

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Curso de Nutrição

**EFEITOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO AERÓBIO, REALIZADA NO
ESTADO ALIMENTADO OU EM JEJUM, SOBRE A SINALIZAÇÃO
CELULAR NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR
MACHOS SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Aluno:

Lucas Stahlhöfer Kowalewski

Porto Alegre, 2019

EFEITOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO AERÓBIO, REALIZADO EM ESTADO ALIMENTADO OU EM JEJUM, SOBRE A SINALIZAÇÃO CELULAR NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Lucas Stahlhöfer Kowalewski

Orientador: Prof. Dr. Maurício Krause

Coorientador: MSc. Éverton Lopes Vogt

Porto Alegre, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Kowalewski, Lucas Stahlhöfer

Efeitos de uma sessão de exercício aeróbio, realizada no estado alimentado ou em jejum, sobre a sinalização celular no músculo esquelético de ratos wistar machos submetidos a uma dieta hiperlipídica / Lucas Stahlhöfer Kowalewski. -- 2019.

42 f.

Orientador: Maurício da Silva Krause.

Coorientador: Éverton Lopes Vogt.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Exercício Aeróbio em Jejum. 2. Obesidade. 3. Exercício. 4. Jejum. 5. Dieta Hiperlipídica. I. Krause, Maurício da Silva, orient. II. Vogt, Éverton Lopes, coorient. III. Título.

RESUMO

Introdução e objetivos: De acordo com a OMS, a obesidade representa, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública mundial. Por trás de sua etiologia, encontram-se os maus hábitos dietéticos, como o consumo de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (HFD), a inatividade física, bem como fatores genéticos. Curiosamente, ainda que a prática regular de exercício físico seja *per si* uma potente ferramenta para o tratamento e combate da obesidade, estudos das últimas 2 décadas vêm propondo que esse, quando em associação ao jejum, poderia ser potencializado, assim promovendo efeitos benéficos adicionais em relação ao exercício em estado alimentado, como maior mobilização e oxidação lipídica, bem como adaptações moleculares superiores. Apesar de um número significativo de estudos demonstrarem resultados que corroboram tal hipótese, até o presente momento, poucos trabalhos avaliaram os efeitos do exercício em jejum sobre populações com sobrepeso/obesidade. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar os efeitos de uma sessão aguda de exercício de baixa intensidade, realizada em estado alimentado ou jejum (8h), após 12 horas de sua realização, sobre parâmetros bioquímicos e moleculares de ratos wistar machos obesos. **Métodos:** Ratos wistar machos (n=30) foram submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica, a fim de induzir obesidade e alterações metabólicas. Ao longo dessas, avaliou-se a evolução da massa corpórea, bem como a tolerância à glicose (através do O-GTT e IP-GTT). Após o período de dieta, os ratos foram alocados, por randomização, em diferentes grupos: 1) Alimentado sem exercício (ASE), n=8; 2) Jejum sem exercício (JSE), n=8; 3) Alimentado com exercício (ACE), n=7; 4) Jejum com exercício (JCE), n=7. O protocolo de exercício (~60% VO_{2max}) foi realizado em esteira, por 30 minutos. Após 12 horas, os animais foram eutanasiados, e os tecidos coletados (soro, fígado, sóleo e gastrocnêmio). As análises bioquímicas foram realizadas por ensaios colorimétricos e o imunoconteúdo determinado por *western blotting*. A estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida por Tukey. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.). **Resultados:** Conforme esperado, os animais aumentaram de peso ao decorrer da HFD, atingindo um quadro de obesidade (308,7 g ± 4,12 vs 497,4 g ± 9,06; p<0.0001). Além disso, quando comparados com animais saudáveis, os obesos apresentaram diferenças na resposta glicêmica (p<0.0009), sugerindo intolerância à glicose. No músculo esquelético, não houve alterações nas concentrações de glicogênio em nenhum dos grupos. Já no glicogênio hepático, observou-se uma diminuição no grupo ACE em comparação ao ASE (p<0.02). No gastrocnêmio, observou-se aumento no imunoconteúdo das proteínas SIRT-1 (p<0.005) e HSP70 (p<0.03) apenas no grupo JCE. No sóleo, também encontrou-se um aumento no imunoconteúdo das proteínas SIRT-1 (p<0.01) e HSP70 (p<0.009) somente no grupo JCE. Por último, interessantemente, observou-se uma redução nos níveis séricos de triglicerídeos (p<0.001) e colesterol (p<0.03) tão somente quando os animais se exercitaram em jejum (JCE). **Conclusões:** Uma sessão de exercício aeróbico de baixa intensidade, quando realizada em jejum, pode induzir, em ratos obesos e com disfunções metabólicas, adaptações benéficas para sua saúde, como melhorias em parâmetros bioquímicos e adaptações moleculares que perduram por, pelo menos, até 12 horas após seu término. Considerando o fato de que populações com sobrepeso/obesidade apresentam um risco aumentado para eventos/doenças cardiovasculares, reduções significativas em marcadores plasmáticos do metabolismo lipídico, como os resultados supracitados, constituem-se como um dos cruciais alvos de tratamento nelas.

ABSTRACT

Introduction and objectives: According to WHO, obesity represents one of the major global public health problems. Behind its aetiology, are poor dietary habits, such as the consumption of hypercaloric and hyperlipidic diets (HFD), physical inactivity, as well as genetic factors. Curiously, even know that the regular exercise is, *per se*, a strong tool for the treatment and prevention of obesity, recent studies suggests that the beneficial effects of exercise can be potentiated while fasting, thus promoting additional effects, in comparison to the fed state, such as higher lipid mobilization and oxidation, as well as superior metabolic adaptations. Despite the significant number of studies showing results that corroborate with such hypothesis, only a few research evaluated the effects of fasted-state exercise in overweight/obese populations. Therefore, the aim of this study was to evaluate the subacute effects (12 hours after its execution) of a single low-intensity exercise bout, performed on fed or fasted-state (8h), on biochemical and molecular parameters in obese male wistar rats. **Methods:** Male wistar rats (n=30) were submitted to a 12 weeks hyperlipidic diet, to induce obesity and metabolic disorders. Body weight and glucose tolerance (by using O-GTT and IP-GTT) were measured throughout the diet period. At the end of the diet period, the rats were allocated, by randomization, in different groups: 1) Fed control (FDC), n=8; 2) Fasting control (FSC), n=8; 3) Fed exercise (FDE), n=7; 4) Fasting exercise (FSE), n=7. The exercise protocol (~60% VO_{2max}) was performed in a treadmill, for 30 minutes. After 12 hours, the animals were killed, and the tissues collected (serum, liver, soleus and gastrocnemius). The biochemical analysis were performed through colorimetric assays and the immunocontent determined by western blotting. One-way ANOVA followed by Tukey was used to compare the results (expressed as mean \pm standard error (SE)). **Results:** As expected, animals increased their weight during HFD, reaching a obesity status (308,7 g \pm 4,12 vs 497,4 g \pm 9,06; $p < 0.0001$). In addition, when compared to healthy animals, the obese showed modifications on the glycemic response ($p < 0.0009$), suggesting glucose intolerance. In skeletal muscle, there were no differences in glycogen concentrations in neither group. In the liver, however, there was a decrease in FDE glycogen when comparing to FDC ($p < 0.02$). In gastrocnemius muscle, we observed an increased immunocontent of SIRT-1 ($p < 0.005$) and HSP70 ($p < 0.03$) only on FSE. In soleus muscle, we also observed an increase in SIRT-1 ($p < 0.01$) and HSP70 ($p < 0.009$), but only on FSE. Finally, an important reduction on seric levels of triglycerides ($p < 0.001$) and cholesterol ($p < 0.03$) were found when animals exercised in fasting conditions (FSE). **Conclusions:** An acute bout of low intensity aerobic exercise, when realized in fasting, may induce, in obese rats with metabolic dysfunctions, beneficial adaptations to their health, such as better biochemical and molecular adaptations that last, for at least, 12 hours. Considering the fact that overweight/obese populations present an increased risk for cardiovascular events/diseases, significant reductions in such plasma markers of lipid metabolism are an important achievement for this population.

SUMÁRIO

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. HIPÓTESE	9
4. OBJETIVOS	9
4.1 Objetivos Específicos	9
5. MATERIAIS E MÉTODOS	10
5.1 Delineamento	10
5.1 Cálculo Amostral	10
5.3 Animais	10
5.4 Procedimentos Experimentais	11
5.4.1 Protocolo Experimental	11
5.4.2 Indução à Obesidade	13
5.4.3 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) e Teste de Tolerância Intraperitoneal à Glicose (IP-GTT)	13
5.4.4 Análises Bioquímicas	15
5.4.5 Western-Blot	16
5.5 Aspectos Éticos	17
5.6 Análise Estatística	17
6. RESULTADOS	18
6.1 Massa Corporal	18
6.2 Glicemia e Testes de Tolerância à Glicose (O-GTT e IP-GTT)	20
6.3 Conteúdo de Glicogênio Hepático e Muscular	22
6.4 Imunoconteúdo de SIRT-1 e de HSP70 no Tecido Muscular	24
6.5 Trigliceridemia e Colesterolemia	24
7. DISCUSSÃO	28
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	36
9. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Associados ao atual estilo de vida moderno, encontram-se hábitos alimentares inadequados, como o consumo crônico de dietas hipercalóricas e alimentos hiperpalatáveis, e a inatividade física. Ao passo em que esses se estabelecem cada vez mais entre as distintas populações, a incidência mundial de obesidade cresce significativamente nas últimas décadas (OMS, 2017), caracterizando-se, atualmente, como um dos principais problemas de saúde pública mundial. Trazendo tal afirmação para dados numéricos, tem-se que, atualmente, pelo menos 1,9 bilhão de pessoas encontram-se com sobrepeso ao redor do mundo, sendo que destes, cerca de 650 milhões de indivíduos apresentam obesidade.

Paralelamente à obesidade, encontra-se instaurado um quadro de inflamação crônica de baixo grau (Uysal *et al.* 1997), evidenciado pela elevação plasmática crônica de citocinas pró-inflamatórias, tais quais interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), bem como uma diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e adiponectina.

Esse *status* inflamatório evidenciado em indivíduos obesos é, por sua vez, responsável por promover um desbalanço na homeostase redox, disfunções hormonais, como resistência à insulina e disfunção mitocondrial (Krause *et al.* 2015), assim impactando o metabolismo energético, além de alterar mecanismos hipotalâmicos responsáveis pelo controle do apetite, resultando em um aumento da ingestão alimentar, ao passo em que ocorre uma diminuição do gasto energético (Galic *et al.* 2010). Não obstante as inúmeras disfunções causadas pela obesidade *per se*, essa também encontra-se associada a um aumento no risco de doenças cardiovasculares (Huxley *et al.* 2010), diabetes *mellitus* tipo 2 (Crandall *et al.* 2008), hipertensão arterial, dislipidemia, doença hepática e renal, e alguns tipos de câncer (Farhat *et al.* 2010).

Sabe-se que o exercício físico é uma potente ferramenta não-farmacológica, capaz não somente de atenuar todas as consequências biológicas exercidas por tais doenças/distúrbios, como, inclusive, de preveni-las. Dessa forma, trabalhos publicados na literatura científica demonstram que a prática regular encontra-se associada a uma saúde cardiovascular melhorada, diminuição na resistência periférica à insulina (Lucini *et al.* 2011), melhora do perfil lipídico, aumento na

densidade mineral óssea, redução de sintomas relacionados à depressão, bem como uma diminuição nos riscos para desenvolvimento de doenças como câncer e diabetes *mellitus* tipo 2 (Cotman & Engesser-Cesar, 2002; Church, 2011).

Entre os mecanismos responsáveis pelos benefícios e melhorias em desfechos clínicos propiciados pelo exercício, encontra-se o aumento na atividade e na expressão gênica de inúmeras enzimas e proteínas celulares, propiciando, dessa forma, uma adaptação e reprogramação metabólica no organismo de seus praticantes.

Entre essas, pode-se destacar o aumento na atividade de um importante sensor do metabolismo energético celular, a AMPK (5' Proteína quinase ativada por AMP). Essa enzima encontra-se ativada sob situações de privação energética celular, como o exercício, quando os níveis de ATP encontram-se diminuídos e os de AMP elevados, sendo ela responsável, basicamente, por ativar vias catabólicas designadas para a produção energética - por meio, majoritariamente, do aumento no metabolismo oxidativo e na biogênese mitocondrial -, ao passo em que inativa vias anabólicas consumidoras de ATP, como a lipogênese (Cantó *et al.* 2009; Zang *et al.* 2004). A AMPK é também responsável pelo aumento na atividade da SIRT-1 (Sirtuína 1) - por meio do aumento nos níveis celulares de NAD oxidado, concomitante à diminuição dos níveis de NAD reduzido -, sendo essa enzima responsável pela desacetilação de inúmeros alvos regulatórios, dentre eles o PGC-1 α (Co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma), possibilitando, dessa forma, um aumento na biogênese mitocondrial, e, por conseguinte, uma melhoria ainda maior no sistema de produção energética celular. Por último, a ativação da AMPK é também importante para a captação, em miócitos e adipócitos, de glicose plasmática, uma vez que ela medeia a expressão e ativação da proteína AKT (Proteína quinase B), responsável, em última instância, pela translocação e exteriorização do transportador de glicose GLUT-4 (transportador de glicose 4) para as membranas celulares (Whiteman *et al.* 2002)

O exercício físico é também capaz de estimular a síntese de proteínas de choque-térmico - as HSP's (Proteínas de choque térmico), em especial a de 70 kDa -. Essa grande família de proteínas encontra-se relacionada a diversas funções celulares, dentre essas o controle da proteostase celular, através da sua atividade de chaperona molecular (Madden *et al.* 2008), podendo interagir com outras proteínas (desnaturadas, 'desnoveladas', assim como aquelas que não se

encontram na sua conformação nativa), com o propósito de impedir a formação de interações inapropriadas ou de agregados proteicos no citoplasma celular, bem como de auxiliar na marcação de proteínas que devem ser degradadas, além de auxiliar polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional adequada, e, portanto, a sua função biológica. A HSP70 (proteína de choque térmico de 70 kilodalton) encontra-se ainda relacionada a outras funções, como sua ação anti-apoptótica - por impedir a saída do citocromo C da mitocôndria -, bem como sua atividade anti-inflamatória (Homem de Bittencourt *et al.* 2007), exercendo-a, fundamentalmente, por bloquear a translocação do NF- κ B (fator de transcrição nuclear *kappa* b) para o núcleo celular, dessa forma cessando o processo inflamatório. Interessantemente, trabalhos publicados na última década (Chung *et al.* 2008; Rodrigues-Krause *et al.* 2012) demonstram não somente que os níveis dessa proteína encontram-se atenuados em pacientes que apresentam distúrbios/doenças de cunho inflamatório, tais quais obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, como, inclusive, sugerem que a indução de sua expressão, por meio da prática de exercício, por exemplo, seja um dos possíveis alvos terapêuticos capaz de proporcionar melhorias metabólicas para esses pacientes.

Ainda que o exercício físico seja reconhecido por induzir a ativação das vias metabólicas/moleculares acima mencionadas, não existe, até o presente momento, um consenso na literatura de qual o tipo de exercício, modalidade, intensidade e em que condições deva ser feito, para potencializar seus efeitos em pessoas obesas e com doenças metabólicas. Nos últimos anos, a prática de exercícios no estado de jejum tem ganhado espaço e popularidade. Por essa razão, decidimos investigar os efeitos desta prática em um modelo animal de obesidade/resistência à insulina.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, curiosamente, a prática de exercícios em jejum, em especial o aeróbio, vem se popularizando cada vez mais, não somente entre atletas de alto rendimento, como, inclusive, entre praticantes entusiastas, sob a prerrogativa de que esse promoveria uma maior oxidação lipídica, além de diversas adaptações metabólicas superiores, quando em comparação com o exercício realizado em estado alimentado. Embora essas questões já sejam alvo de interesse de alguns

grupos de pesquisa (Aird *et al.* 2018; Paoli *et al.* 2011; Vieira *et al.* 2016), ainda não há evidências científicas suficientes e robustas na literatura, sobretudo tratando-se de população com sobrepeso/obesidade, para corroborar, ou, até mesmo, para refutar os possíveis benefícios superiores propiciados por tal prática, tampouco trabalhos que avaliem os mecanismos responsáveis por suposta superioridade.

Além disso, uma vez que o jejum é capaz de ativar a via de indução das HSP70 (através das variações de NAD⁺/NADH e conseguinte ativação da SIRT-1, ativador de HSF-1 (fator de choque térmico 1), o fator de transcrição das proteínas de choque térmico), é possível que a prática do exercício em jejum possa potencializar a ativação das HSP70 induzida pelo exercício, o que resultaria em melhor sensibilidade à insulina e redução na inflamação.

3. HIPÓTESE

Espera-se que o exercício realizado em estado de jejum promova um aumento no imunoconteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, à biogênese mitocondrial, e à citoproteção, quando em comparação com o exercício realizado em estado alimentado.

4. OBJETIVOS

Investigar os efeitos subagudos (12 horas após) de uma única sessão de exercício aeróbio de baixa intensidade, realizada em estado alimentado ou jejum, sobre marcadores metabólicos no soro e o imunoconteúdo de proteínas musculares relacionados ao metabolismo celular e da via das proteínas de choque térmico em ratos machos obesos.

4.1 Objetivos Específicos

1) Induzir obesidade e resistência à insulina em ratos Wistar utilizando um modelo de dieta hiperlipídica;

2) Averiguar o efeito subagudos (12 horas após) de uma sessão de exercício aeróbio de baixa intensidade nos animais obesos sobre:

- as concentrações séricas de glicose, triglicerídeos e colesterol;
- as concentrações de glicogênio nos músculos gastrocnêmio e sóleo;
- a concentração de glicogênio no fígado;
- o imunoconteúdo de HSP70 nos músculos gastrocnêmio e sóleo;
- o imunoconteúdo de SIRT-1 nos músculos gastrocnêmio e sóleo

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento

O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa de caráter quantitativo, experimental, *in vivo*, com animais alocados em distintos grupos - controle e intervenção - por randomização.

5.1 Cálculo Amostral

O cálculo do tamanho amostral foi executado utilizando-se o *software* G*Power 3.1.9.2 (Schleswig-Holstein, Alemanha). No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro $\alpha=0,05$ e poder do teste estatístico igual a 0,80. Utilizou-se também como base para cálculo os resultados de protocolos experimentais de um dos laboratórios do departamento de Fisiologia da UFRGS (Cozer *et al.* 2017), com o qual se trabalhou em parceria no presente estudo. Assim, estimou-se um “n” total igual a 30 animais.

5.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar *Rattus norvegicus* provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade do Rio Grande do Sul, com 60 dias de idade. O biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, foi o local de alojamento

dos animais. Seguiu-se ao longo do estudo as condições padrão de biotério, como ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar de 70%, ração e água à vontade. As instalações utilizadas encontram-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (número 34271).

5.4 Procedimentos Experimentais

5.4.1 Protocolo Experimental

→ Os animais do presente estudo foram subdivididos em quatro grupos:

- 1) **Grupo obeso alimentado** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que não foram submetidos a jejum e/ou exercício;
- 2) **Grupo obeso + jejum** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que foram submetidos a 8h de jejum mas não realizaram exercício;
- 3) **Grupo obeso alimentado + exercício** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que não foram submetidos a jejum, e realizaram uma sessão de 30 minutos de exercício aeróbio;
- 4) **Grupo obeso + jejum + exercício** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que foram submetidos a 8h de jejum, e realizaram uma sessão de 30min exercício aeróbio em sequência.

Após o término dos respectivos protocolos experimentais, os animais voltaram às suas caixas, e tiveram acesso *ad libitum* à água e dieta hiperlipídica por um período de 12 horas. Ao término desse período, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecido muscular (sóleo + gastrocnêmio) e hepático, os quais foram analisados *a posteriori*. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato de esse ser um método eficaz, e que produz alterações fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra

substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com o protocolo do presente estudo, pois todos os anestésicos comumente utilizados em trabalhos com animais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown *et al.* 2005; Saha *et al.* 2005), o que pode se tornar um viés para o trabalho.

O **ÍNDICE DE SEVERIDADE** para a morte é **SEM RECUPERAÇÃO**. O **ÍNDICE DE SEVERIDADE** para manuseio e administração de dietas foi considerado como **LEVE**, já que os animais não foram forçados a nenhum outro tipo de intervenção além da dieta.

O protocolo experimental com exercício foi realizado após o período de aclimação dos animais à esteira, que consistiu em sessões de 15 minutos diários durante uma semana. O exercício físico consistiu em uma sessão aguda de 30 minutos na esteira, com uma intensidade de 60% VO_{2max} , conforme tabela 1 (Rodrigues *et al.* 2007). Ao término da realização do exercício agudo, os animais foram eutanasiados após 12 horas (tempo 12h), conforme figura 1, e seus tecidos foram coletados e armazenados a - 80°C, até o processamento das amostras. O **ÍNDICE DE SEVERIDADE** do exercício é considerado **MODERADO**, pois envolve exercício forçado aos animais. A figura 1 ilustra o desenho experimental de nosso estudo.

Tabela 1. Protocolo de aclimação e exercício físico baseado em Rodrigues *et al.* (2007).

Semana	Período de Aclimação			Sessão de Exercício			
	Tempo (min)	Velocidade (km/h)	Inclinação (%)	Tempo (min)	Intensidade	Inclinação (%)	Velocidade (km/h)
Semana 1 (5x/semana)	15	0,6	0	-----	-----	-----	-----
Semana 2 (Sessão única)	-----	-----	-----	30	60% $VO_{2máx}$	0	0,9

Experimento: Exercício aeróbio – Recuperação de 12h

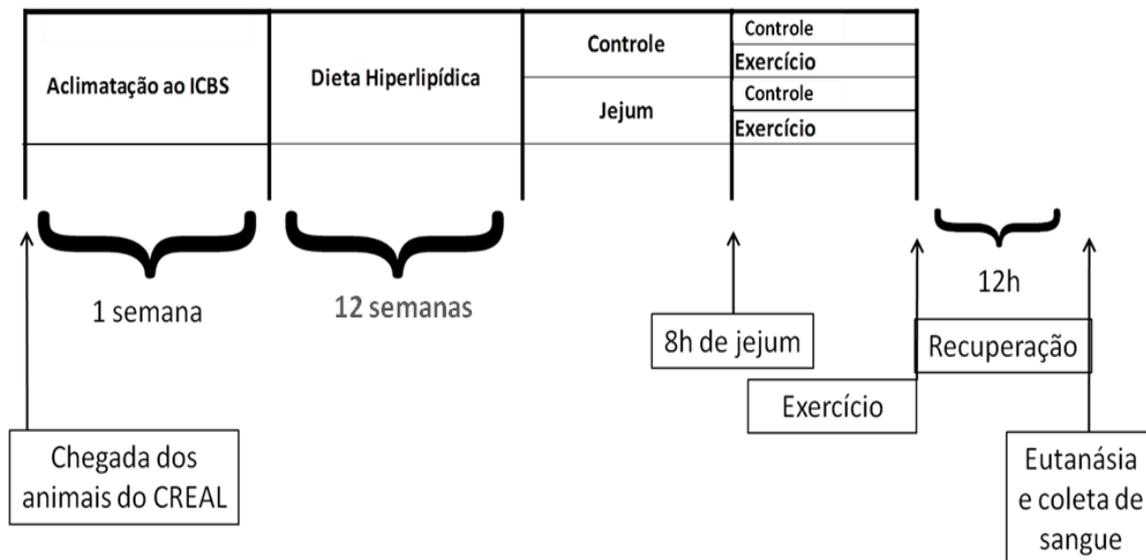


Figura 1. Desenho experimental para os grupos com 12h de recuperação.

5.4.2 Indução à Obesidade

A indução dos animais à obesidade foi realizada através de um tratamento com ração hiperlipídica, modificada em nosso laboratório, sendo sua composição de macronutrientes: 49% de carboidratos, 8,2% de proteínas e 31% de lipídios (dados referentes à dieta ainda não publicados). O **ÍNDICE DE SEVERIDADE** para a administração da dieta hiperlipídica é considerado **LEVE**, sendo que o animal, inclusive, apresenta preferência pela dieta por ser mais palatável (devido ao maior teor lipídico), apesar de causar obesidade e disfunções metabólicas com o passar do tempo.

5.4.3 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) e Teste de Tolerância Intraperitoneal à Glicose (IP-GTT)

A evolução de das alterações da glicemia foi confirmada por meio de teste oral de tolerância à glicose (O-GTT) e do Teste de Tolerância Intraperitoneal à

Glicose (IP-GTT). O índice de severidade para os testes, que envolvem a manipulação, gavagem/infusão de com solução de glicose e coleta de 5 amostras de sangue da cauda do animal (nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min após a gavagem de glicose) foi considerado moderado, pois envolveu repetidas intervenções no animal, apesar de quase indolores.

Os OGTT's e os IP-GTTs foram realizados a cada 14 dias sempre com os mesmos animais, tanto saudáveis (animais utilizados somente para fins comparativos) quanto obesos. Utilizou-se dez animais para a realização de ambos os testes. Todos os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas, o qual se iniciava às 7h da manhã, previamente aos testes. Para o OGTT, foi preparada uma solução de glicose a 50% (m/v) em água, administrada na concentração de 10 g/kg de peso corpóreo, por gavagem de cerca de 500 μ L de solução, conforme o peso de cada animal. O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da gavagem e da primeira coleta (tempo zero).

Para a realização do IP-GTT, foi preparada uma solução de glicose a 80% (m/v) em PBS (NaCl 136,8 mMol/L, KCl 2,7 mMol/L, KH₂PO₄ 0,9 mMol/L, Na₂HPO₄ 6,4 mMol/L), administrada na concentração de 1 g/kg de peso corpóreo, por injeção intraperitoneal de cerca de 50 μ L de solução, conforme o peso de cada animal. O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da primeira coleta (tempo zero).

O sangue para a análise da glicemia nos tempos acima descritos foi coletado com o auxílio de um lancetador automático (tipo caneta) com grau de profundidade calibrável (Accu-Chek modelo MultiClix, Roche). Para tanto, amostras de cerca de 1 μ L de sangue da parte distal da cauda do animal foram coletadas. As medidas de glicemia foram feitas usando aparelho de leitura glicêmica capilar (glicosímetro) On Call Plus, Acon Laboratories Inc. Para comparação dos resultados entre os grupos foi utilizado o cálculo da área sob a curva (AUC). Os valores e cálculos foram gerado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 6. Foram incluídas as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero) para o cálculo da AUC.

5.4.4 Análises Bioquímicas

As amostras de sangue foram preparadas para processamento através de centrifugação por cinco minutos a 1000 g (temperatura ambiente). As concentrações de substratos séricos, como glicose, colesterol e triglicerídeos foram quantificadas por métodos enzimáticos com *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA) em 10 μ L de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimentos de ondas específicos para cada substrato: 1) glicose e triglicerídeos: 505nm; 2) colesterol: 500nm. Os resultados de glicose, triglicerídeos e colesterol foram expressos em miligramas.decilitros⁻¹ de soro.

Em relação às quantidades de glicogênio dos tecidos, realizou-se a extração e quantificação de glicogênio dos tecidos conforme descrito por Inohara *et al.* (2015). Amostras de tecidos foram depositadas em tubos plásticos com capacidade para 15mL contendo 0,5 mL de KOH 30%, e submetidas à digestão em banho fervente por 60 minutos. Para a precipitação do glicogênio, foram adicionados aos tubos uma gota de Na₂SO₄ saturado e 1mL de álcool etílico 96% e, em seguida, centrifugadas por dez minutos a 800 g. Terminada essa etapa, os tubos foram invertidos para que fosse descartado o sobrenadante. O glicogênio foi ressuspenso com 0,5mL de água destilada e adicionou-se 1mL de álcool etílico 96% para que fosse centrifugado novamente por dez minutos a 800 g. Mais uma vez os tubos foram invertidos para o descarte do sobrenadante. Para a hidrólise ácida do glicogênio, este foi novamente ressuspenso com 0,5mL de água destilada. Em novos tubos, essa suspensão foi diluída 3 vezes e foram acrescentados 0,3mL de HCl 4N para novo banho fervente por mais 60 minutos. Após as amostras esfriarem em temperatura ambiente, estas foram neutralizadas com 0,3mL Na₂CO₃ 2M. Após a hidrólise ácida, a glicose resultante foi quantificada pelo método enzimático da glicose-oxidase com o *Kit* Glicose Liquiform (Labtest Diagnóstica SA) em 10 μ L de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505nm. Uma curva padrão de glicogênio (1mg/mL) foi utilizada como fator de calibração e os resultados foram expressos em miligramas de glicogênio.grama de tecido⁻¹.

5.4.5 Western-Blot

Para a separação das proteínas, utilizou-se o método SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), com uma concentração de poliacrilamida de 10%. Aproximadamente 20µg de proteína (concentração determinada por *kit* BCA, Thermo Fisher Scientific) extraída das amostras de tecido muscular foram incubados com solução de Laemmli (Laemmli, 1970), e adicionados em cada poço do gel para eletroforese. O equipamento utilizado foi o mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (BioRad, EUA). Depois de efetuada a eletroforese, retirou-se o gel de poliacrilamida das placas de vidro, e esse foi colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (NC), coberto com tampão de transferência. A transferência foi realizada no sistema Trans-Blot SD – Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, EUA) por 2 horas e meia, a uma diferença de potencial de 100V.

A fim de confirmar o sucesso dos procedimentos descritos acima, corou-se as membranas com *Red Ponceau S* (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%), e, logo após, essas foram descoradas com solução *Tween Tris Buffer Saline* – TTBS (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 Mm, adicionados de Tween 0,1%). As membranas de NC contendo as proteínas foram então incubadas durante meia hora em solução de BSA 2% (Albumina de soro bovino). Esta solução é responsável por saturar sítios de ligação inespecíficos na membrana de NC. Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, vinte horas, a 4°C, sob agitação constante com os anticorpos (números do catálogo H5147: *HSP70*; SAB2501994: *SIRT1*; Sigma Aldrich) para as proteínas específicas, diluídos em TTBS (*Tween Tris Buffer Saline*) adicionado de BSA 0,1% (Albumina de soro bovino). Após a incubação com o anticorpo primário, lavou-se as membranas por 3 vezes com TTBS 1X e então incubou-se com o anticorpo secundário (número do catálogo A9044: *Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit - IgG fraction of antiserum, buffered aqueous solution - Sigma Aldrich*) por, pelo menos, duas horas à temperatura ambiente. Logo após, as membranas foram novamente lavadas com TTBS por 3 vezes (*Tween Tris Buffer Saline*), e incubadas com solução de quimiluminescência por cerca de 1 minuto. A reação de quimiluminescência se deu por meio do sistema de detecção baseado em

substratos luminescentes (utilizado *kit* comercial Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific). Após a incubação com a solução de quimiluminescência, as membranas de NC foram reveladas no equipamento (Amersham Pharmacia Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens Image Quant 350 com software Image Quant TL 7.0 para Windows. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica pelo uso do programa Image J (Frederich, Maryland, USA), e os dados foram apresentados como unidades arbitrárias (UA) da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas normalizadoras (*Red Ponceau*).

5.5 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Pesquisa e Ética desta universidade, e estiveram em comprometimento com a perturbação mínima do bem-estar dos animais submetidos ao protocolo experimental, conforme a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (número 34271).

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (e.p.m.). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (para comparação dos grupos HFD com controles, OGTT e ipGTT, ao longo da dieta) e de uma via (para comparação entre os grupos ao final da intervenção), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5% ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

Conforme descrito na seção de materiais e métodos, o presente estudo conta com quatro grupos experimentais distintos, respectivamente:

- 1) **Grupo obeso alimentado** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que não foram submetidos a jejum e/ou exercício;
- 2) **Grupo obeso + jejum** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que foram submetidos a 8h de jejum mas não realizaram exercício;
- 3) **Grupo obeso alimentado + exercício** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que não foram submetidos a jejum, e realizaram uma sessão de 30 minutos de exercício aeróbio;
- 4) **Grupo obeso + jejum + exercício** – animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, que foram submetidos a 8h de jejum, e realizaram uma sessão de 30min exercício aeróbio em sequência.

Os resultados que serão apresentados a seguir são a média de cada um dos grupos \pm e.p.m. Para cada um dos parâmetros analisados, apresentar-se-á um gráfico correspondente, a fim de se visualizar melhor os dados. A ordem visual desses segue a descrição do protocolo experimental supracitada. Os resultados de massa corporal, teste de tolerância oral à glicose (OGTT) e teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IP-GTT) foram obtidos ao longo das semanas da intervenção dietética (HFD). Todos os outros resultados foram obtidos após a morte dos animais, ou seja, 12 horas após o término da sessão aguda de exercício (para os animais exercitados) e o mesmo tempo para os animais que permaneceram em repouso.

6.1 Massa Corporal

A figura 2 mostra o comportamento do peso de todos os animais (n=30) ao longo das 12 semanas de dieta hiperlipídica.

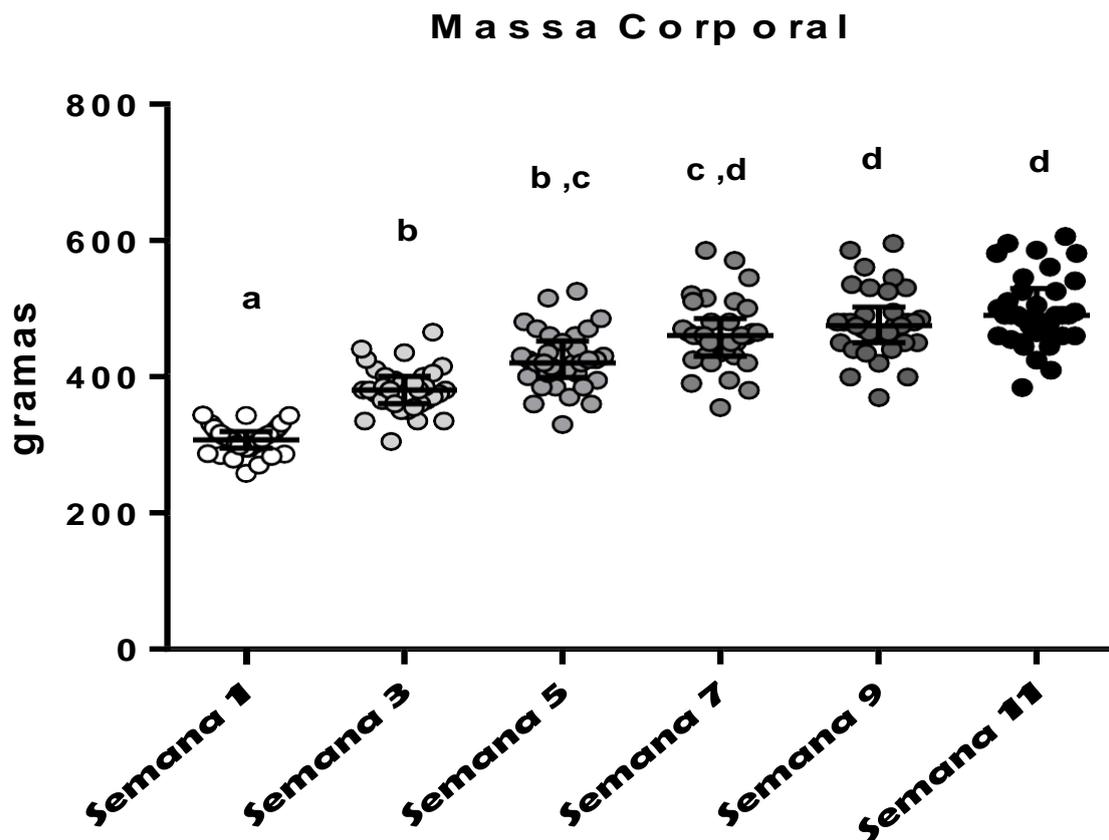


Figura 2. Comportamento do peso de todos os animais (n=30) ao longo das 12 semanas de dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Grupamentos de letras distintos representam significância estatística ($p < 0.05$).

De acordo com aquilo que se esperava, os ratos do presente estudo apresentaram um ganho de peso significativo ao longo do tratamento com dieta hiperlipídica (HFD). A partir do primeiro ponto aferido em relação ao basal (3ª semana), diferenças estatisticamente significativas já foram encontradas no que tange ao ganho de peso dos animais. Esse incremento significativo na massa corpórea total deles ocorreu também na 5ª e 7ª semanas, e perdurou até a 9ª semana de dieta, a partir da qual não mais se notou mudanças no comportamento do peso dos animais.

Tomando como base nossos resultados demonstrados acima, pode-se afirmar que o protocolo de dieta hiperlipídica desenvolvido e aplicado no presente

estudo foi eficaz em induzir obesidade nos animais, em conformidade com o proposto.

6.2 Glicemia e Testes de Tolerância à Glicose (O-GTT e IP-GTT)

Os resultados de glicemia, OGTT e IPGTT podem ser visualizados nas figuras 3 e 4, respectivamente.

Conforme demonstrado na figura 3, a glicemia não variou de forma significativa entre os grupos. No entanto, como pode ser observado nas figuras 4 e 5, a sensibilidade à insulina parece reduzida nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica, quando comparados com animais saudáveis com dieta padrão (dados obtidos pelo nosso laboratório em outros experimentos, e utilizados aqui com propósitos meramente comparativos). De fato, ao final das 12 semanas, os animais submetidos a HFD apresentavam-se, visivelmente, intolerantes à glicose.

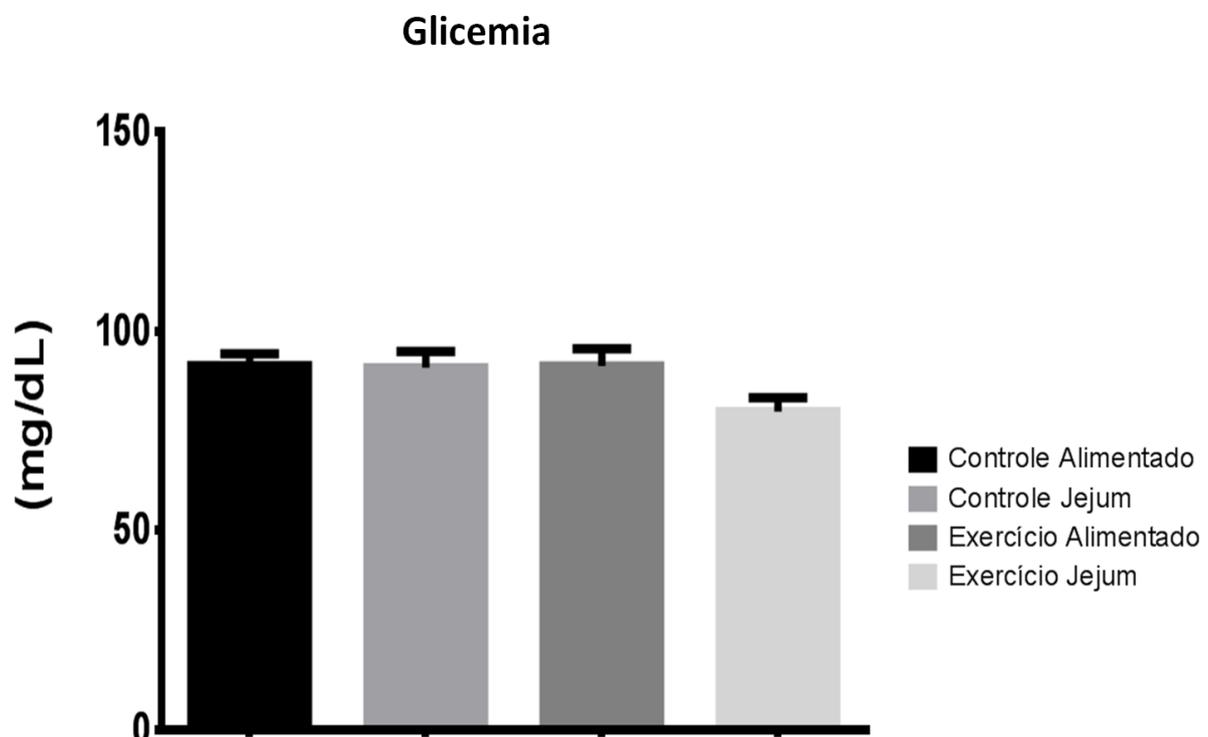


Figura 3. Glicemia em jejum. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

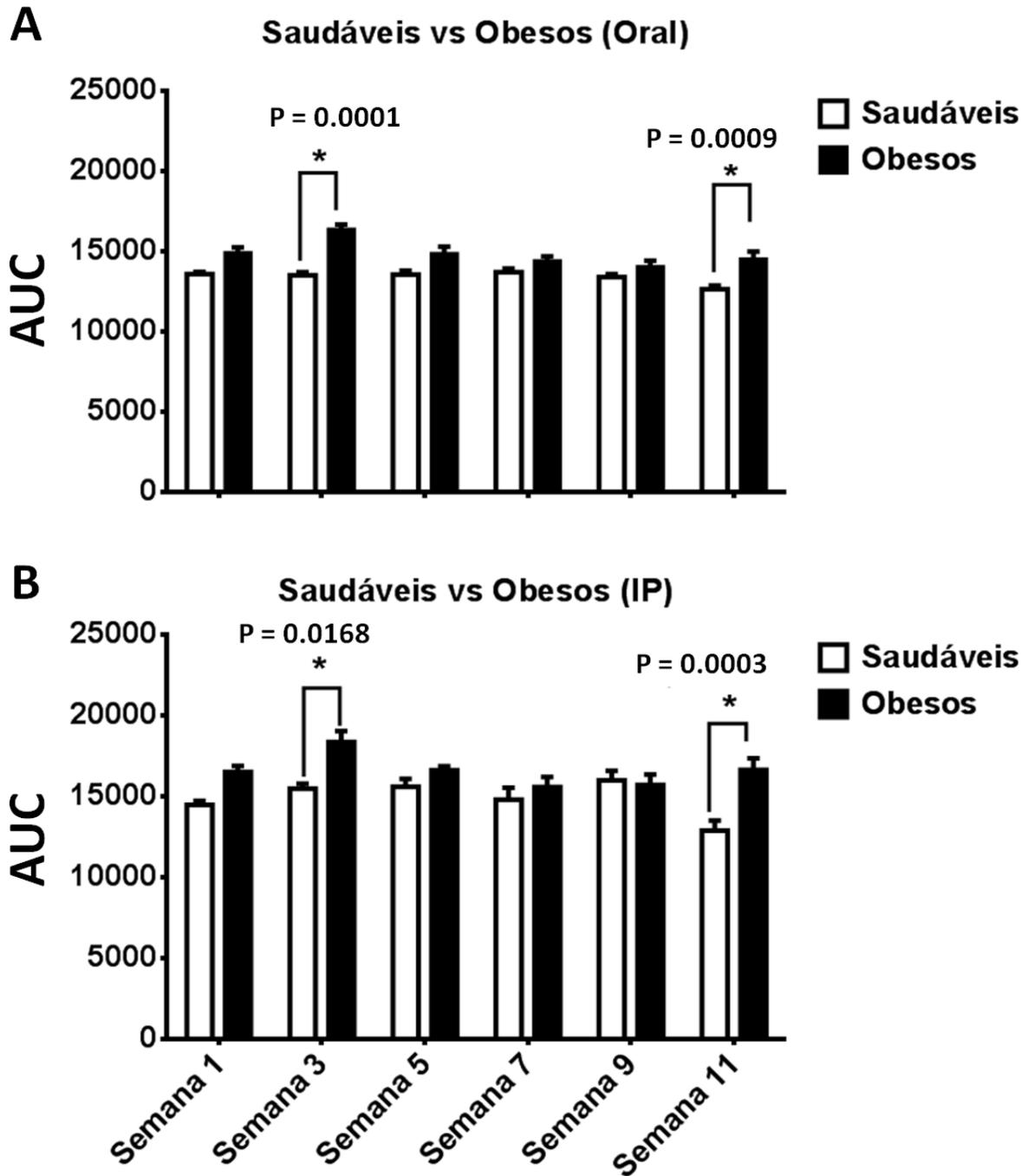


Figura 4. Resultados do OGTT (A) e ipGTT (B). Evolução na área sob a curva (AUC) da resposta glicêmica ao longo das 12 semanas de dieta hiperlipídica (n=10). Animais saudáveis utilizados tão somente para fins comparativos com aqueles que receberam a HFD. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas no grupo HFD em relação a animais saudáveis ($p < 0.05$).

6.3 Conteúdo de Glicogênio Hepático e Muscular

Os resultados da quantificação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio e sóleo) podem ser visualizados nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente. Como pode-se observar, doze horas após o término da intervenção (exercício ou repouso), o glicogênio hepático apresentou redução significativa apenas no grupo alimentado que realizou o exercício, em relação ao seu controle.

O conteúdo de glicogênio muscular, tanto no músculo gastrocnêmio quanto no sóleo, seguiram o mesmo comportamento. Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, o glicogênio muscular dos animais exercitados apresentou uma tendência à redução no grupo exercitado em jejum.

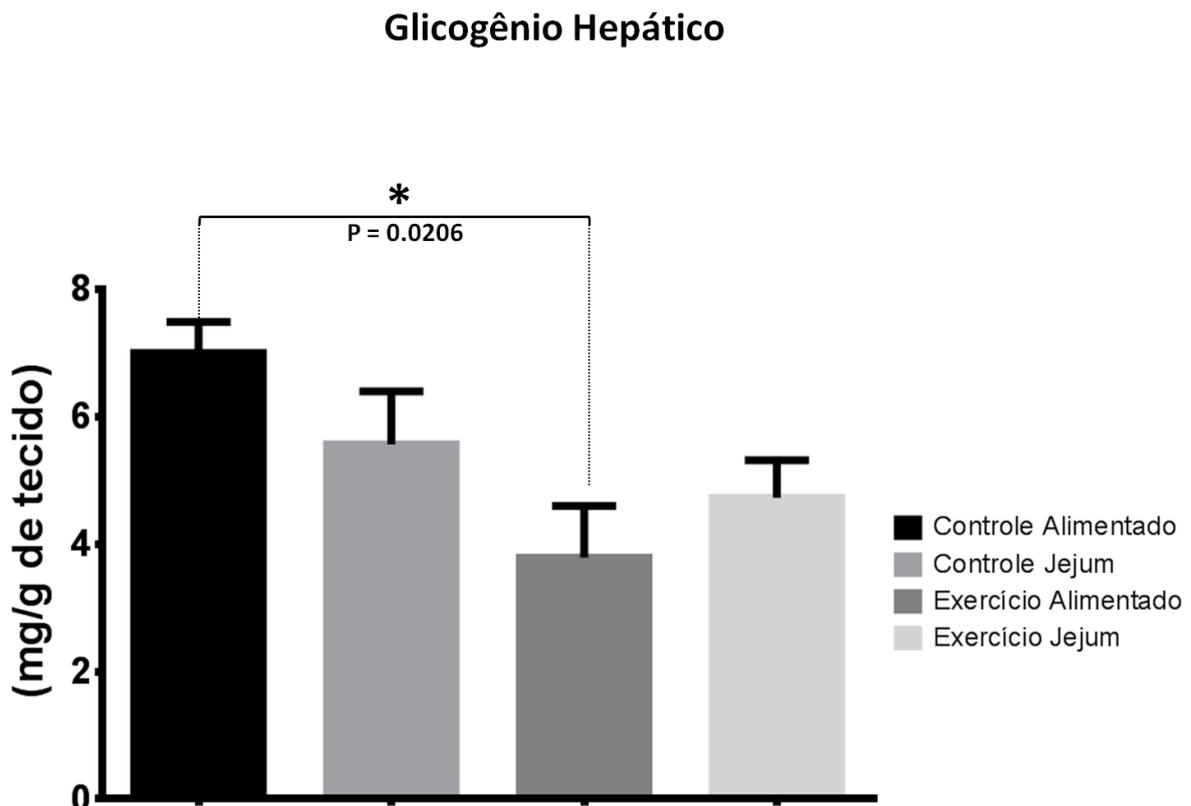


Figura 5. Conteúdo de glicogênio hepático. Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Glicogênio Gastrocnêmio

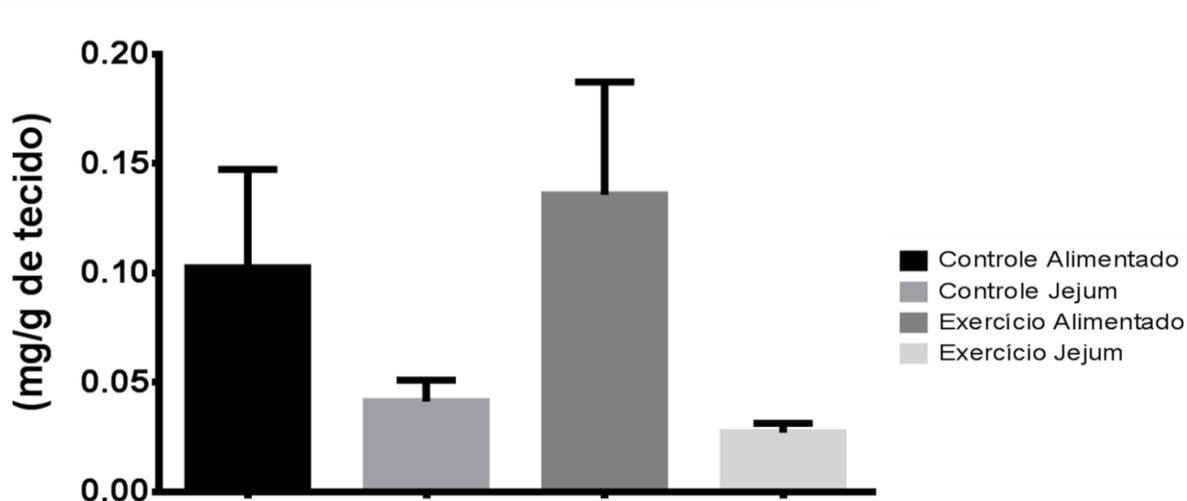


Figura 6. Conteúdo de glicogênio muscular (gastrocnêmio). Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Glicogênio Sóleo

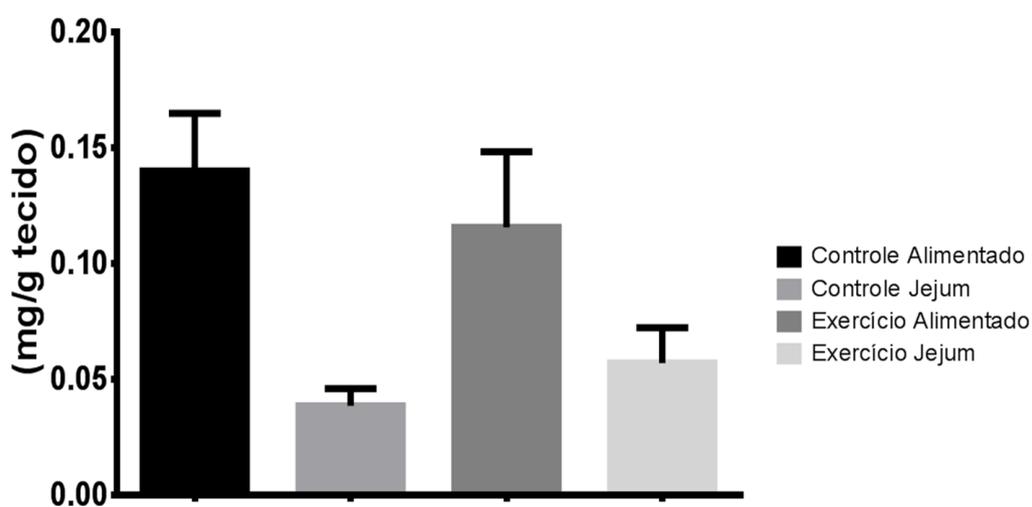


Figura 7. Conteúdo de glicogênio muscular (gastrocnêmio). Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.4 Imunoconteúdo de SIRT-1 e de HSP70 no Tecido Muscular

Ao analisar o imunoconteúdo das proteínas SIRT-1 e HSP70 no tecido muscular, nossos resultados demonstraram um comportamento similar nos músculos gastrocnêmio e sóleo. No caso do gastrocnêmio, é possível observar que a expressão de HSP70 aumentou nos animais exercitados em jejum, e houve uma tendência para o mesmo comportamento no exercício em estado alimentado ($p < 0.057$), embora diferenças estatisticamente significativas não tenham sido encontradas. No entanto, não foi detectado, ao menos no tempo estudado (12 horas), variações na expressão de SIRT-1 no grupo alimentado (tanto em repouso quanto após o exercício). De fato, o imunoconteúdo de SIRT-1 só encontra-se elevado nos animais que fizeram exercício no estado de jejum (Figura 8).

No músculo sóleo, predominantemente composto por fibras de características oxidativas, observamos que os animais que se encontravam no estado de jejum e que foram submetidos ao exercício, aumentaram a expressão de SIRT-1 e, de forma similar, de HSP70. Nossos dados sugerem que o exercício físico, realizado em jejum, possibilita a manutenção da elevada expressão de SIRT-1 e HSP70 por até doze horas (12h) após sua execução. Esse resultado é expressivo, uma vez que essas proteínas participam de vias metabólicas e anti-inflamatórias importantes.

6.5 Trigliceridemia e Colesterolemia

Nossos resultados demonstraram, de forma interessante, que os animais em jejum, que foram submetidos ao exercício aeróbio de baixa intensidade, apresentaram reduzidas concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol total, mesmo doze horas após a sua realização. Além disso, no caso do colesterol total, o grupo jejum + exercício apresentou concentrações reduzidas quando comparado tanto com seu controle (jejum sem exercício), como, inclusive, com os animais alimentados e exercitados. Nossos dados sugerem efeitos metabólicos importantes, os quais parecem ser mantidos mesmo 12 horas após o término da atividade.

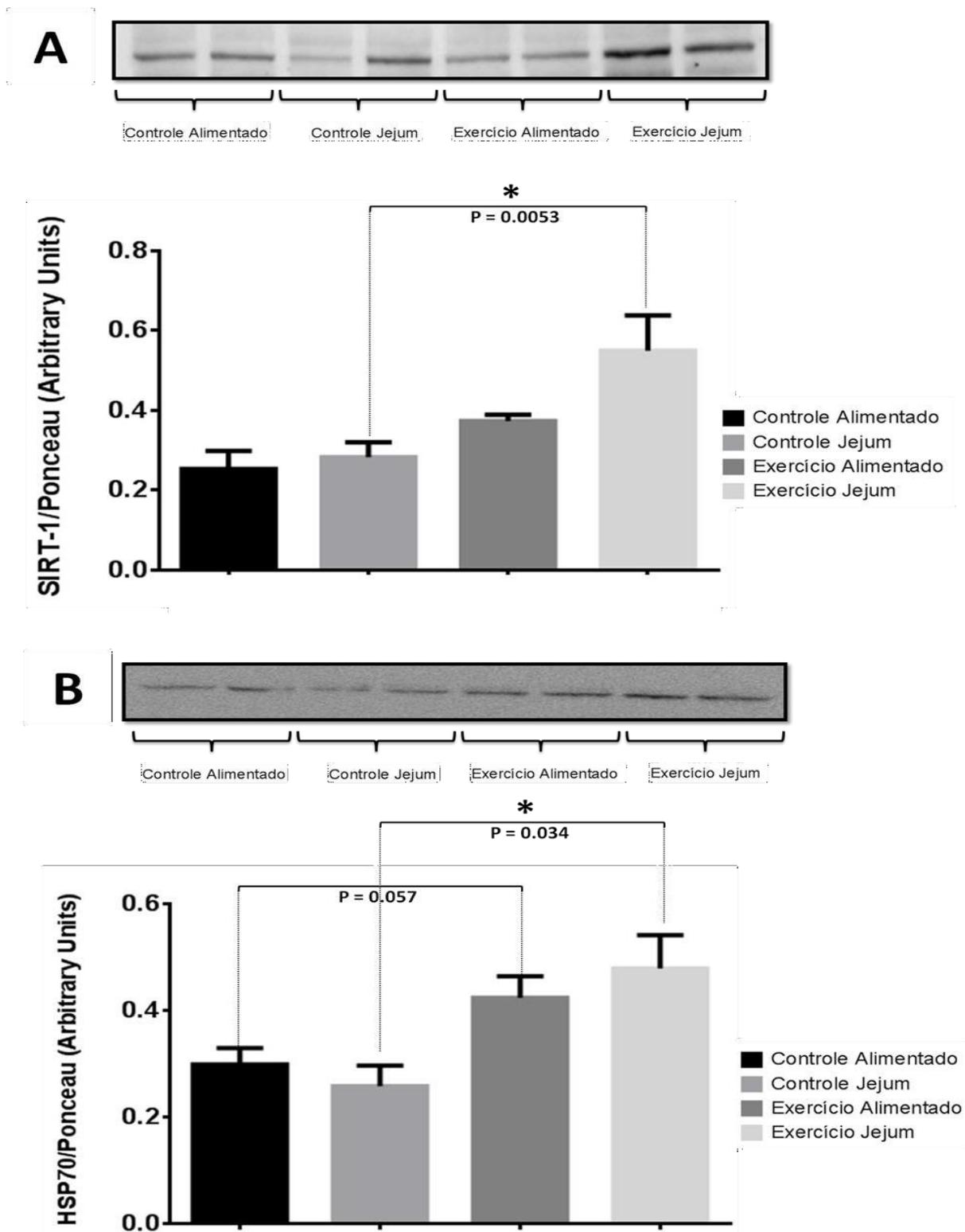


Figura 8. Imunoconteúdo de SIRT-1 (A) e de HSP70 (B) muscular (gastrocnêmio) normalizado por *Red Ponceau*. Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

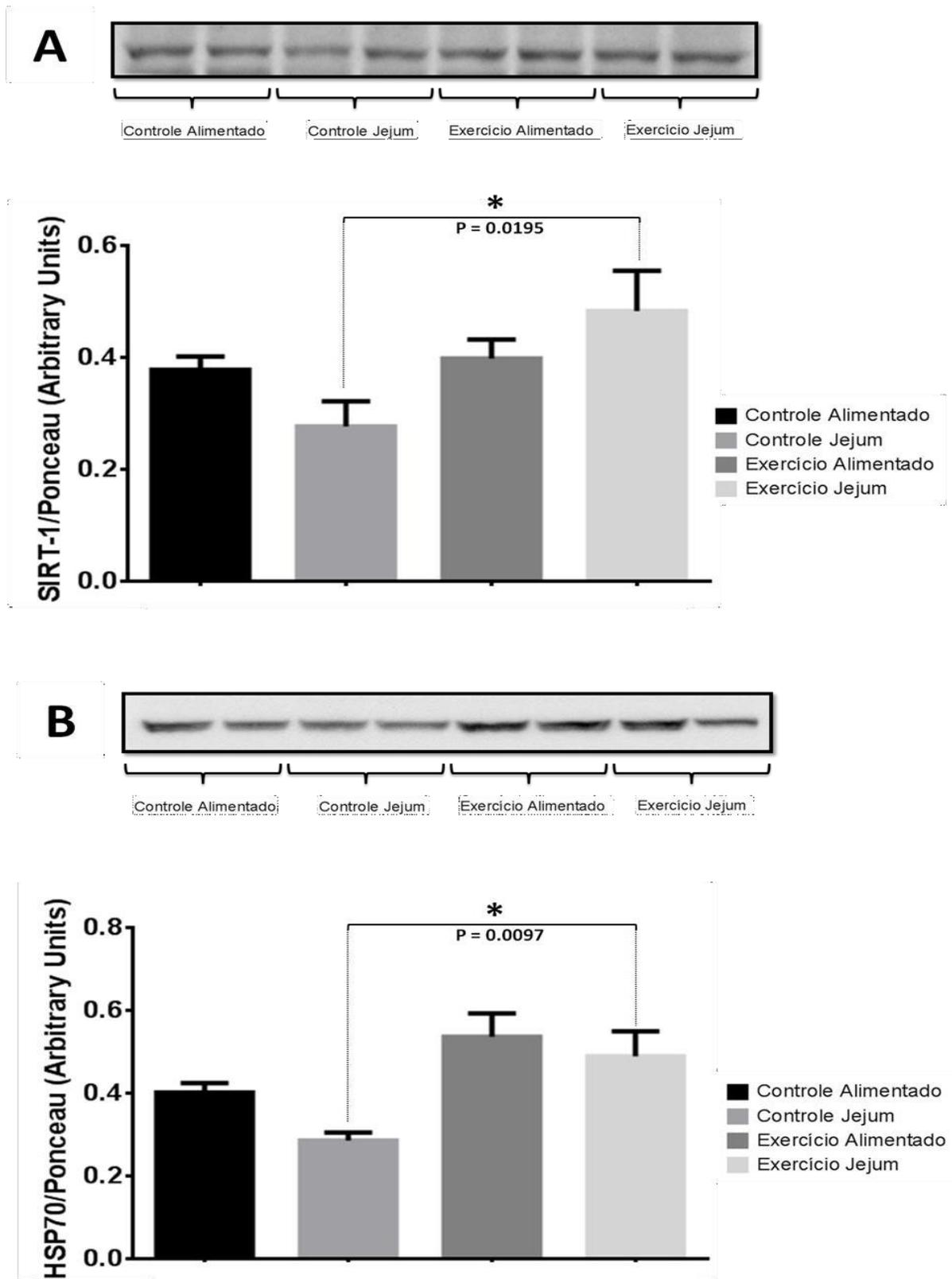


Figura 9. Imunoconteúdo de SIRT-1 (A) e de HSP70 (B) muscular (sóleo) normalizado por *Red Ponceau*. Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

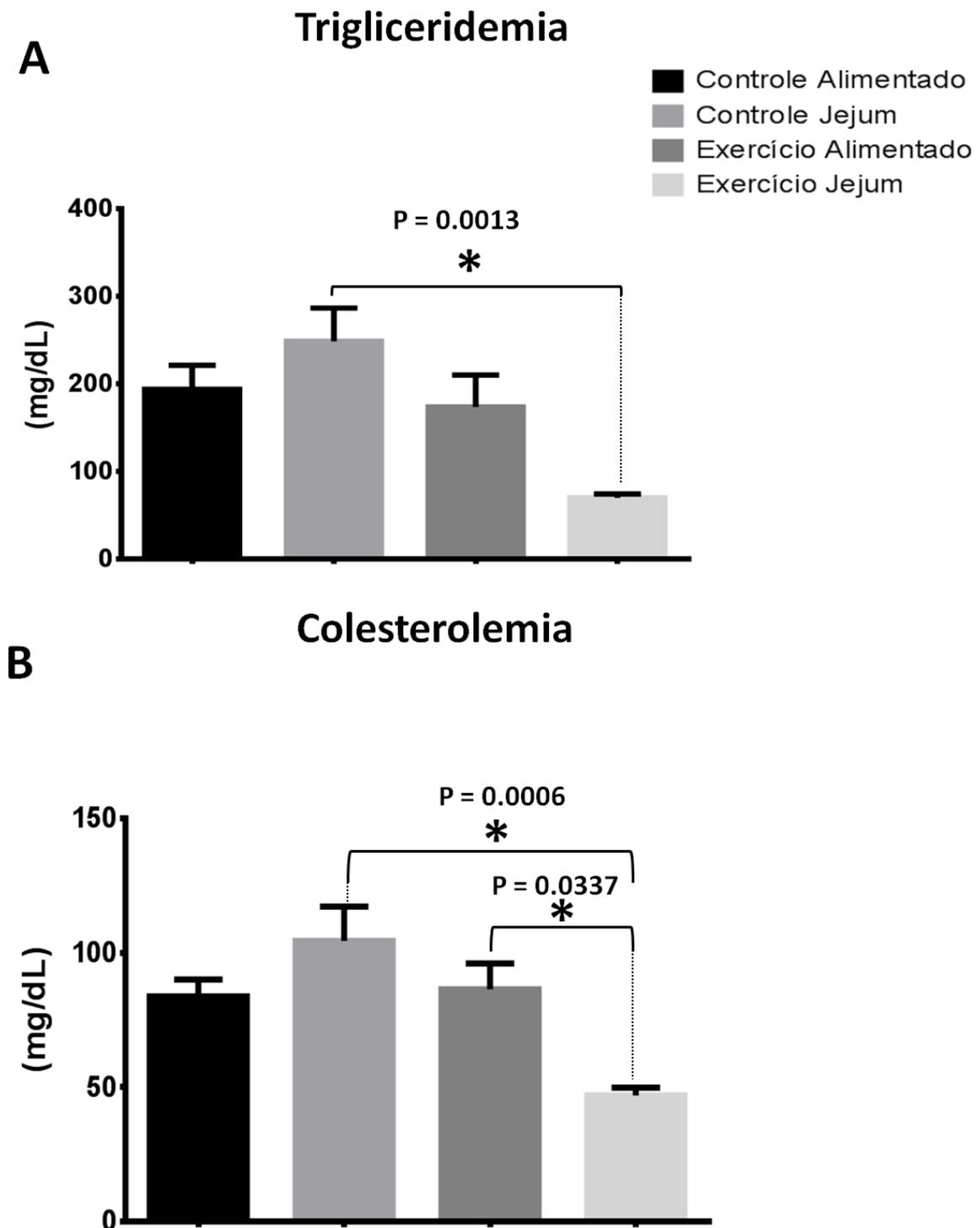


Figura 10. Trigliceridemia e Colesterolemia. Quantificação de triglicerídeos e colesterol total no soro dos animais, 12 horas após o término do exercício ou período de repouso. Dados expressos em média \pm epm. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. *representa diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

7. DISCUSSÃO

Os resultados do nosso estudo indicam que, em ratos obesos, a realização de exercício aeróbio de baixa intensidade, no estado de jejum, induz alterações subagudas (de até doze horas após o término da atividade) na expressão de proteínas (imunoconteúdo) no tecido muscular (HSP70 e SIRT-1), e que estas mudanças são seguidas também de importantes alterações metabólicas, como foi o caso da redução significativa dos triglicerídeos e colesterol séricos. A mudança metabólica que, aparentemente, perdurou por até 12 horas, é de extrema importância, uma vez que estes parâmetros estão diretamente ligados ao risco de dano cardiovascular.

Conforme apresentado na seção de resultados (figura 2), a dieta hiperlipídica (HFD) implementada no presente estudo foi eficiente em induzir obesidade nos animais. Interessantemente, com o protocolo de dieta desenvolvido em nosso laboratório (composta de 49% de carboidratos, 8,2% de proteínas e 31% de lipídios; formulação completa não descrita na presente monografia devido à dieta ainda não estar publicada), já com 3 semanas de intervenção notou-se um ganho de peso significativo ($p < 0.03$), o que perdurou em ascensão até a 9ª semana, a partir da qual não obteve-se mais diferenças no ganho de peso.

Esse rápido e significativo ganho de peso ocorre, majoritariamente, devido à maior densidade energética fornecida por HFD's quando em comparação a dietas balanceadas em sua distribuição de macronutrientes. Além do maior fornecimento energético relativo, no entanto, há também de se considerar o fato de que dietas hiperlipídicas são mais palatáveis, o que desencadeia um maior estímulo ao sistema de recompensa hipotalâmico, por conseguinte uma maior liberação de neurotransmissores associados a sensações de prazer e bem-estar na fenda sináptica, como serotonina e dopamina, que, em associação a falhas no processo de ativação de grupamentos de neurônios anorexígenos, como POMC/CART, conduz, em última instância, a um padrão de comportamento alimentar hiperfágico (Stubbs RJ & Bell EA, 2004).

Além da eficiência de nossa dieta em induzir um ganho exacerbado de peso ao longo do tratamento ($p < 0.0001$), também se observou, no presente estudo, alterações comuns decorrentes do processo de obesidade, como piora na tolerância

à glicose/aumento na resistência à insulina (Figura 4). Encontra-se bem estabelecido na literatura que a obesidade aumenta o risco para doenças de caráter inflamatório/metabólico, como resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Crandall *et al.* 2008). Curiosamente, no presente trabalho, quando analisamos apenas a glicemia de jejum dos ratos, observou-se que essa encontrava-se, independentemente do grupo, em faixas correspondentes a animais saudáveis. Esse fenômeno, no entanto, pode ser explicado por uma compensação exercida por altos níveis circulantes de insulina (ainda não mensurados). Apesar de os níveis séricos desse hormônio ainda não terem sido dosados, especulamos fortemente que de fato estejam em concentrações elevadas em relação a parâmetros saudáveis, pois quando avaliou-se a tolerância à glicose nos animais ao final do tratamento com HFD, independentemente do método (através de O-GTT ou IP-GTT), foi encontrado um significativo aumento na área sob a curva de sua resposta glicêmica ($p < 0.0009$ e $p < 0.0003$, respectivamente) em comparação a animais saudáveis, sugerindo, portanto, uma diminuição na sensibilidade à insulina/intolerância à glicose.

Devido ao seu potente efeito anti-inflamatório, a prática regular de exercício físico constitui-se como uma das principais e mais eficientes estratégias de tratamento de doenças de caráter inflamatório, como a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2). Entre alguns dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios proporcionados pelo exercício, encontram-se: 1) diminuição da massa adiposa visceral (com conseqüente redução na liberação de adipocinas pró-inflamatórias); 2) ativação aguda do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático, levando a uma inibição do TNF- α pelos monócitos; 3) liberação de miocinas pelo músculo esquelético, como IL-6, responsáveis por induzir efeitos anti-inflamatórios (\downarrow TNF- α , \uparrow IL-1RA); 4) redução nas taxas de infiltração de macrófagos no tecido adiposo, bem como mudanças de um fenótipo predominantemente M1 para M2; 5) aumento da capacidade antioxidante, dessa forma levando a uma menor ativação de fatores pró-inflamatórios, como o NF- κ B; 6) aumento na expressão de proteínas de choque térmico (HSP70), sendo essas, *per sí*, anti-inflamatórias.

Uma vez que o jejum, isoladamente, é também responsável por modular algumas dessas respostas, como a diminuição da massa adiposa visceral, ativação do eixo HPA, bem como um aumento na expressão de HSP70, sugere-se que a

prática em concomitância ao exercício possa exacerbar essa resposta, dessa forma, inclusive, promovendo efeitos benéficos mais intensos, como uma diminuição mais robusta no quadro de inflamação, bem como uma melhora nas vias de sinalização relacionadas ao metabolismo energético.

Em relação às concentrações de glicogênio, nossos resultados demonstram que, tratando-se de tecido hepático (Fig. 5), apenas quando os animais realizaram exercício no estado alimentado houve uma redução em suas concentrações comparando ao seu controle ($p < 0.02$). Esse resultado nos sugere que, possivelmente, ao realizar o exercício em estado alimentado, o animal dependa mais de glicogenólise hepática a fim de manter a glicemia em níveis adequados, uma vez que a prática nessas condições, diferentemente do exercício em jejum, utiliza-se mais da via glicolítica para a geração de energia (glicose advinda do glicogênio muscular e, posteriormente, da circulação sanguínea), e não de lipídios (lipólise seguida de β -oxidação), como o exercício em jejum. Considerando que a prática de exercício em jejum, na intensidade realizada, não utiliza majoritariamente a via glicolítica para a produção energética (devido aos baixos estoques de glicogênio muscular), faz sentido supor que, em decorrência da ativação mais intensa de vias lipolíticas (e por conseguinte uma diminuição na captação, através de GLUT-4, da glicose localizada na circulação), haja uma diminuição nas taxas de glicogenólise hepática em relação ao exercício alimentado (conseqüentemente uma alteração menor nas concentrações de glicogênio hepático, conforme nossos resultados demonstram), uma vez que a glicose presente na circulação é menos captada para posterior oxidação.

Por outro lado, no que diz respeito às concentrações de glicogênio no gastrocnêmio e sóleo, diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas em nenhuma das intervenções. No entanto, conforme os gráficos demonstram (Figuras 6 e 7), houve uma nítida tendência, em ambos os tecidos, para a diminuição nas concentrações do grupo exercitado em jejum em relação ao exercício em estado alimentado. Em decorrência dessa possível diminuição, espera-se, como consequência, por exemplo, uma eventual redução nas quantidades de energia disponível nas células musculares (demonstrada através, por exemplo, de aumento nas relações AMP/ATP e NAD⁺/NADH), o que, além de promover maior mobilização das reservas de triacilglicerol advindas do tecido adiposo, desencadeia a ativação de vias metabólicas responsáveis pela regulação do metabolismo, como

a das sirtuínas (em especial SIRT-1), que levará, posteriormente, a ativação da HSR (resposta ao choque térmico).

Especialmente com o aumento nas razões de NAD⁺/NADH, promovido em ambientes de deprivação energética celular, como o exercício físico ou restrição calórica, por exemplo, uma importante proteína deacetilase, denominada sirtuína-1 (SIRT-1), passa a encontrar-se ativa. Como sua principal função, encontra-se a remoção de grupamento acetil de certas proteínas regulatórias do metabolismo, como o PGC-1 α , responsável, em última instância, quando deacetilado, por um aumento na biogênese mitocondrial, proporcionando uma maior eficiência na produção energética. Além disso, essa proteína é um dos constituintes da importante via de choque térmico, responsável, em último grau, pela síntese das proteínas de choque térmico (HSP70, por exemplo).

Sob situações de estresse celular, como a diminuição na disponibilidade energética, o fator de transcrição das proteínas de choque térmico (HSF-1) se desliga das HSP70, deixando seu estado monomérico. A partir disso, o HSF-1 se trimeriza, sofre fosforilações em seus resíduos de serina, passando, então, a encontrar-se em seu estado ativo. Esse complexo, finalmente, vai até o núcleo da célula, mais especificamente no HSE (elemento de choque térmico), onde se liga, e dá início ao processo de transcrição do mRNA das HSP70. Interessantemente, a SIRT-1 possui um importante papel sobre a HSR (resposta ao choque térmico): essa proteína celular é responsável por manter o HSF-1 ligado à sua região promotora no núcleo celular (HSE) por mais tempo, por mantê-lo em sua forma deacetilada. Essa ação, por sua vez, poderá gerar um aumento ainda mais significativo na expressão das HSP70 (Figura 11).

Curiosamente, cada vez mais trabalhos da literatura têm descrito uma importante relação da expressão adequada de HSP70 com a preservação e melhora da sensibilidade à insulina (Geiger, 2011; Karpe, 2014). Na realidade, como previamente discutido no início do trabalho, essa relação torna-se ainda mais evidente quando indivíduos sob um quadro de inflamação crônica de baixo grau, como sujeitos obesos e com DMT2, apresentam uma expressão de HSP70 diminuída (Rodrigues-Krause *et al.* 2012). Entre os mecanismos responsáveis pela ação dessa proteína sobre a melhora na via de sinalização da insulina, um deles parece consistir no bloqueio da degradação do I κ B (quinase I κ B), dessa forma

impedindo a dissociação do NF- κ B desse complexo (NF- κ B-I κ B), e assim, consequentemente, bloqueando sua translocação até o núcleo da célula, o que, em última instância, leva a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias, consequentemente a um menor quadro de inflamação. Além disso, a HSP70 possibilita uma melhor interação da insulina com seu receptor (IRS-1) no músculo esquelético, devido a sua ação inibitória sobre a JNK, uma proteína celular que, em seu estado ativado, é responsável por fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS) em resíduos de serina, o que conduz a uma piora na via de sinalização desse hormônio.

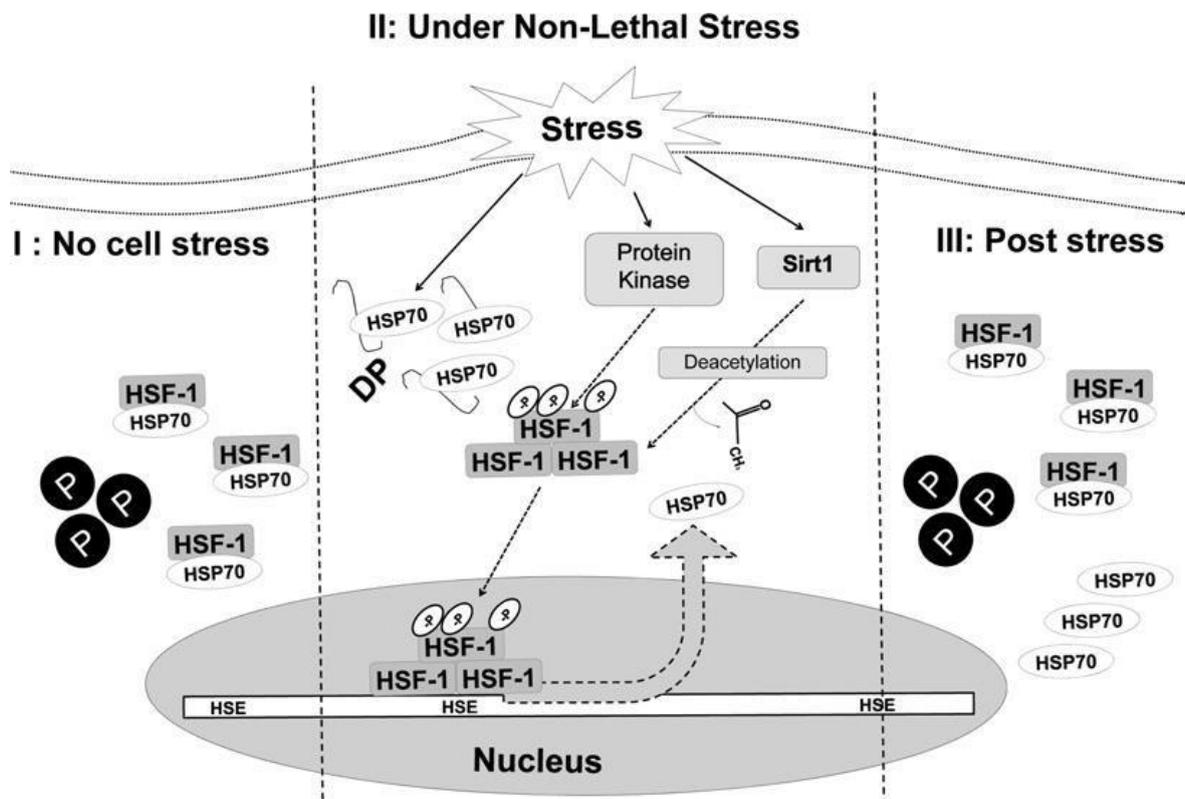


Figura 11. Ativação da resposta ao choque térmico. Consulte o texto para explicação. Fonte: Artigo “*The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes*” publicado na revista *Clinical Science*, em 2015, por Krause *et al.*

Até o presente momento, de acordo com nosso conhecimento, nenhum estudo publicado na literatura avaliou o comportamento da via de choque térmico

(SIRT-1/HSP70) sob efeito do exercício realizado em estado de jejum, mesmo em populações saudáveis. Nesse trabalho, interessante, encontramos que, ao avaliar-se 12 horas após a realização do exercício, apenas quando os animais se exercitaram em jejum, a expressão dessas 2 proteínas, em ambos os tecidos, permaneceu elevada de forma significativa em relação aos seus controles. Apesar de ser muito bem descrito na literatura que o exercício físico, independentemente do estado nutricional em que ocorra, encontra-se relacionado com o aumento no imunoconteúdo de HSP70, nesse estudo não encontramos tal efeito. Acreditamos que alguns fatores podem estar por trás de tal fenômeno, como: 1) devido ao protocolo de exercício implementado ser de baixa intensidade, o estímulo fornecido por esse pode não ter sido 'estressor' (do ponto de vista da deprivação metabólica + geração de calor) o suficiente para promover um aumento no conteúdo da proteína; 2) o fato de, 12 horas após o exercício, não se ter encontrado diferenças significativas não significa que essas não tenham ocorrido em outros momentos. Sabe-se, por exemplo, que o pico de expressão das HSP70 ocorre por cerca de 8 horas pós-intervenção. Assim, pode ser que o exercício no estado alimentado também tenha promovido um aumento na expressão dessa proteína, apenas não tenha perdurado por tanto tempo como o exercício em jejum.

De qualquer maneira, o mais interessante nos nossos resultados é que, aparentemente, o jejum foi capaz, conforme hipotetizado anteriormente, mesmo em população obesa, de intensificar as respostas promovidas pela prática do exercício físico, como as modulações exercidas sobre as adaptações moleculares do tecido muscular. Desse modo, ao realizar exercício em estado de jejum, parece haver uma maior ativação do HSF-1 e conseqüente ligação desse ao seu elemento no DNA, o que provavelmente deve-se ao fato de, em virtude da maior deprivação energética promovida pela associação de ambas intervenções (jejum + exercício), a atividade da SIRT-1 estar aumentada. Como conseqüência disso, o HSF-1 é deacetilado, permanecendo mais tempo ligado ao seu elemento no DNA da célula, aumentando, dessa forma, a transcrição das HSP70.

Considerando o potente efeito anti-inflamatório exercido pela HSP70, além de seus benefícios metabólicos, como diminuição na resistência à insulina, sugerimos que esse aumento mais prolongado em sua expressão, quando comparado com o estado alimento, pode ser crucial para populações sob influência de um *status* inflamatório, como obesos e sujeitos resistentes à insulina. Ainda mais importante do

que apenas as adaptações moleculares encontradas nesse trabalho, ao que tudo indica essas parecem produzir alterações bioquímicas periféricas, como uma importante diminuição nos níveis séricos de triglicérides e colesterol. Isso, por sua vez, se traduz em um real benefício para essa população, uma vez que reduções nesses parâmetros encontram-se relacionadas a um menor dano e risco cardiovascular (Nordestgaard BG, 2016).

Além disso, apesar de ainda não ter sido quantificado, uma vez que a expressão e atividade da SIRT-1 encontraram-se aumentadas no grupo exercício em jejum, especulamos também que proteínas responsáveis pelo controle do metabolismo, como PGC-1 α e AMPK, apresentem uma expressão elevada nesse tipo de intervenção. Isso, se confirmado, também poderia ser de fundamental importância para esse tipo de população, uma vez que uma ativação mais robusta dessas vias encontra-se relacionada a uma eficiência energética aumentada, bem como a melhorias em parâmetros bioquímicos.

Por último, conforme ilustrado na figura 12, sugerimos o mecanismo pelo qual o exercício, no estado de jejum, poderia estar intensificando as respostas metabólicas e moleculares encontradas no presente trabalho. Apesar de ainda altamente especulativo, o próximo passo de nossa pesquisa é verificar outras alterações nas vias metabólicas/moleculares sugeridas que corroborem com a nossa hipótese.

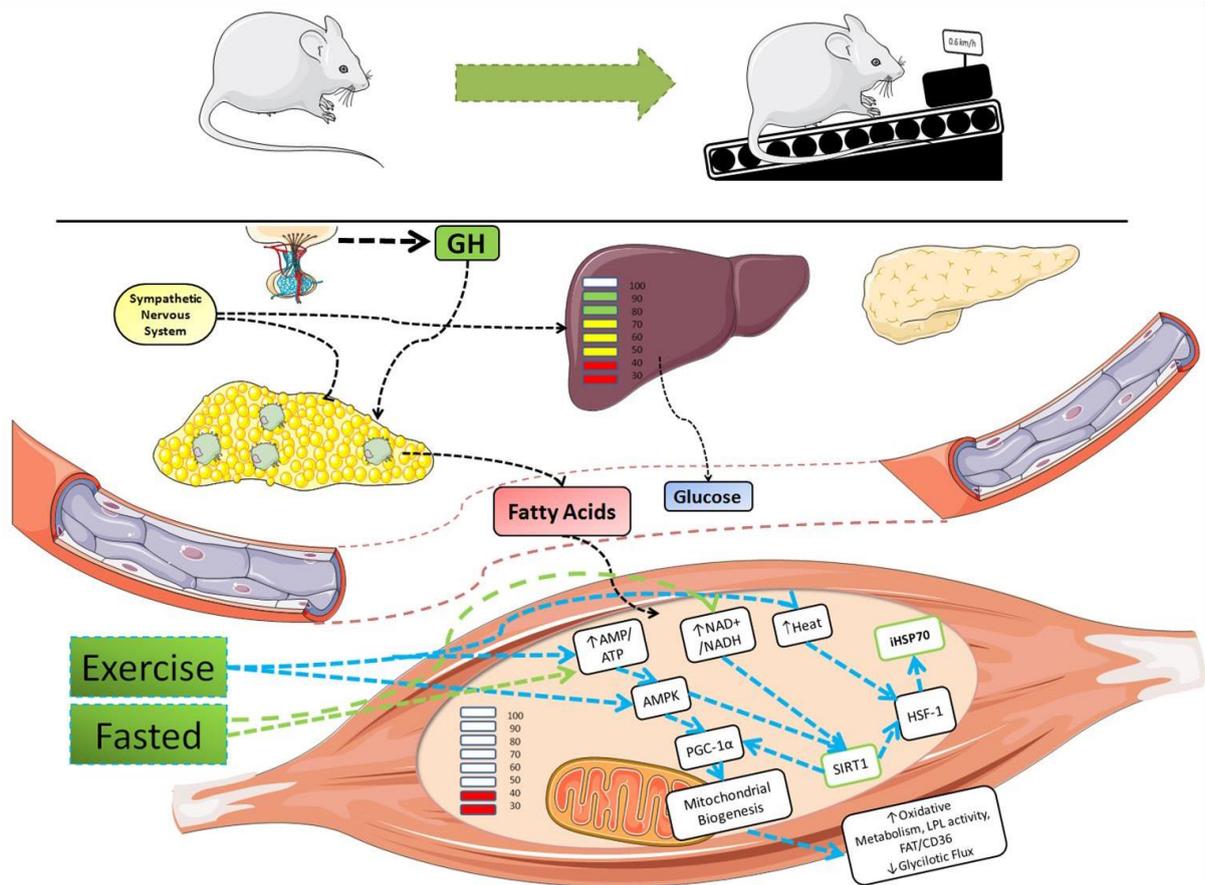


Figura 12. Mecanismo proposto/hipótese. Com o objetivo de manter a glicemia dentro da normalidade, as catecolaminas, juntamente com o hormônio do crescimento (GH)*, são liberados para promover lipólise no tecido adiposo e, no caso das catecolaminas, também a glicogenólise hepática. A elevada concentração de ácidos graxos na circulação aumenta sua captação pelo músculo, diminuindo a utilização de glicose, e assim, apresentando um efeito "poupador de glicose" (iniciado, por exemplo, pelo ciclo de Randle, além de ativação/modificação de diversas enzimas). O estado de jejum causaria mudanças nas razões de (\uparrow) AMP/ATP e (\uparrow) NAD/NADH, culminando em 1) Ativação de AMPK e 2) SIRT-1, ambas proteínas ativadoras de PGC-1 α . A ativação destas enzimas impulsionaria o metabolismo para uma predominância oxidativa, em especial de ácidos graxos. Ao mesmo tempo, a ativação de SIRT-1 ativaria o HSF1, fator de transcrição chave para induzir a síntese de HSP70. Esses mecanismos poderiam estar ativos durante o jejum, no entanto, após as doze horas, onde o animal retorna a se alimentar, os mecanismos seriam atenuados. O exercício físico, que induz efeitos similares aos do jejum (em termo das vias de sinalização apontadas aqui), quando realizado no estado de jejum, levaria a uma resposta muito mais elevada e duradoura, uma vez que o jejum, *per se*, teria sensibilizado previamente essas vias de sinalização. Além disso, o exercício resulta em aumentos na temperatura muscular, o que colaboraria para a intensificação das respostas observadas,

aumentadas mesmo depois de 12 horas. * Outros hormônios e fatores metabólicos também serão modificados. ** O mecanismo descrito/sugerido aqui é altamente especulativo, e ainda necessita de diversas análises para se confirmar.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conforme nossos resultados sugerem, uma sessão de exercício aeróbio de baixa intensidade, quando realizada em jejum, pode induzir, em ratos obesos e com disfunções metabólicas, adaptações benéficas para sua saúde, como melhorias em parâmetros bioquímicos e adaptações moleculares que perduram por, pelo menos, até 12 horas após a sua realização. Considerando o fato de que populações com sobrepeso/obesidade apresentam um risco aumentado para eventos/doenças cardiovasculares, a principal causa de mortalidade mundial, reduções significativas em marcadores plasmáticos do metabolismo lipídico, como os resultados obtidos no presente trabalho, constituem um crucial alvo de tratamento.

Como perspectivas, além de finalizar as análises de insulinemia e das proteínas musculares restantes (AMPK, PGC-1 α e HSF-1), realizaremos mais experimentos avaliando os mesmos parâmetros bioquímicos e moleculares em outros momentos pós-exercício nessa população de animais (como 0, 6 e 24 horas após o exercício), a fim de obter uma melhor compreensão do comportamento exercido por uma sessão de exercício aeróbio em jejum ao longo de 24 horas.

9. REFERÊNCIAS

Aird TP, Davies RW, Carson BP. *Effects of fasted vs fed-state exercise on performance and post-exercise metabolism: A systematic review and meta-analysis*. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, Reino Unido, v. 28, n. 5, p. 1476-1493, maio 2018.

Berger M, Hagg SA, Goodman MN, Ruderman NB. *Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition*. Biochemical Journal, Reino Unido, v. 158, n. 2, p. 191-202, ago. 1976.

Bernardis LL, Patterson BD. *Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions*. Journal of Endocrinology, Reino Unido, v. 40, n. 4, p. 527-528, abr. 1968.

Borge G. Nordestgaard. *Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology*. Circulation Research, Estados Unidos, v. 118, n. 4, p. 547-563, fev. 2016.

BRASIL. Decreto-lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 out. 2008. Seção 1, p. 1-4.

Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R. *Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice*. Visual Neuroscience, Reino Unido, v. 22, n. 5, p. 615-618, set-out. 2005.

Cantó C, Hines ZG, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P & Auwerx J. *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT activity*. Nature Letters, Reino Unido, v. 458, p. 1056-1060, abr. 2009.

Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestril R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA. *HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences, Estados Unidos, v. 105, n. 5, p. 1739-1744, fev. 2008.

Church, T. *Exercise in obesity, metabolic syndrome, and diabetes*. Progress in Cardiovascular Diseases, Estados Unidos, v. 53, n. 6, p. 412-418, mai-jun. 2011.

Cotman CW, Engesser-Cesar C. *Exercise enhances and protects brain function*. Exercise and Sport Sciences Reviews, Estados Unidos, v. 30, n. 2, p. 75-79, abr. 2002.

Cozer AG, Trapp M, Martins TL, De Fraga LS, Marques CV, Model JFA, Schein V, Kucharski LC, Da Silva RSM. *Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue*. Biochimie, França, v. 138, p. 50-55, jul. 2017.

Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, Haffner SM, Hoskin M, Nathan DM, *and the Diabetes Prevention Program Research Group*. *The prevention of type 2 diabetes*. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, Reino Unido, v. 4, n. 7, p. 382-393, jul. 2008.

Farhat T, Iannotti RJ, Simons-Morton BG. *Overweight, obesity, youth, and health-risk behaviors*. American Journal of Preventive Medicine, Holanda, v. 38, n. 3, p. 258-267, mar. 2010.

Francisqueti FV, do Nascimento AF, Corrêa CR. *Obesidade, inflamação e complicações metabólicas*. Nutrire, Brasil, v. 40, n. 1, p. 81-89, abr. 2015.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. Journal of Biological Chemistry, Estados Unidos, v. 226, n. 1, p. 497-509, maio 1957.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. *Adipose tissue as an endocrine organ*. Molecular and Cellular Endocrinology, Irlanda, v. 316, n. 2, p. 129-139, mar. 2010.

Geary N, Langhans W & Scharrer E. *Metabolic concomitants of glucagon-induced supression of feeding in the rat*. American Journal of Physiology, Estados Unidos, v. 241, n. 5, p. 330-335, nov. 1981.

Geiger, Paige C.; Gupte, Anisha A. *Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity*. Exercise and sport sciences reviews, Estados Unidos, v. 39, n. 1, p. 34-42, jan. 2011.

Homem de Bittencourt PI Jr, Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AM, Baldissera LP, Janner DR, Peralta JS, Bock PM, Gutierrez LL, Scola G, Heck TG, Krause MS, Cruz LA, Abdalla DS, Lagranha CJ, Lima T, Curi R. *LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, Irlanda, v. 193, n. 2, p. 245-258, ago. 2007.

Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. *Body mass index, waist circumference and waist: hip ratio as predictors of cardiovascular risk - a review of the literature*. European Journal of Clinical Nutrition, Inglaterra, v. 64, n. 1, p. 16-22, jan. 2010.

Inohara ET, Pinto CB, Model JF, Trapp M, Kucharski LC, Da Silva RS, Vinagre AS. *Serotonin effects in the crab Neohelice granulata: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues*. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, Estados Unidos, v. 185, p. 80-90, jul. 2015.

Karpe, Pinakin Arun; Tikoo, Kulbhushan. *Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling*. Diabetes, Estados Unidos, v. 63, n. 3, p. 1124-1139, mar. 2014.

Krause M, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. *The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes*. Clinical Science, Inglaterra, v. 128, n. 11, p. 789-803, jun. 2015.

Krause M, Heck TG, Bittencourt A, Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. *The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effects of exercise, and the implications for clinical management*. Mediators of Inflammation, Estados Unidos, v. 2015, n. 249205, p. 1-12, 2015.

Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, Inglaterra, v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970.

Lucini D & Pagani M. *Exercise: Should it matter to internal medicine?*. European Journal of Internal Medicine, Holanda, v. 22, n. 4, p. 363-370, ago. 2011.

Madden LA, Sandström ME, Lovell RJ, McNaughton L. *Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise*. Amino Acids, Áustria, v. 34, n. 4, p. 511-516, maio 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Obesity and overweight*. Suíça, out. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

Paoli A, Marcolin G, Zonin F, Neri M, Sivieri A, Pacelli QF. *Exercising fasting or fed to enhance fat loss? Influence of food intake on respiratory ratio and excess postexercise oxygen consumption after a bout of endurance training*. International

Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, Estados Unidos, v. 21, n. 1, p. 48-54, fev. 2011.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. *Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats.* Cardiovascular Diabetology, Inglaterra, v. 6, n. 38, p. 1-7, dez. 2007.

Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P, Collieran G. *Diverge of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?* Cell Stress and Chaperones, Holanda, v. 17, n. 3, p. 293-302, maio 2012.

Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. *Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models.* Experimental Biology and Medicine, Inglaterra, v. 230, n. 10, p. 777-784, nov. 2005.

Souza SK, Martins TL, Ferreira GD, Vinagre AS, Silva RS, Frizzo ME. *Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex.* Metabolic brain disease, Estados Unidos, v. 28, n. 1, p. 25-32, mar. 2013.

Stubbs RJ & Whybrow S (2004) *Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans.* Physiology & behavior, Estados Unidos, v. 81, n. 5, p. 755–764, jul. 2004.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.* Nature, Inglaterra, v. 389, p. 610–614, out. 1997.

Van Handel E. *Estimation of glycogen in small amount soft tissue.* Analytical Biochemistry, Estados Unidos, v. 11, n. 2, p. 256-265, maio 1965.

[Vieira AF](#), [Costa RR](#), [Macedo RC](#), [Coconcelli L](#), [Kruel LF](#). *Effects of aerobic exercise performed in fasted v. fed state on fat and carbohydrate metabolism in adults: a systematic review and meta-analysis*. British Journal of Nutrition, Inglaterra, v. 116, n. 7, p. 1153-1164, out. 2016.

Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. *Role of Akt/protein kinase B in metabolism*. Trends in Endocrinology & Metabolism, Estados Unidos, v. 13, n. 10, p. 444-451, dez. 2002.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. *AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells*. The Journal of Biological Chemistry, Estados Unidos, v. 279, n. 46, p. 47898-47905, nov. 2004.