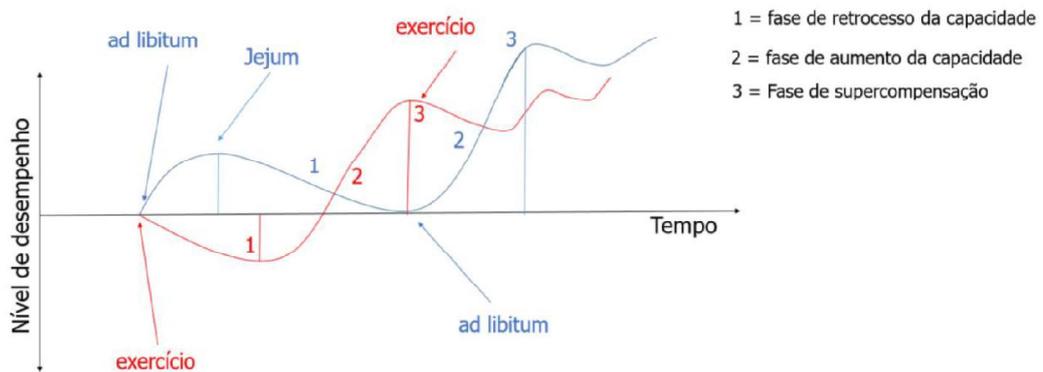


Figura2: Gráfico representativo do ciclo estímulo/supercompensação de Jejum Intermitente e Exercício.

2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo tem como justificativa a possível relação do Jejum Intermitente associado à prática de treinamento aeróbio com a melhoria da composição corporal e aumento da síntese mitocondrial, podendo provocar um aumento do desempenho aeróbio. Faz-se necessário também entender os mecanismos fisiológicos envolvidos no treinamento de *endurance* em Jejum, escassos na literatura. Há também possibilidade de aplicação prática dos resultados em pesquisas com humanos e possível aplicação futura tanto em esportes de rendimento quanto nos sistemas de saúde, proporcionando benefícios diretos à saúde pública, combatendo as doenças hipocinéticas crônico-degenerativas e mais intensamente a síndrome metabólica. A relevância desta aplicação prática se torna significativa no contexto da saúde pública também por se tratar de uma opção de tratamento não farmacológica e de fácil aplicação para estas pandemias relacionadas ao metabolismo energético.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar parâmetros relacionados ao desempenho aeróbio e composição corporal de Ratos Wistar associado ou não à estratégia de Jejum Intermitente e Treinamento de *Endurance*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de treinamento de natação que diminua o viés da composição corporal na determinação da intensidade do treinamento.
- Descrever alterações na composição corporal e possíveis alterações na distribuição da gordura corporal após o período experimental.
- Observar a atividade mitocondrial e gordura intramuscular nos músculos sóleo e gastrocnêmio.
- Analisar parâmetros relacionados ao equilíbrio redox e metabolismo de gordura no fígado.

4. MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos metodológicos realizados com os animais foram submetidos previamente à apreciação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, e aprovado sob o protocolo N° 337/2015 no dia 28/01/2015 (Anexo A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizados no estudo 28 ratos adultos da linhagem Wistar (ANILAB, Paulínia-SP), com 120 dias de idade, ambientados no Biotério de Experimentação do Laboratório de Nutrição Experimental - UFTM, mantidos sob regime circadiano de 12 horas de claro/escuro com água *ad libitum* e alimentação controlada (Jejum de 18 horas/dia) de acordo com o grupo (Figura 3).

Os animais foram divididos em 4 grupos em que os grupos Exercício (EX) e Controle (CON) receberam alimentação *ad libitum* e os grupos Jejum Intermitente + Exercício (JI+EX) e Jejum Intermitente (JI) foram submetidos à privação alimentar de 18 horas diárias e 6 horas de alimentação *ad libitum*.

4.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Antes do início do período de treinamento, foi realizado um período de adaptação do animal ao meio líquido, onde o mesmo permaneceu em contato com água rasa 40 minutos por dia, durante duas semanas, no mesmo período do dia em que foi realizado o treinamento. Isso visou reduzir o estresse dos animais e adaptá-los ao protocolo de treinamento físico, realizado na água à temperatura de 31°C regulada por aquecedor com termostato automático Hopar SA-333 (ZhongShan, China).

Após a pesagem hidrostática, se deu início o treinamento de natação em um tanque com água em profundidade a 100cm e sobrecarga de peso equivalente a 3% do peso do animal, considerando a retificação do mesmo pelo empuxo. O treinamento consistiu em 40 minutos

por dia, em cinco sessões semanais (segunda à sexta) e teve duração de 6 semanas. As avaliações para ajuste semanal de carga foram realizadas nos dias de repouso do treinamento (sábado e domingo).

Os tempos de jejum e exercício de cada sessão de treinamento, assim como o período em que os animais tiveram disponibilidade de alimento foram organizados como demonstrado na figura 3.

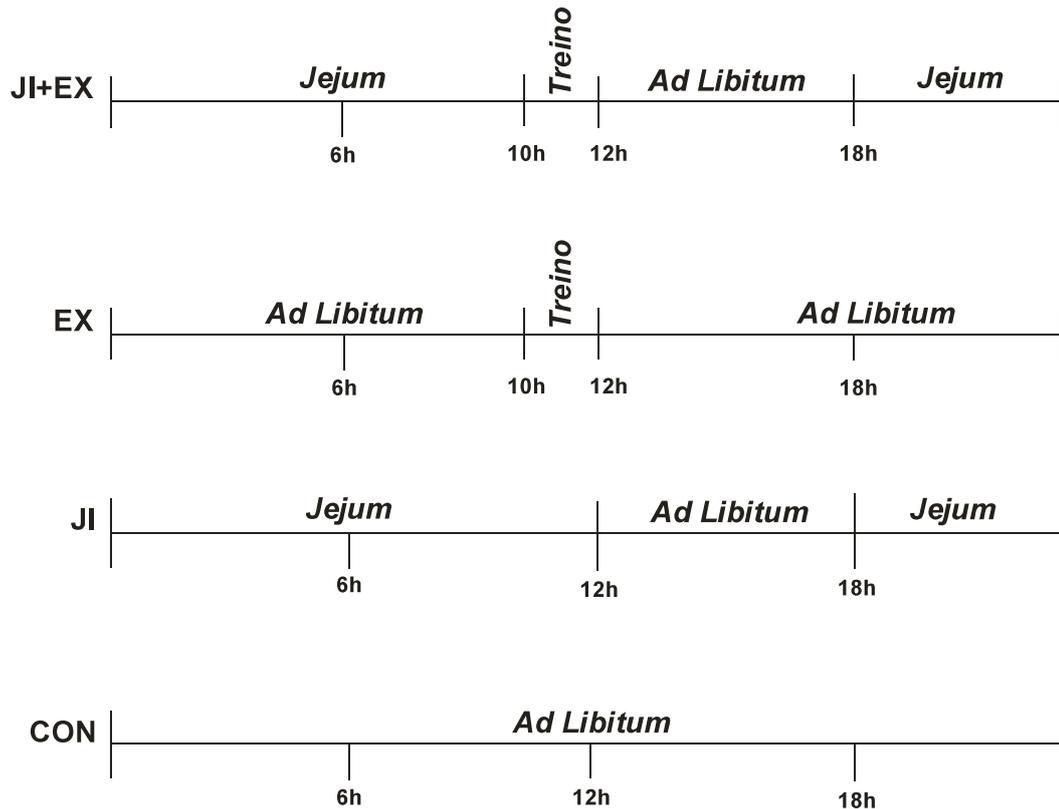


Figura3: Linha do tempo da atividade diária do Jejum e do treinamento para o grupo JI+EX e o grupo JI.

O grupo EX realizou o treinamento de natação com os mesmos parâmetros metodológicos e sequência circadiana do grupo JI+EX; o grupo CON não realizou exercícios e teve oferta ad libitum de alimentação durante todo o dia.

Para maior comodidade no manejo e treinamento dos animais, a fim de trabalhar com o mínimo de estresse possível aos mesmos, os animais foram submetidos à ciclos de claro/escuro invertido, consistindo de escuro das 6h às 18h, e claro das 18h às 6h. O treinamento foi realizado no período escuro do ciclo dos animais e em sala com iluminação na cor vermelha (625-740 nm), diminuindo assim o estresse dos animais, posto que os mesmos possuem hábitos noturnos e não enxergam a referida cor.

A densidade (D) específica do Músculo é de 1,06 g/cm³ e da Gordura é de 0,9196 g/cm³ (URBANCIK et al., 2001; FARVID et al., 2005), assim, como é demonstrado na Figura 4,

quantidades diferentes dos dois compostos ao imergirem em água destilada ($D = 0,994 \text{ g/cm}^3$) produzem pesos subaquáticos diferentes. A escolha da carga foi designada a partir do peso ajustado pelo peso subaquático do animal ($\text{Peso Ajustado} = \text{Peso} - \text{peso subaquático}$), que é determinado como o peso do mesmo, menos o peso do volume de água deslocado quando o animal é imerso (Lei de Arquimedes).

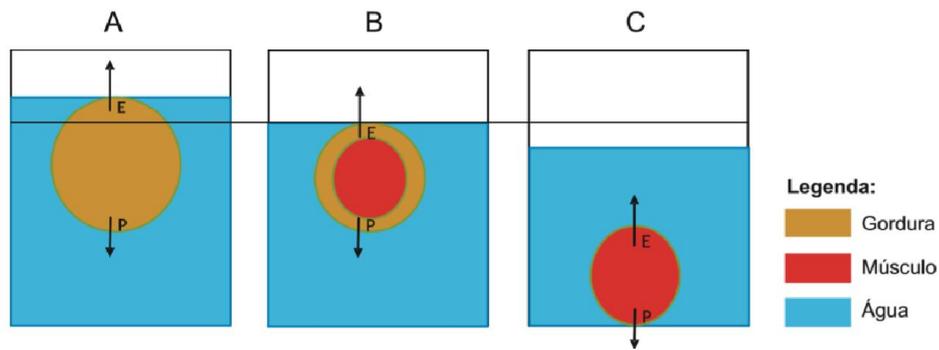


Figura4: Interação de compartimentos corporais diferentes imersos em meio líquido de acordo com a Lei de Arquimedes. O peso subaquático da gordura (A) é menor que o de Músculo e Gordura juntos (B), que por sua vez é menor que o peso subaquático apenas do músculo (C).

Assim, o animal foi mergulhado em uma proveta, suspenso por um fio inflexível, e foi calculado em balança semi-analítica o peso do animal no momento da imersão na água. O peso do animal na água foi o peso subtraído no rato como efeito do empuxo. Esse procedimento é proposto a fim de normalizar a sobrecarga de treinamento de animais de diferentes composições corporais treinando em ambiente aquático, visto que composições corporais diferentes geram volumes diferentes e reações diferentes do empuxo em meio líquido.

4.3.1 Teste de Carga Progressiva

Os animais foram submetidos após o treinamento a um teste de carga progressiva, adaptado do protocolo de lactato mínimo específico para o teste de natação proposto por ARAUJO et al. (2007); BECK; ARAUJO; GOBATTO (2012); GOBATTO et al. (2001). Foi considerado o ponto de fadiga quando o animal passa entre 8 e 10 segundos de hipóxia, não conseguindo subir a superfície para respirar. Após detectada a fadiga, o animal era retirado da água e imediatamente retirado 25ul de sangue da cauda para medição do lactato em aparelho de medição eletrolítica Yelowspring YSI 2300 STAT Plus (Yelowspring, Estados Unidos).

4.4 EFICIÊNCIA ALIMENTAR

A eficiência alimentar foi mensurada através do coeficiente de eficácia alimentar (CEA). Dos 60 aos 120 dias de vida (período experimental) os animais foram pesados e quantificado o CEA de acordo com a ingestão alimentar de cada grupo. O coeficiente de eficácia alimentar é a relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido:

$$CEA = \frac{PF - PI}{TA}$$

Em que PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento; PI: peso corporal do animal no início do experimento em gramas, TA: quantidade total de alimento ingerido no período em gramas (NERY et al., 2011).

4.5 EUTANÁSIA

Os animais foram sedados com Quetamina (60mg/kg) e Xilazina (8mg/kg), e após confirmada a sedação por ausência de respostas à estímulos pressóricos na cauda, foi realizada a eutanásia a partir de uma exsanguinação por punção cardíaca, de acordo com a Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013, que baixa as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as recomendações da Lei nº 11.794, que Regulamenta o inciso VII do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

4.6 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

A avaliação murinométrica dos animais foi realizada a partir do peso e de medidas do comprimento nasu-anal (CNA) e circunferência abdominal (CA) em que o protocolo das aferições seguiu o proposto por GUERRA; PETERS (1995). A partir do peso e do CNA foi utilizada a fórmula para o cálculo do índice de massa corpórea (IMC) baseado no proposto por (NOVELLI et al., 2007) e expresso em cm³. A Composição Corporal foi realizada através de avaliação da composição química da carcaça, a qual avaliou-se a quantidade absoluta e o percentual de proteína, líquidos totais, minerais e lipídios presente na carcaça. A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, com exceção da amostra de sangue retirada para análise (aproximadamente 6 mL), o fígado, o pâncreas, a gordura subescapular e os músculos gastrocnêmio e sóleo, que foram dissecados para análises posteriores.

4.6.1 Líquidos Corporais

A carcaça dos animais foi colocada em estufa aquecida a 105°C durante 48 horas a fim de secar todo o líquido dos mesmos. Após, foi calculado o líquido corporal total subtraindo-se o peso final do peso antes do procedimento. Após o procedimento toda a carcaça (com exceção da cabeça) foi triturada até que estivesse em total homogeneização utilizando um processador comercial Phillips (Amsterdan, Holanda), e retiradas alíquotas para as análises posteriores em triplicata.

4.6.2 Minerais

Após homogeneização, a amostra foi encaminhada em alíquotas de 500mg em triplicata à incineração em mufla à 550°C, com aquecimento gradativo. A amostra ficou no forno até que seu conteúdo se apresentou branco ou cinza claro, e demonstrado peso constante. Todo o conteúdo orgânico da amostra foi incinerado, sobrando apenas o conteúdo mineral.

4.6.3 Lipídios

Foi separado, em triplicata, 0,5g da amostra homogeneizada, envolvida por papel filtro e colocada dentro de cartuchos de Soxhlet. Por meio da técnica de extração, com éter de petróleo como solvente, foi removido todo o lipídio da amostra, destilando o éter e removendo a gordura para um balão, utilizando-se do aparelho de Soxhlet. Depois de 24 horas, o solvente foi eliminado por evaporação e o balão de Soxhlet pesado. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e do balão com lipídios forneceu o valor de gordura presente na amostra. O percentual de gordura corporal foi calculado relacionando a quantidade de gordura na amostra pelo peso corporal total.

4.6.4 Proteínas

A proteína total foi analisada em triplicata, com alíquotas de 500 mg, por meio de uma adaptação do método de Kjeldahl (KJELDAHL, 1883) para pequenas amostras (micro-kjeldahl), este método fundamenta-se na destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, que decompõe a substância orgânica por oxidação para libertar o nitrogênio reduzido como sulfato de amônio. Nesta etapa, o sulfato de potássio e sulfato de cobre em

proporção 1:10 (v/v) é adicionado para catalisar a reação e aumentar o ponto de fervura do meio (de 337° C para 373° C). A decomposição química da amostra é completa quando o meio inicialmente de cor muito escura torna-se límpido e incolor.

A solução é então destilada com uma pequena quantidade de hidróxido de sódio, que converte o sal de amônio em amoníaco. A quantidade de amoníaco presente, e assim a quantidade de nitrogênio presente na amostra, é determinada por titulação de retorno. A extremidade do condensador é mergulhada em uma solução de ácido bórico. A amônia reage com o ácido e o restante do ácido é então titulado com uma solução de carbonato de sódio por meio de um indicador de pH de vermelho de metila mais azul de metileno.

O percentual de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator arbitrário 6,25, para obtenção do percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio se aproxima de 16% do conteúdo proteico total.

4.6.5 Gordura Intramuscular

Para determinação e quantificação de gordura total muscular, foi utilizado o método proposto por BLIGH; DYER (1959). Para esse método foram utilizados 0,5g de tecido muscular da porção vermelha do gastrocnêmio, do qual foram homogeneizados com 0,8 mL de água destilada, em tubos de 10 mL. Em seguida foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1 mL de H₂O.

Uma nova agitação foi realizada por aproximadamente 2 minutos, e então os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 2 minutos para separação das camadas de clorofórmio (inferior) e aquosa (superior).

Uma alíquota de aproximadamente 1,3 mL do clorofórmio foi retirada e colocando em um tubo de ensaio contendo 1 g de sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água. Deste sobrenadante límpido, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um béquer previamente pesado, o qual foi levado para uma estufa com circulação forçada de ar a 75°C. Após evaporar todo o clorofórmio, os béqueres foram novamente pesados.

O cálculo foi realizado pela diferença das pesagens do béquer dividido pela massa inicial de tecido utilizado.

4.7 ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE

A citratossintase é uma enzima transferase, e controla o primeiro passo do ciclo de Krebs, também conhecido como "ciclo do ácido cítrico". Normalmente a análise de sua atividade é utilizada para avaliar parâmetros relacionados ao metabolismo oxidativo da mitocôndria. Está localizada no interior das células, mais especificamente na matriz mitocondrial, mas é codificada pelo DNA nuclear ao invés do mitocondrial. É sintetizada utilizando-se dos ribossomos do citoplasma, e então transportada para a matriz mitocondrial. É comumente utilizada como marcador quantitativo de enzima pela presença intacta da mitocôndria. A enzima catalisa a reação de condensação de um resíduo de acetato contendo 2 carbonos de uma acetil coenzima A com uma molécula de oxaloacetato contendo quatro carbonos para formar um citrato de seis carbonos. O oxaloacetato será regenerado após completada uma série do ciclo de Krebs.

A reação realizada pela enzima citratossintase é:



O método mede o radical SH com o uso de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) Esta reação pode ser facilmente seguida a 412 nm, pois o ionmercaptano/sulfidril (SH) tem uma forte absorção ($\epsilon = 13,600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); e nenhum dos materiais de partida absorvem neste comprimento de onda. A gama de pH, que podem ser estudadas está limitada a 7,4-9,0. Quando qualquer um dos compostos, acetil-CoA ou oxaloacetato, é usado em quantidades limitantes neste ensaio, ele pode ser utilizado como um ensaio rápido e sensível para observar a reação do composto limitado.

Assim, o método de ensaio da atividade de citratossintase foi realizado a partir do proposto por SRERE (1969). Os tecidos foram homogenizados (1:10, w/v) em tampão Tris-HCl, pH8,1. Os homogenatos foram centrifugados em centrifuga refrigerada a $800 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante mantido em nitrogênio líquido até sua utilização para determinar a atividade enzimática.

O período máximo entre a preparação do homogenato e a análise enzimática foi sempre inferior a 5 dias. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), que é baseado na complexação do cobre em meio alcalino formando uma cuproproteína de cor azul, lido espectrofotometricamente a 750nm. Os íons cobre, em meio alcalino, reagem com as ligações peptídicas das proteínas, formando um complexo de cor púrpura proporcional à concentração de proteínas presentes na amostra.

A mistura para a reação de citratossintase conteve 1mM de 5,5'-ditiobis-(2 ácido nitrobenzóico), 10 mM de AcetilCoA, e 0,05 mL de solução de enzima ajustada por diluição para conter entre 0,1 e 0,4 unidade de enzima por mililitro. O ensaio foi iniciado com oxaloacetato 10 mM e monitorado com 412nm por 6 minutos a 25°C. Foi avaliada a quantidade de sulfidrila (SH) liberada na reação utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{412} = 13,600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa em $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ de SH. Os resultados foram relativizados pela concentração de proteínas e a atividade enzimática determinada pela área sobre a curva de acordo com o método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990).

4.8 PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO

Amostras de 0,2 g do fígado dos animais foram retiradas por dissecação e homogeneizadas em turrax com 2ml de água destilada em tubos de ensaio. A amostra foi submetida ao mesmo método de BLIGH; DYER (1959) descrito acima. Após a pesagem dos tubos de ensaio e quantificação de gorduras totais na amostra, a mesma foi ressuspensa em 1ml de Álcool Iso-propílico.

Com a amostra ressuspensa foram dosados, colesterol total e HDL-colesterol hepático por método enzimático colorimétrico (Labtest Diagnostica) com equipamento semi-automático (Hitachi, Tóquio, Japão).

Para análise de colesterol total os ésteres de colesterol são hidrolizados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase à colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina, que tem absorvidade máxima e estável em 500nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol presente na amostra.

No teste adiciona-se 100 μl da amostra à 1ml do reagente de trabalho contendo tampão 50mmol/L, Ph 7,0; fenol 24mmol/L; colato de sódio 500 $\mu\text{mol/L}$; azida sódica 15 mmol/L; 4 aminoantipirina 500 $\mu\text{mol/L}$; colesterol esterase 250 U/L, colesterol oxidase 250 U/L e peroxidase 1000U/L. Após a mistura, a amostra é encubada em banho-maria à 37°C durante 10 minutos e após, medidos em espectrofotômetro.

O HDL-colesterol foi determinado após mistura da amostra 1ml de reagente precipitante contendo ácido fosfogústico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L, que precipitam seletiva e quantitativamente as VLDL e LDL. Após a mistura a amostra foi agitada

vigorosamente por 30 segundos e centrifugada por 15 minutos a 3.500rpm para obter um sobrenadante límpido. O sobrenadante foi utilizado no mesmo ensaio de análise de colesterol total.

4.9 ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

Os tecidos do fígado foram homogeneizados em tampão Tris-HCl Ph 8.1 e centrifugados em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C e velocidade de 2000rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e utilizado para análise de Tióis não proteicos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteínas carboniladas.

4.9.1 Tióis não proteicos

Os tióis não proteicos são principalmente representados pela γ -glutamilcistienilglicina – Glutathione, um tripeptídeo antioxidante hidrossolúvel constituído por ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo que o grupo tiol da cisteína o responsável por suas propriedades antioxidantes. Na sua forma reduzida (GSH), a glutathione tem papel crucial na metabolização de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) como cofator da enzima glutathione peroxidase. É um antioxidante de extrema importância na proteção das estruturas do núcleo e da mitocôndria contra ação das espécies reativas de oxigênio.

A quantificação dos tióis não proteicos hepático foram realizadas por método colorimétrico, que consiste na reação do grupo sulfidril com 5,5 - ditiobis (2-ácidonitrobenzóico) (DTNB) com posterior leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm. A concentração foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar $\epsilon = 13.100M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.9.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

A peroxidação lipídica é uma reação entre as espécies reativas de oxigênio e ácidos graxos, geralmente compostos da bicamada lipídica da parede celular após peroxidação do ácido graxo, o mesmo é clivado no carbono beta formando compostos aldeídos reativos, principalmente o ácido malondialdeído (MDA). Deste modo, a peroxidação lipídica foi medida pela determinação das SRATB, subprodutos da reação de peroxidação, segundo

BUEGE; AUST (1978). Os reagentes utilizados na análise de SRATB foram: solução 15% p/v de ácido tricloroacético, 0,375% p/v de ácido tiobarbitúrico em 0,25 N de ácido clorídrico.

Para a análise no músculo sóleo foi utilizada uma massa de aproximadamente 200 mg a qual foi homogeneizada em ultraturrax com 500 μ L de KCl 1,15%. Foi adicionado a este homogenato 1 mL do reagente TCA-TBA-HCl. Para a análise no fígado foi utilizada uma massa de aproximadamente 400 mg a qual foi homogeneizada em ultraturrax com 8mL de EDTA a 0,02 M. Uma alíquota de 500 μ L deste homogenato foi retirada e adicionado 1mL do reagente TCA-TBA-HCl com posterior agitação no vórtex. As soluções então foram aquecidas por 15 minutos em água fervente (100°C). Após esfriar, as soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm, sendo recolhido o sobrenadante para posterior leitura. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm contra um branco. A concentração de SRATB da amostra foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 156.000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.9.3 Proteínas carboniladas

A carbonilação de proteínas, é o surgimento de grupos carbonila – constituídos de um átomo de carbono e um de oxigênio, ligados por ligação dupla – em proteínas, geralmente após oxidação por radicais livres de oxigênio, aldeídos ou cetonas. O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo. A partir disto, os danos oxidativos em proteínas foram determinados no fígado e no músculo sóleo e mensurados pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente $\varepsilon = 22.000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (MEKRUNGRUANGWONG et al., 2012).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a aplicação do teste de normalidade dos dados (*Kolgomorov-Smirnov*) os dados foram dados como paramétricos, e assim, utilizada a análise de variância de duas vias (*ANOVA two-way*) com pós teste de Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Um nível de significância de 0,05 foi considerado e o software GraphPad Prism 5.0 para Windows foi utilizado para as análises.

5. RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

Durante o período experimental foi acompanhado o ganho de peso dos animais (Figura 5). Pôde ser notado que o peso dos grupos JI e JI+EX decresceu em comparação com o CON e EX chegando a ter uma diferença estatística durante a última semana de treinamento.

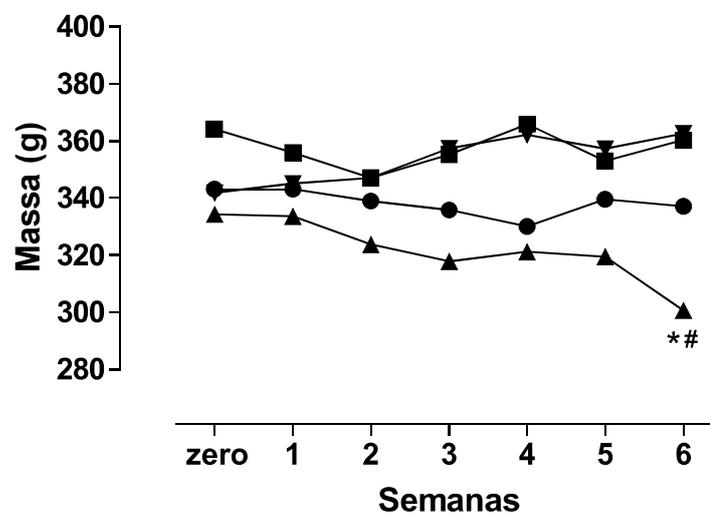


Figura5: Massa dos animais durante o período experimental. (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo EX.

Ao observarmos o padrão de consumo alimentar na figura 6, percebemos que o consumo relativo semanal (A) dos animais não se altera durante o período experimental. Porém, ao observar o coeficiente de eficiência alimentar (B) nota-se que, nas duas primeiras semanas do período experimental, a intervenção não parece ter alterado o balanço energético dos animais, na terceira semana os grupos JI e JI+EX começaram a demonstrar um comportamento alimentar diferente dos com alimentação ad libitum e parecem ter tido um efeito rebote na quarta semana, com o aumento da eficiência alimentar, mas refletindo pouco no peso, e na sexta semana uma queda abrupta na eficiência alimentar ao final do período experimental.

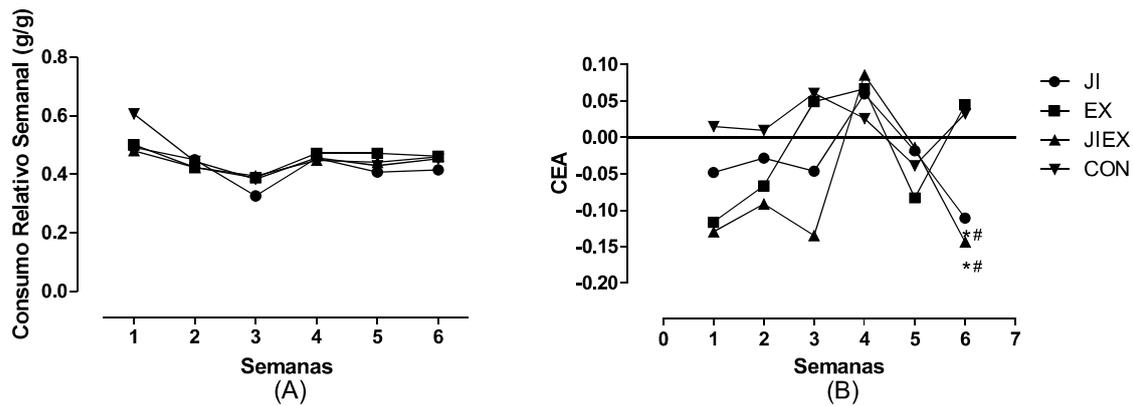


Figura6: Consumo relativo semanal de ração (A) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) (B) durante período experimental. (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo EX.

5.2 COMPOSIÇÃO CORPORAL

Como demonstra a tabela 1, o período diário de jejum não provocou alterações no conteúdo proteico ao passo que foi observado um concomitante aumento do percentual de gordura dos animais do grupo JI. Adicionalmente, a inclusão do exercício à rotina no grupo JI+EX resultou em um maior conteúdo proteico e menor percentual de gordura em relação ao grupo JI. Os grupos que realizaram exercício obtiveram menor percentual de gordura que os animais do grupo JI. Em termos percentuais os grupos EX e JI+EX não tiveram diferenças na composição corporal total.

Tabela1: Percentual da composição total de Lipídios, Proteínas, Minerais e Água da carcaça dos animais.

	CON	EX	JI	JI+EX
Lipídios	7,36±1,20	5,37±2,65*	9,15±2,22	5,72±2,30*
Proteínas	19,86±2,64	21,35±1,22*	18,41±1,79	22,88±2,39*#
Minerais	3,59±0,70	3,90±0,24	3,45±0,49	4,30±0,81
Água	67,56±3,78	67,87±2,06	66,91±0,62	64,88±2,59

(*) indica $p < 0,05$ para o grupo JI; (#) indica $p < 0,05$ para o grupo CON

A gordura escapular, composta de TAM, obteve comportamentos distintos entre os grupos, como mostra a Tabela 2. Os grupos JI e JI+EX tiveram um aumento significativo da massa de gordura marrom em comparação com o grupo EX.

Contrariamente ao TAM, observou-se que os outros tecidos não tiveram o mesmo comportamento, o que indica que os mesmos desenvolveram-se proporcionalmente ao

organismo. As alterações no TAM tiveram comportamento oposto ao IMC, que indica que sua hipertrofia pode estar relacionada ao emagrecimento dos animais. Outro dado importante de observar é que, apesar da ausência de significância estatística, podemos observar que a média CA também diminuiu nos animais submetidos a JI.

Tabela2: Índice de Massa Corporal (IMC), Circunferência Abdominal (CA) e Massa dos órgãos Coração, Fígado, Pâncreas e Tecido adiposo marrom (TAM) relativizada pelo peso total dos animais.

	CON	EX	JI	JI+EX
IMC (g/cm ³)	0,71±0,04	0,65±0,05	0,6±0,035*	0,6±0,10*
CA (cm)	19,18±0,9	18,86±1,52	17,88±0,96	17,84±1,77
Coração (g/g·10 ⁻³)	3,0±0,2	3,0±0,0	3,2±0,1	3,5±0,3
Fígado (g/g·10 ⁻²)	2,8±0,2	2,9±0,6	2,6±0,1	3,2±0,8
Pâncreas (g/g·10 ⁻³)	2,1±0,2	2,0±0,3	2,0±0,4	2,5±0,4
TAM (g/g·10 ⁻³)	1,1±0,2	0,9±0,2	1,4±0,0*#	1,4±0,3*#

(*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON; (#) indica $p < 0,005$ em relação ao grupo EX.

5.3 PERFIL LIPÍDICO E METABOLISMO HEPÁTICO

Ao observarmos os parâmetros relacionados ao perfil lipídico hepático, foi percebido não haver alterações no conteúdo de lipídeos totais. Também permaneceu inalterado o conteúdo total de colesterol e a parcela de colesterol LDL. Contrariamente, o colesterol HDL tendeu a aumentar nos animais que realizaram JI, chegando à diferença estatística no grupo JI+EX em relação ao grupo CON.

Tabela3: Gorduras totais e colesterol total, LDL e HDL hepáticos (mg/g).

	CON	EX	JI	JI+EX
Lipídios Totais	38,53±1,88	36,0±6,9	43,6±9,71	43,75±4,52
Colesterol Total	1,925±0,58	2,63±1,01	2,509±1,14	2,714±1,59
Colesterol LDL	1,596±0,47	2,17±0,99	1,987±1,16	1,943±1,75
Colesterol HDL	0,329±0,16	0,456±0,05	0,521±0,13	0,770±0,44*

(*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo CON.

Ao observarmos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, os resultados referentes à concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) na figura 7A, foi

observado uma concentração estatisticamente maior e muito significante ($p < 0,0005$) no grupo JI comparando com todos os outros grupos experimentais.

Seguindo o mesmo comportamento das SRATB, a figura 7B demonstra que o grupo JI também apresentou concentração aumentada de proteínas carboniladas em comparação com todos os outros grupos experimentais. Pôde-se notar também que os animais dos grupos EX e JI+EX apresentaram conteúdo de proteínas carboniladas diminuídos, chegando a ficar estatisticamente abaixo do grupo CON.

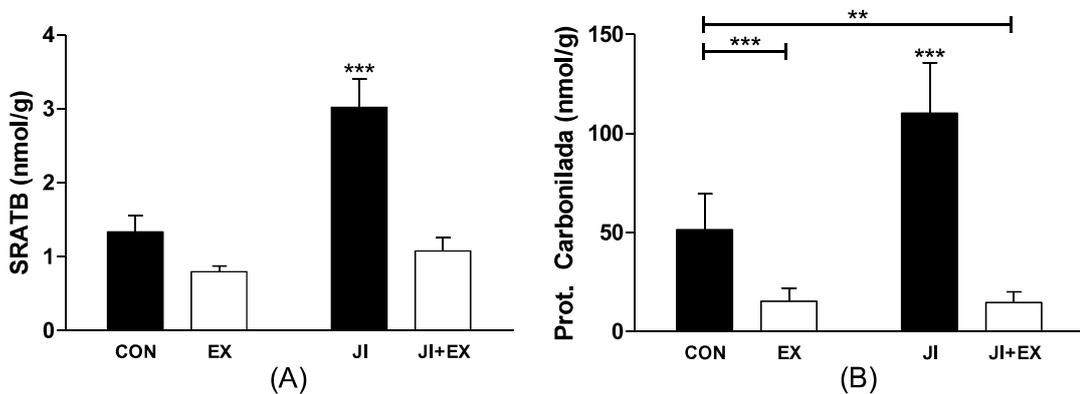


Figura7: Peroxidação Lipídica Hepática por quantificação das Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (A) e carbonilação de proteínas hepáticas (B). (**) indica $p < 0,005$; (***) indica $p < 0,0001$.

A concentração total de tióis não proteicos não apresentou mudanças estatisticamente significantes entre os grupos, apesar da média mais elevada no grupo JI.

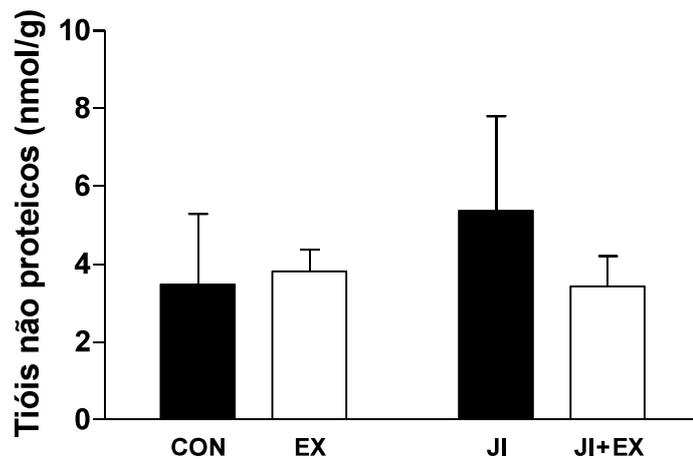


Figura8: Níveis hepáticos de tióis não proteicos.

5.4 DESEMPENHO FÍSICO

Os resultados do teste de desempenho físico realizado logo após o treinamento de natação de 6 semanas demonstraram que os animais que realizaram o exercício durante o período de JI, após 18 horas de jejum, tiveram o desempenho elevado de acordo com o teste. A carga em que foi relatada a fadiga teve uma representação percentual, em relação com a densidade dos animais, maior no grupo JI+EX em relação ao peso dos animais CON. Concomitante a isso, não houve diferença estatística do lactato sanguíneo coletado no momento da fadiga, demonstrando claramente que todos os animais obtiveram o mesmo nível de fadiga, mas em intensidades distintas (Figura 9).

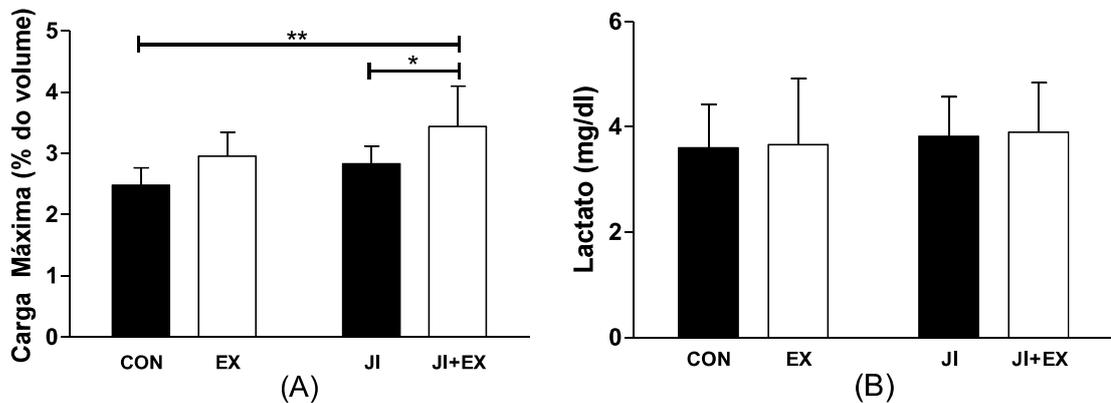


Figura9: Carga relativa de sobrecarga em percentual do peso corporal (A) e lactato sérico no ponto de exaustão no teste de esforço progressivo (B). (**) indica $p < 0,01$

Pôde-se observar que nos parâmetros relacionados à atividade muscular (Figura 10), a atividade de citrato sintase (A), enzima mitocondrial utilizada como marcadora da atividade do ciclo do ácido cítrico, mostrou-se aumentada no grupo JI+EX quando comparado com o grupo CON e o grupo EX. A gordura intramuscular (B) do grupo JI+EX, que também mostrou-se aumentada em comparação ao grupo EX, aumentou de maneira menos expressiva em relação ao grupo JI e não demonstrou diferenciar-se em relação ao grupo CON.

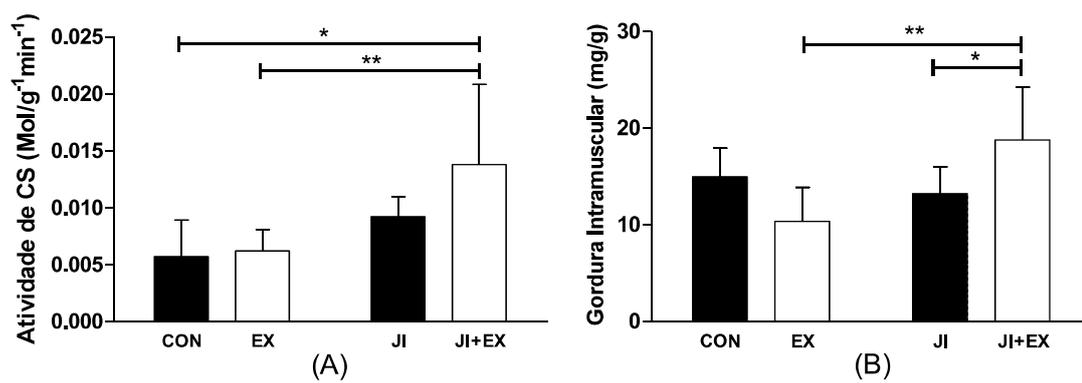


Figura10: Atividade de citrosintase no m. sóleo (A) e concentração de gordura intramuscular na porção vermelha do m. gastrocnêmio (B). (*) indica $p < 0,05$ e (**) indica $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

6.1 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

Além de sabermos da importância do controle do índice glicêmico dos alimentos na modulação do tecido adiposo, também é importante a obtenção de um balanço energético negativo no controle da obesidade. A literatura relacionada relata que o consumo de uma grande quantidade de alimentos em um curto período de tempo resulta em um pico glicêmico que favoreceria à um maior acúmulo agudo de energia na forma de adipócitos, recomendando assim uma maior frequência alimentar a fim de evitar a fome e controlar o apetite (SPEECHLY; BUFFENSTEIN, 1999). Porém, vem aumentando as evidências de que o aumento da frequência alimentar não é determinante para o sucesso da dieta, e que menos refeições diárias também podem resultar em efeitos metabólicos favoráveis ao emagrecimento (HUTCHISON; HEILBRONN, 2015). Nosso estudo demonstrou que o JI provocou emagrecimento dos animais tanto do grupo JI quanto do grupo JI+EX, mostrando que esta dieta, com menos frequência alimentar, também pode provocar o emagrecimento, tanto em animais sedentários quanto que realizam exercícios.

Apesar de estudos relatarem menor eficiência alimentar e peso corporal em animais submetidos à JI (CHAUSSE et al., 2014), a presença dessas características em animais submetidos ao exercício durante JI não foi relatada na literatura até então. Neste estudo, os animais do grupo JI+EX após 18 horas de Jejum, foram realimentados imediatamente após o período de exercício, com prováveis estoques de glicogênio muscular e hepático esgotados, o que pode ter evitado a deposição de energia nos adipócitos após o grande volume de alimento ingerido. Já os animais do grupo JI, que realizava apenas a intervenção nutricional, tiveram comportamento análogo no consumo alimentar e apresentaram gordura corporal elevada (demonstrada na seção 6.2). Esta ligação dá uma grande perspectiva do uso desta intervenção no controle de várias doenças metabólicas.

No nosso estudo foi observado que o consumo alimentar permaneceu inalterado entre os grupos (Figura 6). No estudo de (CHAUSSE et al., 2014), após JI de três semanas, além de menor eficiência alimentar e peso corporal, foi observado um maior consumo alimentar. Os pesquisadores concluíram que estas alterações metabólicas surgiram devido mudanças na função hipotalâmica gerada pelo JI. É provável que por conta do período diferente de JI, em

nosso estudo as alterações no padrão alimentar parecem ter sido mais amenas em relação ao consumo alimentar.

6.2 COMPOSIÇÃO CORPORAL

Apesar de não provocar alterações significantes no conteúdo proteico, o exercício mostrou-se uma ferramenta de diminuição da adiposidade corporal melhor que o Jejum Intermitente, visto que o grupo que realizou JI apresentou massa gorda elevada em comparação com os grupos EX e JI+EX.

Em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica por 8 semanas, GOTTHARDT et al. (2015) após um período de 4 semanas de JI com dieta padrão (normolipídica) e JI com dieta hiperlipídica, observaram que, além de perda de peso com uma retenção da massa magra, também ocorriam alterações na concentração hipotalâmica de norepinefrina e na expressão de neuropeptídeo Y, sugerindo uma ligação de um processo contrarregulatório de perda de peso, regulação da fome e eficiência alimentar relacionados ao JI com dieta padrão. SAKAMOTO; GRUNEWALD (1987), após submeterem ratos de 40 dias de vida a 8 semanas de JDA e exercício, também foram observadas modificações na composição corporal dos animais, com diminuição no ganho de peso e do percentual de massa gorda.

O comportamento do grupo submetido apenas ao JI neste estudo é controverso em relação à literatura, mostrando um grande acúmulo de gordura total, podendo ser resultado da diferença no período de jejum, do tempo diário de jejum e/ou da idade dos animais utilizados. É interessante observar que a média de aumento percentual do conteúdo de lipídios nos animais do grupo JI em comparação com o grupo JI+EX, é o mesmo, 4%, que é demonstrado no conteúdo de proteínas do grupo JI+EX em comparação com o JI, reforçando a ideia de que não há deposição de gordura nos animais apesar do consumo elevado após o exercício em jejum. É provável que este comportamento seja resultado de um maior consumo de gorduras nos animais JI+EX e de proteínas nos animais JI.

Ao observar a quantidade relativa de TAM elevada nos animais que apresentaram emagrecimento, sugere-se que os dois resultados também tenham relação, visto que o TAM é um tecido metabolicamente ativo que pode influenciar na composição corporal. O único estudo mostrando relação entre JI e parâmetros relacionados ao TAM, realizado por DESAUTELS; DULOS (1988) relata que em camundongos, um ciclo de alimentação *ad libitum* e jejum resultou em uma atrofia aguda relacionada a uma redução da proteína total e quantidade de succinato desidrogenase no tecido adiposo marrom. Sugerimos que a realização

deste ciclo de maneira crônica provoca uma adaptação à condição e hipertrofia do tecido, com o objetivo de diminuir o impacto do período de jejum e aperfeiçoar a regulação do metabolismo energético.

Estudos recentes mostram que o TAB pode regular diretamente a homeostase energética através do desacoplamento da produção de ATP mitocondrial, induzindo termogênese e diminuindo a deposição de gordura (GUILLEN et al., 2013; ZHOU et al., 2014). O maior gasto energético regulado por TAM é bem relatado na literatura como possível estratégia de tratamento de obesidade, diabetes tipo II e síndrome metabólica (RAVUSSIN; GALGANI, 2011; POEKES; LANTHIER; LECLERCQ, 2015). Assim, é provável que a maior quantidade de TAM nos animais submetidos à JI também esteja relacionada à um maior gasto energético e consumo de gorduras, levando à menor eficiência alimentar e peso dos animais.

É interessante pôr em nota que durante a dissecação dos animais, foi observado que os animais submetidos a JI não apresentavam tecido adiposo peritoneal e epididimal, predominantemente compostos por TAB. Em períodos de Jejum ou alta demanda energética, o TAB é estimulado principalmente pela ação das catecolaminas, levando a uma série de reações intracelulares que culminam na ativação da proteínas quinase A e G (PKA/PKG), que promovem a hiperfosforilação de lipase sensível a hormônio (HSL) (BÉZAIRE; LANGIN, 2009). Depois da hiperfosforilação, o HSL é translocado dentro da célula lipídica e age junto com o lipase de triglicerídeo do adipócito (ATGL) acelerando o processo lipolítico. Juntos, ATGL e HSL são responsáveis por até 95% da hidrólise do triacilglicerol (SCHWEIGER et al., 2006; JOCKEN et al., 2007). Esta observação reforça a hipótese de que o JI provoca um aumento no metabolismo de gorduras e parece provocar a redistribuição dos tecidos adiposos no corpo do animal, visto que ao passo que ocorreu um aumento na quantidade relativa de TAM também houve um aumento na gordura intramuscular (relatado na sessão 6.4) e uma diminuição da gordura visceral, composta de TAB.

6.3 PERFIL LIPÍDICO E METABOLISMO HEPÁTICO

O fígado, como um dos principais órgãos do metabolismo energético no organismo, frequentemente é o órgão mais afetado pela mudança de padrão dietético. Dietas Hiperlipídicas costumam aumentar a quantidade de gordura no fígado, podendo provocar esteatose hepática. Em casos de jejum, é observado um estresse oxidativo exacerbado. Mudanças no transcriptoma/proteoma induzidas por jejum ocorrem em estreita relação com a utilização dos combustíveis metabólicos, independentemente dos níveis de ATP. Dados

ômicos sugerem um agravamento do estresse oxidativo durante a fase proteolítica de jejum, principalmente relacionados à baixos níveis de fatores antioxidantes e também diminuição da atividade enzimática, prejudicada por baixos níveis de NADPH (WASSELIN et al., 2014).

Porém, ao avaliarmos os efeitos crônicos de JI e exercício, pôde-se notar que a necessidade de substratos no tecido muscular exigida pelo exercício, e a falta de glicose no momento do exercício em jejum, parece ter provocado uma maior produção de colesterol HDL, responsável por levar ácidos graxos livres (AGL's) para metabolização no fígado (Tabela 3). No Jejum, a utilização de lipídios como energia pode ser dada através dos ácidos graxos livres, e como armazenamento de energia na gliconeogênese e lipogênese a partir do glicerol. Assim, a falta de glicose pode ser suprida durante o exercício pela utilização de lipídios através da beta-oxidação na matriz mitocondrial.

A maior atividade de citrato sintase e o maior armazenamento de lipídios intramusculares mostrados na sessão referente ao 6.4 (figura 10) pode ser um forte indício de que o aumento de desempenho provocado pelo treinamento em jejum esteja ligado à um aperfeiçoamento da utilização de gorduras como substrato. Estudos recentes sugerem que um mecanismo desconhecido, na ocorrência de depleção de glicogênio no fígado e no músculo esquelético, estimula um aumento na oxidação de gorduras no organismo (PHILP; HARGREAVES; BAAR, 2012; IZUMIDA et al., 2013). IWAYAMA et al. (2015) observaram que jovens treinados ao realizar exercício aeróbio no período pós-absortivo (após jejum noturno), apresentaram 24 horas após a atividade um maior consumo de energia através da oxidação de lipídios que quando realizam exercício após alimentados.

Em nosso estudo percebe-se que a quantidade de gorduras armazenadas no fígado é inalterada pela intervenção, porém as proporções de lipoproteínas de baixa densidade são alteradas significativamente no grupo JI+EX, obtendo uma diferença significativa no grupo JI+EX. O Colesterol HDL é responsável pela entrega de ácidos graxos livres (AGL's) ao fígado para produção de glicose (gliconeogênese), e em casos de inanição, pode ter sua produção aumentada para que, com mais AGL's disponíveis, o organismo possa aumentar a produção de energia através da β -oxidação dos ácidos graxos (IZUMIDA et al., 2013).

LEHTI et al. (2013) em seu estudo observou que os níveis elevados de HDL alteram diretamente a oxidação de glicose e a respiração mitocondrial nas células musculares de ratos ApoA-Itg (transgênicos para apolipoproteína A-I). Isto sugere que os níveis elevados de colesterol HDL hepático podem ser respostas adaptativas do metabolismo do fígado à uma menor quantidade de substrato durante o exercício em jejum.

Além da maior utilização das reservas de tecido adiposo, o estresse oxidativo hepático proveniente do jejum também é bem relatado na literatura. Períodos longos de inanição favorecem uma maior liberação de aldeídos como resultado da oxidação de lipídios, que provoca alterações estruturais e de permeabilidade das membranas celulares. Como consequência, ocorre uma perda da seletividade na troca iônica e liberação de organelas celulares, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de aldeídos citotóxicos, resultando na morte celular. Essa maior quantidade de aldeídos liberados no organismo afetam o equilíbrio redox principalmente através da carbonilação de proteínas, em que são acrescentados grupos carbonila, modificando suas estruturas e perdendo funções estruturais, enzimáticas e de sinalização. Em nosso estudo pudemos notar um grande desequilíbrio no balanço redox dos animais submetidos ao JI.

Podemos observar na Figura 10A que possivelmente em função do ataque por radicais livres à parede celular, provocando uma peroxidação lipídica, notou-se um aumento significativamente nos níveis de aldeídos no fígado. CHAUSSE et al. (2015) relataram que após um período de JI de 24 horas (JDA) os níveis de peroxidação lipídica no fígado também são aumentados, mas com intensidade menor que a notada em nosso estudo.

Percebe-se que apesar de a composição total de gordura no corpo ser maior no grupo JI (Tabela 1), o mesmo não se reflete no fígado (Tabela 3), mostrando que os níveis de peroxidação lipídica não são proporcionais aos níveis de gordura hepática. No nosso estudo foi percebido que ao realizar exercício durante o jejum, os animais parecem ter uma proteção antioxidante significativa, visto que os níveis de SRATB apresentaram valores iguais ao grupo CON.

Os altos níveis de aldeídos liberados na peroxidação lipídica, somados aos radicais livres e cetonas, provocam um aumento significativo da carbonilação de proteínas, podendo provocar alterações na sinalização de vias importantes do metabolismo. Além disso as proteínas carboniladas tendem a ser mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise, dificultando a reposição da mesma pela célula. Esta reação pode ser percebida neste estudo, em que o grupo JI aumentou a concentração de proteínas carboniladas (Figura 7). Seguindo o mesmo comportamento das SRATB, as proteínas carboniladas no grupo submetido à exercício em jejum diminuíram, nesse caso à valores menores inclusive que do grupo controle.

A maior peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas hepáticas nos animais submetidos ao JI mostra a magnitude do estresse que o Jejum pode representar apesar dos parâmetros positivos relacionados a saúde relatados na literatura (AZEVEDO; IKEOKA; CARAMELLI, 2013; ELLS et al., 2015; CHERIF et al., 2015). Contrariamente, ao adicionar

exercício à rotina diária, os resultados metabólicos mostram uma normalização do estado redox no fígado sugerindo que o exercício de *endurance*, quando adicionado à rotina de JI, provoca efeitos bem diferentes que as duas intervenções isoladas.

Com as análises utilizadas não foi possível observar as respostas antioxidantes que resultaram em um menor desequilíbrio redox nos grupos que realizaram exercício. Como resultado de uma provável maior concentração de ERO, notada pelo aumento de peroxidação lipídica e carbonilação proteica, não houve uma maior concentração de tióis não-proteicos como resposta antioxidante. Este resultado pode estar relacionado a dificuldade do organismo de adaptar-se à uma maior exposição crônica aos radicais livres no grupo JI, resultando em maiores níveis de aldeídos e proteínas carboniladas. CHAUSSE et al. (2015) observaram que como efeito de 4 semanas de JDA há um aperfeiçoamento da capacidade respiratória da mitocôndria no fígado, mas que concomitantemente observa-se um aumento na quantidade de radicais livres, malondialdeído e proteínas carboniladas como resultado de JI, mesmo efeito encontrado em nosso estudo. Os níveis baixos de parâmetros metabólicos relacionados à oxidação em conjunto com níveis também baixos de parâmetros relacionados à resposta antioxidante nos grupos que realizaram exercício podem indicar um equilíbrio redox relacionado às modificações do metabolismo de glicose durante o exercício de *endurance*, porém nossos dados ainda são insuficientes. Devem ser realizadas mais análises a fim de observar o funcionamento de toda a parede antioxidante do tecido, incluindo a atividade das enzimas antioxidantes.

6.4 DESEMPENHO FÍSICO

Foi observado no nosso estudo um aumento do desempenho no teste de carga progressiva no grupo JI+EX. É provável que esse aumento de desempenho notado seja reflexo tanto de um menor peso, como de uma melhora no metabolismo energético aeróbio.

No exercício de *endurance*, há uma predominância da via energética aeróbia relacionada à intensidade, demonstrada por um aumento da atividade do ciclo do ácido cítrico. Esta relação é relatada no nosso estudo ao observarmos na figura 10 um aumento na atividade da enzima citratosintase, marcador de atividade do ciclo do ácido cítrico (A), e concomitante aumento no acúmulo de gordura intramuscular (B) dos animais submetidos ao treinamento de *endurance* durante o JI.

Esse aumento de atividade de citratosintase, por indicar uma melhora tanto da fosforilação oxidativa quanto da β -oxidação (GOODPASTER; KATSIARAS; KELLEY,

2003; TALANIAN et al., 2007), aliado ao aumento da gordura muscular, pode ser a explicação para o aumento de desempenho relatado na figura 9, e do emagrecimento com diminuição do percentual de massa gorda, comparado com o grupo JI, reforçado pela maior concentração de colesterol HDL no fígado.

Para o ganho de desempenho, o treinamento de *endurance* isolado parece não ter sido eficiente. A maioria dos estudos de desempenho em modelos animais utiliza animais jovens, com média de 60 dias de vida, nosso estudo utilizou animais de 150 dias de vida, em que no período estudado, não resultou em ganhos significativos tanto no resultado do teste de resistência (Figura 9) quanto na atividade de citrato sintase (Figura 10).

O estudo de NAITO et al. (2001) demonstrou aumento de desempenho em ratos idosos submetidos a 10 semanas de treinamento de corrida em esteira a 77% da capacidade máxima, com aumento do VO₂ de pico e da atividade de citrato sintase. É provável que nosso resultado controverso em relação ao grupo exercitado esteja relacionado ao tempo de treinamento e intensidade do exercício. Sabe-se que a atividade mitocondrial diminui com o avanço da idade, e que o exercício retarda este declínio (KOLTAI et al., 2012), porém, as respostas adaptativas do organismo ao exercício também sofrem um declínio com a idade, e provavelmente precisaríamos de um período e/ou intensidade maior de treinamento para resultados mais significativos.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que apesar de levar a alterações metabólicas importantes relacionadas ao metabolismo energético e emagrecimento, o JI parece ser uma estratégia metabolicamente danosa, visto o grande desequilíbrio dos parâmetros relacionados ao balanço redox encontrado no fígado dos animais submetidos à estratégia. Porém, junto a esse fato, pudemos observar também o efeito benéfico encontrado na combinação dessa estratégia com o exercício de *endurance* no período de jejum.

Nosso estudo demonstrou que ao realizar exercício de *endurance* somado ao JI, os animais obtiveram um maior ganho de desempenho físico, sustentado tanto pela massa final no teste de cargas progressivas quanto pela maior atividade da enzima citrato sintase.

Esse maior desempenho parece ter sido obtido graças a uma maior disponibilidade de energia proveniente dos estoques de lipídios dos animais e adaptações metabólicas que permitiram maior utilização de energia quando necessário, como uma maior disponibilidade de colesterol HDL e maiores estoques de lipídios no músculo esquelético. Toda essa adaptação que permitiu um ganho de desempenho e maior transição do combustível metabólico para os lipídios, parecem ter como chave o metabolismo das mitocôndrias dos músculos esqueléticos durante o exercício, visto que as mesmas são grandes responsáveis pela liberação de ERO. O JI de maneira isolada, além de ter aumentado o estresse oxidativo, parece não ter influenciado positivamente na atividade mitocondrial como o exercício.

Acreditamos que o déficit de energia, em que acúmulo de adenosina monofosfato (AMP) no músculo que sinaliza alterações transcricionais, desencadeando uma maior síntese mitocondrial e ativação da fosforilação oxidativa, por ser bem mais intenso no exercício realizado em jejum, tenha sido a chave para o ganho de desempenho e ativação do metabolismo de lipídios.

Assim, concluímos que a intervenção com JI utilizada neste estudo mostrou-se uma estratégia interessante e válida de modificação do padrão alimentar aliada ao exercício a fim de modular o metabolismo energético. Acrescentamos que nossos resultados não sugerem nenhum efeito negativo associado à prática do exercício durante o JI. Como complemento deste estudo, tendo em vista os nossos resultados e o que vem sendo encontrado na literatura atualmente, sugerimos que devem ser observados os efeitos de outros períodos de jejum e intensidades de exercício a fim de entender os mecanismos de ativação do metabolismo de lipídios e funcionamento da atividade mitocondrial durante esta prática.

REFERÊNCIAS

- ABETE, I. et al. Nutrigenetics and nutrigenomics of caloric restriction. *Progress in molecular biology and translational science*, [S.l.], v.108, p.323–346, 2011.
- AMORIM, F.; DANTAS, E. H. M. Efeitos do treinamento da capacidade aeróbica sobre a qualidade de vida e autonomia de idosos. *Fitness & Performance Journal*, [S.l.], v.1, n.3, p.47–55, 2002.
- ARAUJO, G. G. de et al. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [S.l.], v.148, n.4, p.888–892, 2007.
- AZEVEDO, F. R. d.; IKEOKA, D.; CARAMELLI, B. Effects of intermittent fasting on metabolism in men. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [S.l.], v.59, n.2, p.167–173, 2013.
- AZIZ, A. R. et al. Effects of Ramadan fasting on 60 min of endurance running performance in moderately trained men. *British journal of sports medicine*, [S.l.], v.44, n.7, p.516–521, 2010.
- BECK, W. R.; ARAUJO, G. G. d.; GOBATTO, C. A. Methods of exercise intensity and lactataemia determination of lactate minimum test in rats. *Comparative Exercise Physiology*, [S.l.], v.8, n.2, p.113–116, 2012.
- BÉZAIRE, V.; LANGIN, D. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proceedings of the Nutrition Society*, [S.l.], v.68, n.04, p.350–360, 2009.
- BHUTANI, S. et al. Alternate day fasting and endurance exercise combine to reduce body weight and favorably alter plasma lipids in obese humans. *Obesity*, [S.l.], v.21, n.7, p.1370–1379, 2013.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, [S.l.], v.37, n.8, p.911–917, 1959.
- BROOKS, C. L.; GU, W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nature Reviews Cancer*, [S.l.], v.9, n.2, p.123–128, 2009.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, [S.l.], v.52, p.302–310, 1978.
- CANTÓ, C. et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell metabolism*, [S.l.], v.11, n.3, p.213–219, 2010.
- CARLSON, M. G.; SNEAD, W. L.; CAMPBELL, P. J. Fuel and energy metabolism in fasting humans. *The American journal of clinical nutrition*, [S.l.], v.60, n.1, p.29–36, 1994.
- CARLSON, O. et al. Impact of reduced meal frequency without caloric restriction on glucose regulation in healthy, normal-weight middle-aged men and women. *Metabolism*, [S.l.], v.56, n.12, p.1729–1734, 2007.

- CASTELLO, L. et al. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF- κ B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, [S.l.], v.48, n.1, p.47–54, 2010.
- CHALIMONIUK, M. et al. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *JPP*, [S.l.], n.4, p.07, 2015.
- CHAUSSE, B. et al. Intermittent Fasting Induces Hypothalamic Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency, Low Body Mass and Overeating. *Endocrinology*, [S.l.], 2014.
- CHAUSSE, B. et al. Intermittent Fasting Results in Tissue-Specific Changes in Bioenergetics and Redox State. *PloS one*, [S.l.], v.10, n.3, p.e0120413, 2015.
- CHERIF, A. et al. Effects of Intermittent Fasting, Caloric Restriction, and Ramadan Intermittent Fasting on Cognitive Performance at Rest and During Exercise in Adults. *Sports Medicine*, [S.l.], p.1–13, 2015.
- COYLE, E. F. Physiological determinants of endurance exercise performance. *Journal of Science and Medicine in Sport*, [S.l.], v.2, n.3, p.181–189, 1999.
- CZARKOWSKA-PACZEK, B. et al. One session of exercise or endurance training does not influence serum levels of irisin in rats. *JPP*, [S.l.], n.3, p.15, 2014.
- DANNECKER, E. A. et al. The effect of fasting on indicators of muscle damage. *Experimental gerontology*, [S.l.], v.48, n.10, p.1101–1106, 2013.
- DAVIES, K. J.; PACKER, L.; BROOKS, G. A. Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [S.l.], v.209, n.2, p.539–554, 1981.
- DESAUTELS, M.; DULOS, R. Effects of repeated cycles of fasting-refeeding on brown adipose tissue composition in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, [S.l.], v.255, n.2, p.E120–E128, 1988.
- ELLS, L. J. et al. Intermittent fasting interventions for the treatment of overweight and obesity in adults aged 18 years and over: a systematic review protocol. *The JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*, [S.l.], v.13, n.10, p.60–68, 2015.
- FARVID, M. et al. Association of adiponectin and resistin with adipose tissue compartments, insulin resistance and dyslipidaemia. *Diabetes, obesity and metabolism*, [S.l.], v.7, n.4, p.406–413, 2005.
- GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [S.l.], v.130, n.1, p.21–27, 2001.
- GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. d. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative medicine and cellular longevity*, [S.l.], v.2012, 2012.
- GOODPASTER, B. H.; KATSIARAS, A.; KELLEY, D. E. Enhanced fat oxidation through

physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*, [S.l.], v.52, n.9, p.2191–2197, 2003.

GOODRICK, C. et al. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mechanisms of ageing and development*, [S.l.], v.55, n.1, p.69–87, 1990.

GOTTHARDT, J. D. et al. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss with Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology*, [S.l.], p.en–2015, 2015.

GUERRA, M. d. O.; PETERS, V. M. Morfometria de ratos Wistar: pesos e medidas corporais. *Rev. ciênc. bioméd.(São Paulo)*, [S.l.], v.15, p.65–74, 1995.

GUILLEN, C. et al. Concerted expression of the thermogenic and bioenergetic mitochondrial protein machinery in brown adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry*, [S.l.], v.114, n.10, p.2306–2313, 2013.

GUMAA, K. et al. The effects of fasting in Ramadan. *British journal of nutrition*, [S.l.], v.40, n.03, p.573–581, 1978.

GUNAWARDANA, S. C.; PISTON, D. W. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes*, [S.l.], v.61, n.3, p.674–682, 2012.

HALBERG, N. et al. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *Journal of Applied Physiology*, [S.l.], v.99, n.6, p.2128–2136, 2005.

HALLAK, M. H.; NOMANI, M. Body weight loss and changes in blood lipid levels in normal men on hypocaloric diets during Ramadan fasting. *The American journal of clinical nutrition*, [S.l.], v.48, n.5, p.1197–1210, 1988.

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.l.], v.8, n.10, p.774–785, 2007.

HEILBRONN, L. K. et al. Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting. *Obesity research*, [S.l.], v.13, n.3, p.574–581, 2005.

HOFMANN, T.; ELBELT, U.; STENGEL, A. Irisin as a muscle-derived hormone stimulating thermogenesis—a critical update. *Peptides*, [S.l.], v.54, p.89–100, 2014.

HUTCHISON, A. T.; HEILBRONN, L. K. Metabolic impacts of altering meal frequency and timing—Does when we eat matter? *Biochimie*, [S.l.], 2015.

INGJER, F. Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *The Journal of Physiology*, [S.l.], v.294, n.1, p.419–432, 1979.

IWAYAMA, K. et al. Transient energy deficit induced by exercise increases 24-h fat oxidation in young trained men. *Journal of Applied Physiology*, [S.l.], v.118, n.1, p.80–85, 2015.

IZUMIDA, Y. et al. Glycogen shortage during fasting triggers liver–brain–adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nature communications*, [S.l.], v.4, 2013.

JAKICIC, J. M. et al. American College of Sports Medicine position stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Medicine and science in sports and exercise*, [S.l.], v.33, n.12, p.2145–2156, 2001.

Jl, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine and science in sports and exercise*, [S.l.], v.25, n.2, p.225–231, 1993.

Jl, L. L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [S.l.], v.959, n.1, p.82–92, 2002.

JOCKEN, J. W. et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [S.l.], v.92, n.6, p.2292–2299, 2007.

KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism*, [S.l.], v.1, n.1, p.15–25, 2005.

KJELDAHL, J. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem*, [S.l.], v.22, n.366, p.10–1007, 1883.

KLEMPPEL, M. C. et al. Dietary and physical activity adaptations to alternate day modified fasting: implications for optimal weight loss. *Nutr J*, [S.l.], v.9, p.35, 2010.

KOLTAI, E. et al. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, [S.l.], v.303, n.2, p.R127–R134, 2012.

KOMI, P. V.; COMMISSION, I. M. et al. *Strength and power in sport*. [S.l.]: Blackwell scientific publications, 1993.

LEHTI, M. et al. High-density lipoprotein maintains skeletal muscle function by modulating cellular respiration in mice. *Circulation*, [S.l.], p.CIRCULATIONAHA-113, 2013.

LEVY, W. C. et al. Effect of endurance exercise training on heart rate variability at rest in healthy young and older men. *The American journal of cardiology*, [S.l.], v.82, n.10, p.1236–1241, 1998.

LI, L.; LI, Z. [Progress on relationship between exercise improving insulin resistance and AMP-activated protein kinase]. *Sheng li xuebao:[ActaphysiologicaSinica]*, [S.l.], v.66, n.2, p.231–240, 2014.

LIU, X. et al. Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell research*, [S.l.], v.23, n.6, p.851–854, 2013.

LOUCHE, K. et al. Endurance exercise training up-regulates lipolytic proteins and reduces triglyceride content in skeletal muscle of obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [S.l.], v.98, n.12, p.4863–4871, 2013.

- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, [S.l.], v.193, n.1, p.265–275, 1951.
- MATTHEWS, J. et al. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ: British Medical Journal*, [S.l.], v.300, n.6719, p.230, 1990.
- MEKRUNGRUANGWONG, T. et al. The serum protein carbonyl content level in relation to exercise stress test. *International Journal of Health & Allied Sciences*, [S.l.], v.1, n.3, p.200, 2012.
- MORGAN, M. J.; LIU, Z.-g. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell research*, [S.l.], v.21, n.1, p.103–115, 2011.
- NAITO, H. et al. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Medicine and science in sports and exercise*, [S.l.], v.33, n.5, p.729–734, 2001.
- NAKAMURA, Y.; WALKER, B. R.; IKUTA, T. Systematic review and meta-analysis reveals acutely elevated plasma cortisol following fasting but not less severe calorie restriction. *Stress*, [S.l.], n.just-accepted, p.1–21, 2015.
- NARKAR, V. A. et al. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell*, [S.l.], v.134, n.3, p.405–415, 2008.
- NERY, C. d. S. et al. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, [S.l.], v.17, n.1, p.49–55, 2011.
- NG, M. et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, [S.l.], v.384, n.9945, p.766, 2014.
- NOVELLI, E. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, [S.l.], v.41, n.1, p.111–119, 2007.
- O'NEILL, H. M.; HOLLOWAY, G. P.; STEINBERG, G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Molecular and cellular endocrinology*, [S.l.], v.366, n.2, p.135–151, 2013.
- PATTYN, N. et al. The effect of exercise on the cardiovascular risk factors constituting the metabolic syndrome. *Sports medicine*, [S.l.], v.43, n.2, p.121–133, 2013.
- PHILP, A.; HARGREAVES, M.; BAAR, K. More than a store: regulatory roles for glycogen in skeletal muscle adaptation to exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, [S.l.], v.302, n.11, p.E1343–E1351, 2012.
- POEKES, L.; LANTHIER, N.; LECLERCQ, I. A. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clinical Science*, [S.l.], v.129, n.11, p.933–949, 2015.
- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, [S.l.], v.88, n.4, p.1243–1276, 2008.

- PRAAG, H. van et al. Exercise, energy intake, glucose homeostasis, and the brain. *The Journal of Neuroscience*, [S.l.], v.34, n.46, p.15139–15149, 2014.
- RAVUSSIN, E.; GALGANI, J. E. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annual review of nutrition*, [S.l.], v.31, p.33, 2011.
- ROMANINO, K. et al. Myopathy caused by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inactivation is not reversed by restoring mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S.l.], v.108, n.51, p.20808–20813, 2011.
- ROSENKILDE, M. et al. Changes in peak fat oxidation in response to different doses of endurance training. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, [S.l.], v.25, n.1, p.41–52, 2015.
- RYAN, A. et al. Aerobic exercise+ weight loss decreases skeletal muscle myostatin expression and improves insulin sensitivity in older adults. *Obesity*, [S.l.], v.21, n.7, p.1350–1356, 2013.
- SAKAMOTO, K.; GRUNEWALD, K. K. Beneficial effects of exercise on growth of rats during intermittent fasting. *The Journal of nutrition*, [S.l.], v.117, n.2, p.390–395, 1987.
- SALEH, S. A. et al. Effects of Ramadan fasting on waist circumference, blood pressure, lipid profile, and blood sugar on a sample of healthy Kuwaiti men and women. *Mal J Nutr*, [S.l.], v.11, n.2, p.143–50, 2005.
- SCHWEIGER, M. et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v.281, n.52, p.40236–40241, 2006.
- SEALS, D. R. et al. Endurance training in older men and women. I. Cardiovascular responses to exercise. *Journal of Applied Physiology*, [S.l.], v.57, n.4, p.1024–1029, 1984.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, [S.l.], v.25, p.192–205, 1968.
- SPEECHLY, D.; BUFFENSTEIN, R. Greater appetite control associated with an increased frequency of eating in lean males. *Appetite*, [S.l.], v.33, n.3, p.285–297, 1999.
- SRERE, P. Citrate synthase. *Methods in enzymology*, [S.l.], v.13, p.3–11, 1969.
- STANFORD, K. I. et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation*, [S.l.], v.123, n.1, p.215, 2013.
- SUMMERMATTER, S. et al. Skeletal muscle PGC-1 α controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor α -dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S.l.], v.110, n.21, p.8738–8743, 2013.
- SVENSSON, M. B. et al. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta physiologica scandinavica*, [S.l.], v.176, n.1, p.43–56, 2002.

- TALANIAN, J. L. et al. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *Journal of applied physiology*, [S.l.], v.102, n.4, p.1439–1447, 2007.
- TAMURA, Y. et al. Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, [S.l.], v.307, n.7, p.R931–R943, 2014.
- TIKOO, K. et al. Intermittent fasting prevents the progression of type I diabetic nephropathy in rats and changes the expression of Sir2 and p53. *FEBS letters*, [S.l.], v.581, n.5, p.1071–1078, 2007.
- TINSLEY, G. M.; LA BOUNTY, P. M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. *Nutrition reviews*, [S.l.], p.nuv041, 2015.
- TRABELSI, K. et al. Effect of fed-versus fasted state resistance training during Ramadan on body composition and selected metabolic parameters in bodybuilders. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, [S.l.], v.10, n.1, p.23, 2013.
- URBANCHEK, M. G. et al. Specific force deficit in skeletal muscles of old rats is partially explained by the existence of denervated muscle fibers. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, [S.l.], v.56, n.5, p.B191–B197, 2001.
- VARADY, K. A. et al. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *The American journal of clinical nutrition*, [S.l.], v.90, n.5, p.1138–1143, 2009.
- VARADY, K. et al. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. *Journal of lipid research*, [S.l.], v.48, n.10, p.2212–2219, 2007.
- VESTERINEN, V. et al. Heart rate variability in prediction of individual adaptation to endurance training in recreational endurance runners. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, [S.l.], v.23, n.2, p.171–180, 2013.
- WANG, C.-H. et al. Effects of endurance exercise training on risk components for metabolic syndrome, interleukin-6, and the exercise capacity of postmenopausal women. *Geriatric nursing (New York, NY)*, [S.l.], 2014.
- WASSELIN, T. et al. Exacerbated oxidative stress in the fasting liver according to fuel partitioning. *Proteomics*, [S.l.], v.14, n.16, p.1905–1921, 2014.
- WILSON, G. et al. Fasted exercise and increased dietary protein reduces body fat and improves strength in jockeys. *Int. J. Sports. Med.*[Online ahead of print.] Medline, [S.l.], 2015.
- WINDER, W.; HARDIE, D. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, [S.l.], v.277, n.1, p.E1–E10, 1999.

WINDER, W. W.; TAYLOR, E. B.; THOMSON, D. M. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, [S.l.], v.38, n.11, p.1945–1949, 2006.

ZGHAL, F. et al. Improved tolerance of peripheral fatigue by the central nervous system after endurance training. *European journal of applied physiology*, [S.l.], p.1–15, 2015.

ZHOU, Y. et al. The formation of brown adipose tissue induced by transgenic over-expression of PPAR γ 2. *Biochemical and biophysical research communications*, [S.l.], v.446, n.4, p.959–964, 2014.

ANEXOS

A. Aprovação no Comitê de ética em uso de animais



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento de endurance na composição corporal e desempenho físico de ratos Wistar
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Vannucchi Portari
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 28/01/2015
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 337

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de Ratos Wistar associado ou não à estratégia de Jejum Intermitente e Treinamento de Natação.

1.2 Objetivos Específicos

Desenvolver um protocolo de treinamento de natação que diminua o viés da composição corporal na determinação da intensidade do treinamento.

Observar as modificações da composição corporal como resultado da estratégia de alimentação e exercício abordadas.

Observar a relação da expressão proteica de PGC1- α , Miostatina, Atrogina e Akt com as modificações na composição corporal dos animais.

2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo tem como justificativa a possível relação do Jejum Intermitente associado à prática de treinamento aeróbico com a melhoria da composição corporal e saúde geral, assim como também estratégia de aumento do desempenho físico. Faz-se necessário também entender os mecanismos fisiológicos envolvidos no treinamento de endurance em Jejum, escassos na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- Jejum:

Os animais serão submetidos à Jejum Intermitente, com ração *ad libitum* durante 6 horas por dia, logo após treinamento de natação.

- Treinamento:

Antes do início do período de treinamento, será feito um período de adaptação do animal ao meio líquido, onde o mesmo ficará em contato com água rasa uma hora por dia, durante uma semana, no mesmo período do dia em que será realizado o treinamento. Isso visará reduzir o estresse dos animais e adaptá-los ao protocolo de treinamento físico, realizado na água à temperatura de 31°C regulada por aquecedor com termostato automático (Hopar SA-333, ZhongShan, China). Os animais serão submetidos antes do início do treinamento e após o término, a um teste de Lactato Mínimo, seguindo um protocolo específico para o teste de natação proposto por BECK et al. (2012), seguindo três etapas: (1) indução de acidose metabólica aplicando duas sessões de natação (em primeiro lugar 30 segundos e posteriormente até a exaustão) com 13% do peso corporal, separados por 30 segundos de descanso; (2) nove minutos de recuperação para permitir a remoção



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento de endurance na composição corporal e desempenho físico de ratos Wistar
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Vannuechi Portari
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 28/01/2015
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 337

de lactato dos músculos para o sangue, em que as amostras de sangue serão coletadas no ponto 7 e 9 min para determinar pico de lactato; e (3) fase de exercício incremental intensidade realizado com uma sobrecarga inicial de 4% de peso corporal e incrementa a 0,5% por cada 5 min, até 7%. Durante os intervalos, os animais serão mantidos em águas rasas a uma temperatura idêntica do tanque de natação para evitar o stress térmico. As amostras de Lactato serão realizadas por punção caudal nos intervalos 4%, 5%, 6% e 7%, através de pequeno furo feito com lanceta de glicemia descartável de 0,4mm de diâmetro (Roche/Accu-check Softclix). Caso o orifício se feche, o mesmo será refeito com a mesma técnica. Após o teste será aplicado Cetoprofeno na dose de 2mg/kg, a fim de evitar inflamação e mal estar durante a recuperação do teste. Dois dias após o teste de potência aeróbica, se dará início o treinamento de natação em um tanque com água em profundidade a 100cm e sobrecarga de peso equivalente a 85% da carga limiar do animal (exercício submáximo), considerando a retificação do mesmo pelo empuxo. O treinamento consistirá em 60 minutos por dia, e cinco sessões semanais (segunda a sexta) e terá duração de 8 semanas. As avaliações de peso para ajuste semanal de carga serão realizadas nos dias de repouso do treinamento (sábado e domingo).

- Teste de Tolerância à Glicose:

O teste de tolerância à glicose (TTG) será realizado com os animais na última semana do experimento, após 12 horas de jejum. Uma primeira coleta de sangue será feita por meio de lanceta para glicemia na cauda do animal (tempo 0). A curva glicêmica será determinada por meio de glicosímetro específico, após administração de glicose a 50% (2g/kg de massa corporal, aproximadamente 0,8 mL) por gavagem através sonda gástrica de polietileno PE-10 (Intramedic, Clay Adams, New Jersey, Estados Unidos) conectada a uma seringa. Amostras de sangue serão coletadas após 30, 60 e 120 minutos, em gota de sangue da cauda e aplicadas à tiras para determinação de glicose, A extensão da canula será suficiente para alcançar o estômago do animal (~8 cm), como determinado por Pereira, et al (2002). Na prática e para maior precisão, esta medida será realizada estendendo-se a cânula exteriormente ao corpo do animal ao longo da boca até a região do estômago. A contenção para realização da gavagem será pressionando-o firmemente, porém de forma gentil, colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica, segurando, primeiramente a pele da região dorso-cervical. (FIOCRUZ, 2005).

- Eutanásia:

Os animais serão eutanasiados por Exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com Quetamina(100mg/kg) e Xilazina(10mg/kg), em um volume de dose recomendado de acordo com as normas estabelecidas na Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013, que baixa as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, e as orientações para prática de anestesia presente no material didático do CEUA-UFTM (CARPENTER, 2010).

Serão coletados 3ml de sangue da exsanguinação por punção cardíaca para realizar as análises bioquímicas.

- Análises Bioquímicas:



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento de endurance na composição corporal e desempenho físico de ratos Wistar
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Vannucchi Portari
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 28/01/2015
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 337

Além do Teste de Tolerância à glicose e lactecemia, que serão realizados *in vivo*, a fim de ver a reação fisiológica do animal ao procedimento, serão realizadas análises bioquímicas do colesterol (HDL, LDL e VLDL) e triglicerídeos sérico com o sangue retirado no momento da Eutanásia.

- Análise de Composição Corporal:

A composição corporal dos animais será determinada a partir da análise química da carcaça, a qual avaliar-se-á a quantidade absoluta e o percentual de líquidos corporais, de proteínas totais e de lipídios presente na carcaça. A carcaça consistirá de todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, com exceção da amostra de sangue retirada para análise hormonal e do perfil lipídico (3mL) e o gastrocnêmio esquerdo, retirado para análise de expressão gênica. O conteúdo gastrointestinal será limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça.

A carcaça dos animais será colocada em estufa aquecida a 70°C durante 48 horas a fim de secar todo o líquido dos mesmos. Após, será calculado o líquido corporal total subtraindo-se o peso final do peso antes do procedimento. Toda a carcaça seca será então picada, embrulhada em gaze e envolvida por papel filtro. Por meio da técnica de extração, com éter etílico como solvente, será removido todo o lipídio da carcaça, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. O restante da carcaça, sem umidade nem lipídio, será totalmente moído (moinho Ika Labortechnik M20). A amostra moída será peneirada, para a remoção dos pêlos que poderiam reduzir sua homogeneidade. Esse processo resultará em um pó uniforme, representando o conteúdo proteico de toda a carcaça. A proteína na carcaça será analisada por meio do método de Kjeldahl, método que fundamenta-se na destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de uma catalisador e por ação do calor, com posterior destilação e titulação do Nitrogênio proveniente da amostra. O percentual de nitrogênio encontrado será multiplicado pelo fator arbitrário 6,25, para obtenção do percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio aproxima-se de 16% do conteúdo proteico total.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS

O método a ser utilizado é o mais presente nos estudos sobre composição corporal, padrão alimentar e treinamento. O modelo animal deve ser usado, pois se necessita da coleta de tecidos para entender mecanismos biológicos como resposta ao método de intervenção utilizado. Ademais, o controle específico das propriedades da dieta e de fatores externos possíveis em estudos com modelos animais permitem maior confiabilidade dos resultados da pesquisa.

5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO

1 – O protocolo de treinamento de animais provoca estresse. Tendo em vista a minimização do stress, foi escolhido o protocolo de natação, pois o mesmo provoca apenas leve desconforto e não causa traumas físicos; como os animais serão previamente adaptados ao meio líquido e treinados em cargas abaixo do



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento de endurance na composição corporal e desempenho físico de ratos Wistar
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Vannucchi Portari
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 28/01/2015
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 337

limiar aeróbico, os riscos de afogamento são mínimos, mas caso ocorram dificuldades no nado e note-se afogamento, o animal será excluído da rotina de treino do dia, e caso persista, será determinada uma nova carga de treinamento, menor e de acordo com sua capacidade. Caso o animal não se adapte à rotina de treino, mesmo depois de prévia aclimatação e diminuição da carga de treino, o mesmo será retirado da pesquisa e eutanasiado por excesso de anestesia (Cetamina 225 mg/kg IP e. Xilazina 15 mg/kg IP).

2 – Aplicação de sonda gástrica de polietileno para gavagem de Glicose no teste de tolerância à glicose; em caso de acidentes como perfurações do esôfago ou estômago, o animal será imediatamente eutanasiado.

3 – Pequeno furo na extremidade distal da cauda para análise de glicemia e teste de lactato (Suficiente apenas para 1 gota de sangue); será aplicado fármaco analgésico (Cetoprofeno) como medida analgésica curativa após o procedimento.

6. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

1 – Pequeno risco de avulsão dos animais durante o manejo no treinamento e possível mordida. O mesmo é evitado através do treinamento dos colaboradores e manejo correto dos animais, a fim de evitar ao máximo o estresse dos mesmos.

2 – A fim de evitar contaminação do local de permanência dos animais e do pesquisador, o mesmo deverá utilizar equipamentos de proteção individual: calçado fechado, luvas de procedimento, jaleco e máscara descartável.

3 – Para evitar lesão por mordida do animal, ao realizar processos mais invasivos, como a gavagem, o cuidador utilizará luva de couro, evitando que o animal machuque-o.

7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo obedece aos princípios éticos para experimentação animal.

PARECER DA CEUA: Aprovado em 27/02/2015.

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).

Prof. Dr. Rosângela Soares Chriguer
Coordenadora da CEUA