

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA

LAYANE RAMOS AYRES

**EFEITOS SUBAGUDOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO AERÓBICO EM
JEJUM OU EM ESTADO ALIMENTADO SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS
E MOLECULARES DE RATOS WISTAR MACHOS SEDENTÁRIOS**

PORTO ALEGRE, RS
OUTUBRO, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO

Documento apresentado como pré-requisito para obtenção do título de mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências do Movimento Humano (PPGCMH) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança (ESEFID) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Orientador: Dr. Maurício da Silva Krause

Co-Orientador: Dr. Eurico Nestor Wilhelm Neto

LAYANE RAMOS AYRES

PORTO ALEGRE, RS

OUTUBRO, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Ayres, Layane Ramos

Efeitos subagudos de uma sessão de exercício aeróbico em jejum ou em estado alimentado sobre parâmetros metabólicos e moleculares de ratos wistar machos sedentários / Layane Ramos Ayres. -- 2022. 68 f.

Orientador: Maurício da Silva Krause.

Coorientador: Eurico Nestor Wilhelm.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Educação Física, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Exercício em jejum. 2. Proteínas de choque térmico. 3. Sedentarismo. I. Krause, Maurício da Silva, orient. II. Wilhelm, Eurico Nestor, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha psicóloga Simone Fuentes, apenas ela e eu sabemos o peso e a importância que esse trabalho tem para mim, agradeço por todo o suporte. Sinto mais que necessário deixar aqui registrado o meu carinho à todas as pessoas que acreditaram em mim desde o início e ainda mais àquelas que continuaram acreditando quando eu mesma não acreditava. Vocês merecem muito mais do que uma página na minha vida, vocês têm um lugar especial no meu coração.

Todo o meu reconhecimento e consideração à minha família: aos que me deram a vida e todo apoio, aprendizado e recursos que me possibilitaram chegar até aqui: meus pais Carlos Ayres e Sandra Ramos e meu irmão Allan Ayres, obrigada por tudo. Ainda registro aqui meu agradecimento a minha tia Elvira Robalo que sempre esteve disponível para me ajudar desde o início da minha vinda para Porto Alegre em busca desse sonho.

Quero agradecer a pessoa que confiou no meu potencial para isso e me ajudou a dar o primeiro para que o alcançasse, meu “padrinho” de mestrado Dr. Francesco Boeno, obrigada por me impulsionar a seguir esse caminho, me orgulho de ter sido tua aluna e aprendido muito contigo.

Devo lembrar aqui também do Dr. Bruno Teixeira, outro professor que me inspirou a seguir carreira acadêmica e foi meu primeiro orientador na iniciação científica, obrigada por desde o começo me orientar nesta caminhada.

Estes últimos dois me direcionaram ao PPGCMH, programa ao qual agradeço imensamente por todo o recurso e qualidade de ensino, especialmente ao Dr. Alvaro Reischak Oliveira, atual coordenador que também compõem a banca avaliadora deste trabalho, profissional a quem admiro muito.

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu primeiro orientador nessa jornada de Mestrado acadêmico Dr. Eurico Nestor Wilhelm, professor incrível com quem tive a honra de trabalhar por um curto, mas valioso tempo. Sou imensamente grata pela paciência, acolhimento e pelo conhecimento compartilhado comigo.

Ao orientador dessa dissertação Dr. Mauricio Krause, excelente profissional, essencial em todas as vezes que esteve me incentivando a seguir, certo de que conseguiríamos finalizar, agradeço pela paciência e por ter podido aprender e crescer mais contigo.

Desde já gostaria de agradecer aos demais professores da banca pelo aceite e também pela paciência e compreensão com todos os ajustes e contratemplos que tivemos, Dr. Ronei Silveira Pinto, Dr. Rodrigo Macedo e Dr. Adriano Martimbianco de Assis, muito obrigada.

Além dos professores preciso agradecer ao grupo do Laboratório de Pesquisa em Inflamação e Exercício (LAPIMEX) e Fisiologia Celular (Fiscel), especialmente a melhor equipe que eu podia ter: Helena Schroeder obrigada por ser um ser humano e profissional exemplar e inspirador, Mariana Kras obrigada por sempre acreditar, estar presente e me incentivar, agradeço imensamente a vocês e também ao resto da nossa equipe de trabalho Giovana Raphaelli e Daniela Drosdowski, vocês foram essenciais, Maria Inês Rodrigues, nossa técnica no laboratório sempre presente também muito obrigada pelo acolhimento, companhia e ajuda.

Estendo meu agradecimento também a todos os colegas dos outros grupos que fazem parte da minha formação acadêmica nos quais pude participar e aprender: Grupo de Pesquisa em Treinamento de Força (GPTF) e Grupo de Estudos em Fisiologia e Bioquímica do Exercício (GEFEX). Por fim aproveito para registrar agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que viabiliza e torna possível a presente especialização de ensino.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 SEDENTARISMO, INATIVIDADE FÍSICA E DOENÇA METABÓLICA	13
1.2 METABOLISMO NO EXERCÍCIO.....	18
1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO JEJUM.....	23
1.4 INTERAÇÃO JEJUM E EXERCÍCIO	25
1.5 RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO E PAPEL CITOPROTETOR DAS HSP70....	27
2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	30
2.1 OBJETIVOS.....	30
2.1.1 Objetivo geral	30
2.1.2 Objetivos específicos.....	30
2.2 TIPO DE ESTUDO, POPULAÇÃO E AMOSTRA	31
2.2.1 Abordagem Experimental.....	31
2.2.2 Animais.....	31
2.2.3 Cálculo Amostral.....	32
2.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
3 INSTRUMENTOS DE MEDIDA E PROCEDIMENTOS DE COLETA.....	33
3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	33
3.1.1 Amostras de tecido	33
3.2 WESTERN-BLOT	34
4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	36
5 ASPECTOS ÉTICOS	36
6 RESULTADOS	36
6.1 GLICEMIA.....	36
6.2 TRIGLICERIDEMIA.....	37
6.3 COLESTEROLEMIA	38
6.5 LACTATEMIA	40

6.6 GLICOGÊNIO	41
6.7 TRIGLICERÍDEOS	42
6.8 IMUNOCONTEÚDO DE SIRT1 E HSP70 NOS TECIDOS	43
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Ac-CoA: acetil-CoA.

AGL: ácidos graxos livres.

AK: adenilato a reação da quinase.

AMP: adenosina monofosfato.

AMPK: proteína quinase ativada por AMP.

ATGL: lipase triglicéridica adiposa

ATP: trifosfato de adenosina.

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais.

CK: creatina quinase.

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1.

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório.

CS: citrato sintase.

Cyt c: citocromo c.

DGAT: diacilglicerol aciltransferase.

DM2: Diabetes mellitus do tipo 2.

ETC: cadeia de transporte de elétrons.

EXA: exercício alimentado.

EXJ: exercício em jejum.

FABPpm: proteína de ligação de ácidos graxos.

FAT/CD36: ácido graxo translocase.

GLU: glicose sanguínea circulante

GLUT4: transportador de glicose do tipo 4.

GS: glicogênio sintase.

HK: hexoquinase.

HSL: lipase hormônio sensível

HSP: proteínas de choque térmico.

HSP70: proteína de choque térmico de 70 quilodalton.

HSR: resposta ao choque térmico.

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

IMCL: lipídeos intramiocelulares.

IMTAG: triacilglicerol intramuscular.
IRS: substrato 2 do receptor de insulina.
KDa: quilodaltons.
LAC: lactato.
LDH: lactato desidrogenase.
METs: equivalente metabólico de tarefa.
mg.dl⁻¹: miligrama por decilitro.
MGAT: monoacilglicerol aciltransferase.
mL/ g: mililitros por grama.
mmol/L: milimol por litro.
NEFA: ácidos graxos não esterificados.
NFκB: fatores de transcrição nucleares da família κB.
PDH: piruvato desidrogenase.
PDK4: piruvato desidrogenase quinase 4.
PFK: fosfofrutoquinase.
PHOS: glicogênio fosforilase
PYR: piruvato.
REA: repouso alimentado.
REJ: repouso em jejum.
SIRT1: Sirtuína 1.
TAG: triacilglicerol.
TCA: ciclo do ácido tricarboxílico.
TG: Triglicerídeos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos envolvidos no comprometimento da transdução do sinal da insulina	166
Figura 2 - Provisão de energia no músculo esquelético durante o exercício.....	22
Figura 3 - Principais fatores metabólicos e comportamentais influenciados pelo exercício aeróbico realizado jejum noturno.	266
Figura 4 - Desenho experimental	333
Figura 5 - Concentração de glicose.	377
Figura 6 - Concentração de triglicerídeos	388
Figura 7 - Concentração plasmática de colesterol total.....	39
Figura 8 - Concentração de proteínas totais	40
Figura 9 - Concentração plasmática de lactato.....	41
Figura 10 - Concentração de glicogênio nos tecidos.....	422
Figura 11 - Concentração de triglicerídeos nos tecidos.....	433
Figura 12 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no sóleo.	444
Figura 13 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no gastrocnêmio.	445
Figura 14 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no fígado.	455
Figura 15 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no tecido adiposo marrom.....	455
Figura 16 - Lactato no sangue venoso	50
Figura 17 – Funções do tecido adiposo marrom.	52

RESUMO

Introdução: O comportamento sedentário está associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. Em contrapartida, a prática do exercício regular atua como intervenção não farmacológica que melhora diversos fatores metabólicos, como perfil lipoproteico, inflamatório, sensibilidade à insulina, manutenção do peso e pressão arterial, culminando em diminuição do risco à saúde. Períodos de restrição na alimentação também parecem reduzir concentrações basais de biomarcadores associados a doenças crônicas, bem como parece aprimorar a expressão das proteínas da via de choque térmico, sendo capaz de trazer efeitos similares ao do exercício. Recentemente, estudos avaliando exercício em estado de jejum demonstraram benefícios adicionais, quando comparados a seus efeitos isolados. **Objetivos:** Avaliar os efeitos subagudos (12 h após a conclusão) de uma única sessão de exercício aeróbico de intensidade moderada realizada em estado alimentado ou em jejum de 8 h sob variáveis metabólicas e imunoconteúdo de proteínas relacionadas à via de choque térmico em ratos Wistar machos sedentários. **Métodos:** Os animais foram alocados em quatro grupos: repouso alimentado (REP), exercício alimentado (EXA), repouso em jejum (REJ) e exercício em jejum (EXJ). O protocolo de exercício consistiu em uma sessão de 30 minutos em esteira, com intensidade de 60% do VO_2 máx. Os animais realizaram jejum de 8 h pré sessão de exercício. Após 12 h de recuperação, os animais foram mortos e os parâmetros metabólicos no sangue, fígado, tecido adiposo marrom e músculos gastrocnêmio e sóleo foram avaliados, assim como o imunoconteúdo de sirtuína 1 (SIRT1) e proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) nos mesmos tecidos. **Resultados:** A concentração de glicogênio no sóleo aumentou nos grupos em jejum, enquanto que o conteúdo de triglicerídeos aumentou no fígado e tecido adiposo marrom. A combinação de exercício e jejum promoveu diminuição da concentração sérica de colesterol total e lactato quando comparado com o grupo REJ. Além disso, o imunoconteúdo de HSP70 e SIRT1 não sofreram alterações estatisticamente significativas, tanto no exercício quanto no jejum, para todos os tecidos analisados. **Conclusões:** Uma sessão de exercício aeróbico de intensidade moderada quando realizada em jejum é capaz de induzir alterações metabólicas importantes. A ausência de alterações nas proteínas analisadas, possivelmente ocorreu pelo diferente tempo de ativação e pico de expressão das mesmas pós exercício.

Palavras-chave: exercício em jejum; proteínas de choque térmico; sedentarismo;

ABSTRACT

Introduction: Sedentary behavior is associated with an increased risk for the development of cardiometabolic diseases. On the other hand, the practice of regular exercise acts as a non-pharmacological intervention that improves several metabolic factors, such as lipoprotein and inflammatory profile, insulin sensitivity, weight maintenance and blood pressure, culminating in a decrease in health risk. Periods of food restriction also seem to reduce baseline concentrations of biomarkers associated with chronic diseases, as well as to enhance the expression of heat shock proteins pathway, being able to bring about effects similar to that of exercise. Recently, studies evaluating fasted state exercise have demonstrated additional benefits when compared to its isolated effects. **Objectives:** To evaluate the subacute effects (12 h after) of a bout of moderate-intensity aerobic in a fed or fasted state 8h on metabolic biological and heat shock pathway-related protein immunocontents in sedentary males wistar rats. **Methods:** The animals were allocated in four groups: Fed Rest (FER), Fasting Rest (FAR), Fed Exercise (FEE), Fasting Exercise (FAE). The exercise protocol consists of a 30-minute treadmill session at an intensity of 60% of VO₂max. The animals fasted for 8h before exercise. After 12h of recovery, the animals were killed and the blood sample, brown adipose tissue and gastrocnemius and soleus muscle was collected, as well as immunocontent of sirtuin 1 (SIRT1) and heat shock protein 70kDa (HSP70) in the same tissues. **Results:** Soleus glycogen concentration increase only in the fasting groups, whereas the triglyceride content increased in brown adipose tissue and liver. Exercise and fasting decrease serum total cholesterol concentration and lactate when compared with the FAR group. In addition, immunocontent HSP70 and SIRT1 did not change significantly, at any tissue investigated. **Conclusions:** Bout aerobic exercise when performed in a fasted state is able to reduce important metabolic changes. The absence of changes in those proteins, possibly, occurred due different activation time.

Key-words: fasting exercise; heat shock protein; sedentary behaviour.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEDENTARISMO, INATIVIDADE FÍSICA E DOENÇA METABÓLICA

Embora sejam utilizados como sinônimo, os termos sedentarismo e inatividade física têm significados distintos. Tremblay *et.al.* (2012) definem comportamento sedentário como qualquer comportamento de vigília que envolva baixos níveis de gasto energético, mais especificamente $\leq 1,5$ equivalentes metabólicos da tarefa (*METs*, do inglês *metabolic equivalent of task*). *MET* é uma unidade utilizada para classificar a intensidade da atividade física em sedentária, leve, moderada ou intensa, representando um consumo de oxigênio de aproximadamente 3,5 mL/kg/min, correspondente a energia necessária para se manter em repouso. Sendo assim, o comportamento sedentário pode ser visto em atividades como postura sentada, reclinada ou deitada (HOLTERMANN; STAMATAKIS, 2019).

Já a inatividade física se refere ao não cumprimento do tempo mínimo em atividades físicas programadas recomendado pela organização mundial da saúde (*WHO*, do inglês *World Health Organization*). A *WHO* propõe o engajamento em atividades de moderada a alta intensidade por pelo menos 150 min por semana para a população adulta de 18 a 64 anos, a fim de combater o comportamento sedentário e inatividade física para assim ajudar a prevenir/controlar doenças como diabetes do tipo 2, obesidade, doença cardiovascular e ainda alguns tipos de câncer (WHO, 2016).

Evidências recentes sugerem que ter um alto nível de comportamento sedentário é capaz de afetar negativamente a saúde por aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, independente de fatores intervenientes como alimentação e controle de peso corporal (THORP *et al.*, 2011; WHITAKER *et al.*, 2017). Owen *et al.*, (2010) sugerem que comportamento sedentário contínuo está associado com mortalidade geral, morbidade cardiometabólica e metabolismo anormal de glicose. Em uma visão geral de revisões sistemáticas a respeito do tema Saunders *et al.* (2020) ainda suportam a ideia de que reduzir ou cessar comportamento sedentário beneficia marcadores de risco cardiometabólico. Alguns estudos ainda documentaram associações relacionadas a comportamentos sedentários em geral (incluindo tempo de tela) com adiposidade central e níveis de triglicérides, insulina em jejum e glicemia de 2 horas prejudicados (DUNSTAN *et al.*, 2007; FORD *et al.*, 2010; HEALY *et al.*, 2007, 2008; THORP *et al.*, 2010).

Assim como outros trabalhos também enfatizaram que períodos prolongados de postura sentada podem resultar em uma série de danos à saúde, como redução da atividade da

lipoproteína lipase, depuração de triglicerídeos, redução da depuração de uma carga oral de glicose e menor secreção de insulina estimulada por glicose (BEY; HAMILTON, 2003; HAMBURG *et al.*, 2007; HAMILTON; HAMILTON; ZDERIC, 2007).

Em algumas subpopulações adultas a prevalência da inatividade física pode chegar a mais de 80% em algumas regiões como Mediterrâneo Oriental, Américas, Europa e Pacífico Ocidental, isso parece estar relacionado com o uso da tecnologia, modificação nos padrões de transporte ao longo dos anos, urbanização e cultura em geral. Bem como devem ser levadas em conta questões relacionadas ao acesso a prática de atividade física, tanto a partir da disponibilidade e acessibilidade de lugares seguros, como praças e parques, quanto diferenças de gênero, nível socioeconômico e inclusão de pessoas com deficiência e doenças crônicas (SALLIS *et al.*, 2016; WHO, 2018).

Estima-se que globalmente a inatividade física tenha um custo de cerca de \$54 bilhões por ano, valor que contribui para um impacto econômico negativo nos sistemas de saúde. Afetando também o desenvolvimento econômico em geral, o meio ambiente, bem estar e qualidade de vida da população (DING *et al.*, 2016).

Em vista dos motivos supracitados e do prejuízo global em que culmina não realizar o mínimo necessário de atividade física a fins de saúde, Kohl *et al.* (2012) estabelecem que a inatividade física deve ser adequadamente caracterizada como pandemia.

Trabalhando para atenuar esses prejuízos a *WHO* move um plano de ação global de atividade física que visa tornar as pessoas mais ativas em prol de um mundo mais saudável, contribuindo para o desenvolvimento social, econômico e cultural. Com o intuito de até o ano de 2030 atingir uma redução relativa de 15% na prevalência global de inatividade física em adultos e adolescentes (WHO, 2018). Segundo Guthold *et al.* (2018) na população brasileira de adultos com ≥ 18 anos a prevalência de tempo insuficiente em atividades físicas (estabelecido pela *WHO*) atinge quase 50%.

O conjunto de comportamento sedentário e inatividade física pode afetar importantemente um sistema de saúde conforme já exposto, acumulando uma série de agravantes como riscos aumentados nestas populações para adquirir doenças não transmissíveis e engatilhar outras desordens como sobrepeso, obesidade, diabetes do tipo 2, doenças psicológicas, diminuição de qualidade de vida, e até mesmo menor produtividade em atividades laborais. Fatores que corroboraram para que a inatividade física ocupasse o quarto lugar no ranking de causas de morte em escala global (FIUZA-LUCES *et al.*, 2018; KOHL *et al.*, 2012).

O comportamento sedentário por si é um importante fator relacionado à morbimortalidade cardiovascular e metabólica promovendo alterações a nível celular como

aumento da resistência periférica à insulina, alterações no metabolismo lipídico, acúmulo de gordura corporal, disfunção musculoesquelética, estado pró-inflamatório sistêmico e remodelação cardíaca (DE MELO *et al.*, 2021; EKELUND *et al.*, 2016; GONZÁLEZ; FUENTES; MÁRQUEZ, 2017).

Além disso, a aderência por menores níveis de atividade física expõe a população a um cenário propício para desenvolvimento de síndrome metabólica, caracterizada por um acúmulo de riscos cardiometabólicos que incluem: obesidade, metabolismo da glicose prejudicado, dislipidemia e hipertensão (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013).

O metabolismo da glicose prejudicado compromete a sensibilidade de insulina nos seguintes órgãos-alvo: tecido adiposo, fígado e músculo. Algumas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo promovem resistência à insulina e atuam no músculo e no fígado, causando inflamação do tecido por meio de aumento de adiposidade, diminuição de adiponectina (uma adipocina anti-inflamatória) enquanto aumenta leptina e fatores pró-inflamatórios como interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Ainda, resistência à insulina parece aumentar recrutamento de macrófagos, diminuição de absorção de glicose pelo músculo e aumento de produção de glicose no fígado (MYERS; KOKKINOS; NYELIN, 2019; ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013). Diante do exposto, o tecido adiposo é reconhecido como órgão endócrino capaz de intermediar diversas funções do organismo ligadas à algumas doenças, assumindo papel importante na regulação do metabolismo (WIRTH; WABITSCH; HAUNER, 2014).

A insulina é um hormônio regulador central na manutenção da homeostase da glicose e também está envolvida em processos anabólicos, como crescimento e desenvolvimento de tecidos. Ela é secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans em resposta à glicose e aminoácidos consumidos a partir de uma refeição (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013). A inflamação sendo um dos mecanismos iniciais da resistência à insulina é promovida inicialmente através do comprometimento na transdução do sinal de insulina, contribuindo para um prejuízo na ação da mesma, ou seja, aumento na resistência à insulina iniciados em parte através de aumento na captação de ácidos graxos com seguinte dano na função mitocondrial, acúmulo de lipídeos bioativos, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e por final inflamação do tecido em si, conforme demonstrado na Figura 1.

em ácidos graxos livres e glicerol. A glicose é utilizada pelas células para produção de trifosfato de adenosina (ATP), principal fonte de energia nas células. Para que a glicose entre na célula, se faz necessária a presença de carreadores, particularmente o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4, do inglês *glucose transporter 4*) que é expresso em tecidos dependentes da ação da insulina (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013).

A glicose é então transportada através da membrana plasmática, onde é imediatamente fosforilada e armazenada como glicogênio hepático (no fígado), muscular (no músculo) ou então metabolizada para produzir ATP. As miocinas, citocinas produzidas e liberadas nos músculos, podem em parte, mediar aspectos dos efeitos induzidos pelo exercício. As melhorias estimuladas pelo exercício na sensibilidade à insulina parecem estar mais relacionadas a ganhos na ação muscular da insulina, e não da ação hepática (KIRWAN *et al.*, 2009; ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013; WINNICK *et al.*, 2008).

Resumidamente, a insulina é um hormônio que possui papel importante em regular a captação da glicose, assim como as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) presentes na circulação. Nos tecidos a insulina exerce papéis distintos, são eles: diminuição da lipólise no tecido adiposo com conseqüente redução do efluxo de AGL localizados nos adipócitos; inibição da gliconeogênese no fígado, reduzindo com isso atividades enzimáticas-chave; captação de glicose no músculo esquelético, estimulada por translocação do GLUT4 para a membrana. Concentrações aumentadas de AGL podem ser vistas em um quadro de resistência à insulina, seguido de acúmulo de gordura demasiado, por conseqüência impedindo a captação de glicose no músculo e no fígado elevando níveis de glicose. Essas complicações de resistência à insulina e problemas na secreção desse hormônio levam a desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (DM2) (ZEYDA; STULNIG, 2009). Segundo Lechleitner (2008) o risco para DM2 é aumentado com o envelhecimento. Esse fato é atribuído principalmente ao acréscimo da prevalência de sobrepeso e obesidade em idosos. Em vista da relação da obesidade, resistência à insulina e inflamação, as estratégias substitutivas de tratamento e prevenção desses quadros são de suma importância para reduzir a morbidade e melhorar a qualidade de vida da população em geral (ZEYDA; STULNIG, 2009).

A obesidade é uma doença caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixo grau ocasionado, em parte, por infiltração de macrófagos no tecido adiposo, local onde também são produzidas citocinas pró inflamatórias (CHEN *et al.*, 2015; NIMPTSCH; KONIGORSKI; PISCHON, 2019). Uma maior captação de ácidos graxos pelos macrófagos provinda de uma dieta inadequada rica em lipídeos pode causar alteração na configuração fenotípica de macrófagos M2 para M1, de um estado anti-inflamatório para um estado inflamatório,

respectivamente, ocasionando o que é visto como uma polarização inflamatória e consequente inflamação do tecido adiposo (KLEIN-WIERINGA *et al.*, 2013; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; MORIGNY *et al.*, 2016; PRIEUR *et al.*, 2011).

Os riscos à saúde acima citados podem ser amenizados em pessoas fisicamente ativas, conforme Ekelund *et al.* (2016) pessoas que praticam entre 60 a 75 minutos por dia de atividade física em intensidade moderada parecem não ter risco aumentado de mortalidade, ainda que as mesmas possuam um estilo de vida sedentário. O que evidencia a importância de um estilo de vida mais ativo.

Sendo assim, a inatividade física é um fator de risco conhecido, porém modificável, ou seja, a intervenção através da atividade física e exercício físico é uma alternativa para melhora em diversas condições clínicas, físicas e psicológicas (COLBERG *et al.*, 2016; GARBER *et al.*, 2011; ROSS *et al.*, 2016). Os benefícios de um estilo de vida ativo vêm sendo documentados desde meados de 1950, e com o passar dos anos até os dias atuais só aumentam os resultados positivos encontrados através da prática regular de exercício, com isso torna-se imprescindível investigar o metabolismo envolvido nessas atividades e como melhor manipulá-lo.

1.2 METABOLISMO NO EXERCÍCIO

As adaptações induzidas pelo treinamento provém de estímulos bioquímicos e biofísicos que resultam em mudanças em proteínas de função contrátil, alterações na função mitocondrial, regulação do metabolismo, sinalização intracelular, modificação de respostas transcricionais e atividades enzimáticas (ADAMS *et al.*, 1993; BENZIANE *et al.*, 2008; GREEN *et al.*, 1992; PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003; SPINA *et al.*, 1996; WIDRICK *et al.*, 2002). Essas modificações envolvem fatores que são responsivos ao estresse gerado pelo exercício. As alterações que ocorrem após a realização de uma sessão de exercício incluem mudanças na transcrição gênica com genes prematuros imediatos, reguladores miogênicos, genes do metabolismo de carboidratos, mobilização lipídica, transporte, oxidação, metabolismo, biogênese mitocondrial, fosforilação oxidativa e reguladores transcricionais de expressão gênica (EGAN; ZIERATH, 2013).

Uma sessão de exercício é capaz de alterar a atividade do DNA de se ligar a fatores de transcrição, como pode afetar a estabilidade da proteína e a localização subcelular de fatores complexos transcricionais no núcleo da mitocôndria (MCGEE; HARGREAVES, 2004; SAFDAR *et al.*, 2011). Assim como a insulina, o músculo esquelético também desempenha papel no controle glicêmico e homeostase metabólica, captando glicose e armazenando na

forma de glicogênio muscular em quantidade quatro vezes maior que a do glicogênio hepático (DEFRONZO *et al.*, 1981).

Por sua vez, o que ocorre no exercício é um estresse que ameaça a homeostase diante de perturbações metabólicas, onde o organismo trabalha não só para manter o exercício que está sendo realizado, mas também para promover melhor desempenho durante um desafio futuro, incluindo melhora da resistência à fadiga. Nesse sentido o músculo esquelético trabalha para otimizar a entrega de substrato, melhorar a capacidade respiratória mitocondrial e função contrátil durante a realização do estresse físico e mecânico. No período de recuperação do exercício agudo, as modificações no mRNA facilitam a síntese de proteínas e promovem remodelação estrutural gradual, além de ajustes funcionais a longo prazo (BOOTH; THOMASON, 1991; HOLLOSZY; COYLE, 1984; PERRY *et al.*, 2010).

Conforme exposto na Figura 2, a geração de ATP pelo músculo esquelético se dá pelas seguintes vias metabólicas: (1) Sistema ATP-PCr (Adenosina tri fosfato- creatina fosfato) degrada PCr em Cr e fosfato inorgânico (Pi) pela ação da creatina quinase (CK), Cr e Pi são ligados com adenosina difosfato (ADP), para restaurar ATP. Enquanto a adenilato quinase (AK) catalisa a reação de formação de ATP e AMP, a partir de duas moléculas de ADP. (2) Anaerobicamente, a glicose-6-fosfato vinda do glicogênio muscular (GLY) é catalisada pela glicogênio fosforilase (PHOS) ou glicose sanguínea circulante (GLU) é catalisada pela hexoquinase (HK), e catabolizada para piruvato (PYR), que se reduz à lactato (LAC) pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e produz ATP por fosforilação. (3) Aerobicamente, glicólise e β -oxidação produzem acetil-CoA (Ac-CoA) que entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na mitocôndria, acoplado à fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons (ETC). A via da glicólise proveniente de carboidratos e a fosforilação oxidativa estão ligadas pelo complexo da piruvato desidrogenase (PDH). O transportador de glicose GLUT4 facilita a captação de glicose para o sarcoplasma. A glicose pode sofrer glicólise ou durante período inativo/repouso é armazenada como glicogênio via glicogênio sintase (GS). No sarcolema, a acil graxo translocase (FAT/CD36) facilita o transporte de ácidos graxos de cadeia longa e através da membrana e conta com o auxílio da proteína de ligação de ácidos graxos (FABPpm) e carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1). Os ácidos graxos livres (FFAs, do inglês *free fatty acids*) dentro da célula podem ser oxidados via β -oxidação ou armazenados como triglicerídeo intramuscular (IMTG) via esterificação por monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT). A liberação de AGL a partir de IMTG no músculo durante a realização do exercício ocorre por meio da atividade da enzima lipase hormônio sensível (HSL, do inglês *hormone-sensitive lipase*) e lipase triglicerídica adiposa

(ATGL, do inglês *adipose triglyceride lipase*) (EGAN; ZIERATH, 2013; WATT; SPRIET, 2010).

Como produtos do TCA também são formados intermediários reduzidos como NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*) e FADH (do inglês, *flavin adenine dinucleotide hydrogen*), dinucleotídeos de alto nível energético que serão oxidados no sistema de cadeia de transporte de elétrons (EGAN; ZIERATH, 2013).

Ainda que todas as vias de geração de ATP estejam ativas durante o exercício, a via metabólica predominante de produção de energia para a manutenção do exercício é determinada pela intensidade e duração do mesmo. A produção de ATP e quantidade potencial de ATP produzida, também é influenciada ainda pelo modo ou tipo de estímulo do exercício e pelas variáveis ambientais impostas.

Em demanda aeróbica, ambos, glicogênio e triglicerídeos intramusculares, fornecem energia durante o exercício (KOOPMAN *et al.*, 2006). Cada via de sinalização envolvida neste metabolismo possui funções que parecem exercer uma conversa cruzada por ter um grau de dependência, interferência e importância dentre estas, o que torna difícil o entendimento de quanto cada via contribui para mudanças medidas na expressão gênica (EGAN; ZIERATH, 2013).

Segundo Coyle *et al.*, (1997) o aumento do fluxo glicolítico claramente regula o metabolismo em condições alimentadas. A caracterização do fluxo de glicose nas refeições é importante porque determina a glicemia pós-prandial, um preditor de risco de doença cardiovascular (NING *et al.*, 2012; PEKKANEN J, TUOMILEHTO J, QIAO Q, JOUSILAHTI P, 1999). Dados demonstraram um aumento na captação de glicose plasmática durante refeição pós exercício, em indivíduos que consumiram uma refeição pré exercício, apesar da menor insulinemia. A captação de glicose plasmática do músculo esquelético pós exercício é elevada por vias dependentes e independentes de insulina (EDINBURGH *et al.*, 2018).

Uma sessão aguda de exercício intervalado de alta intensidade (HIIT do inglês *high intense interval training*) aumenta a abundância nuclear do coativador transcricional PPAR-c coativador-1 (PGC-1 α) e ativa a biogênese e capacidade mitocondrial no músculo esquelético humano. Little *et al.* (2011) submetem oito homens saudáveis a uma sessão de 4 séries de 30 s de ciclismo de intensidade máxima intercaladas com 4 min de descanso. O protocolo ativou a p38 MAPK e a AMPK no citosol. PGC-1 α aumentou 3 h pós-recuperação, juntamente com aumento da expressão de mRNA de genes mitocondriais.

No músculo, a PGC1- α induzida pelo exercício estimula: biogênese mitocondrial, angiogênese, metabolismo oxidativo, alterações no tipo de fibra e também fornece resistência

à distrofia muscular e atrofia muscular ligada à denervação. Além disso, a PGC-1 α controla a biogênese mitocondrial e o metabolismo oxidativo em muitos tipos de células. Desempenha um papel importante por estimular um aumento na expressão de uma proteína de membrana (FNDC5) que é clivada e secretada como um hormônio a pouco reconhecido, a irisina, que é secretada do músculo para o sangue e ativa a função termogênica nos tecidos adiposos. A irisina induzida pelo exercício, atua nas células adiposas brancas em cultura e *in vivo* para estimular a expressão de uma proteína de desacoplamento (UCP1, do inglês *uncoupling protein*), e níveis levemente aumentados de irisina no sangue causam um aumento no gasto de energia em camundongos sem um controle na dieta (BOSTRÖM *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a irisina apresenta potencial terapêutico no tratamento de doenças metabólicas humanas e outros distúrbios, como a obesidade e a resistência à insulina. Sua ação, implica no escurecimento de certos tecidos adiposos brancos, tanto em cultura quanto *in vivo*. Concentrações nanomolares de irisina aumentam significativamente (50 vezes ou mais) a expressão da UCP1 em culturas de células de gordura branca primária, resultando em aumento da respiração celular. A PGC1- α presente no músculo de camundongos transgênicos induz uma notável resistência à obesidade relacionada à idade e ao diabetes. Assim, a irisina parece contribuir para um importante efeito benéfico induzido pelo exercício físico, por induzir o escurecimento de tecido adiposo branco, resultando no aumento no gasto de energia (BOSTRÖM *et al.*, 2012).

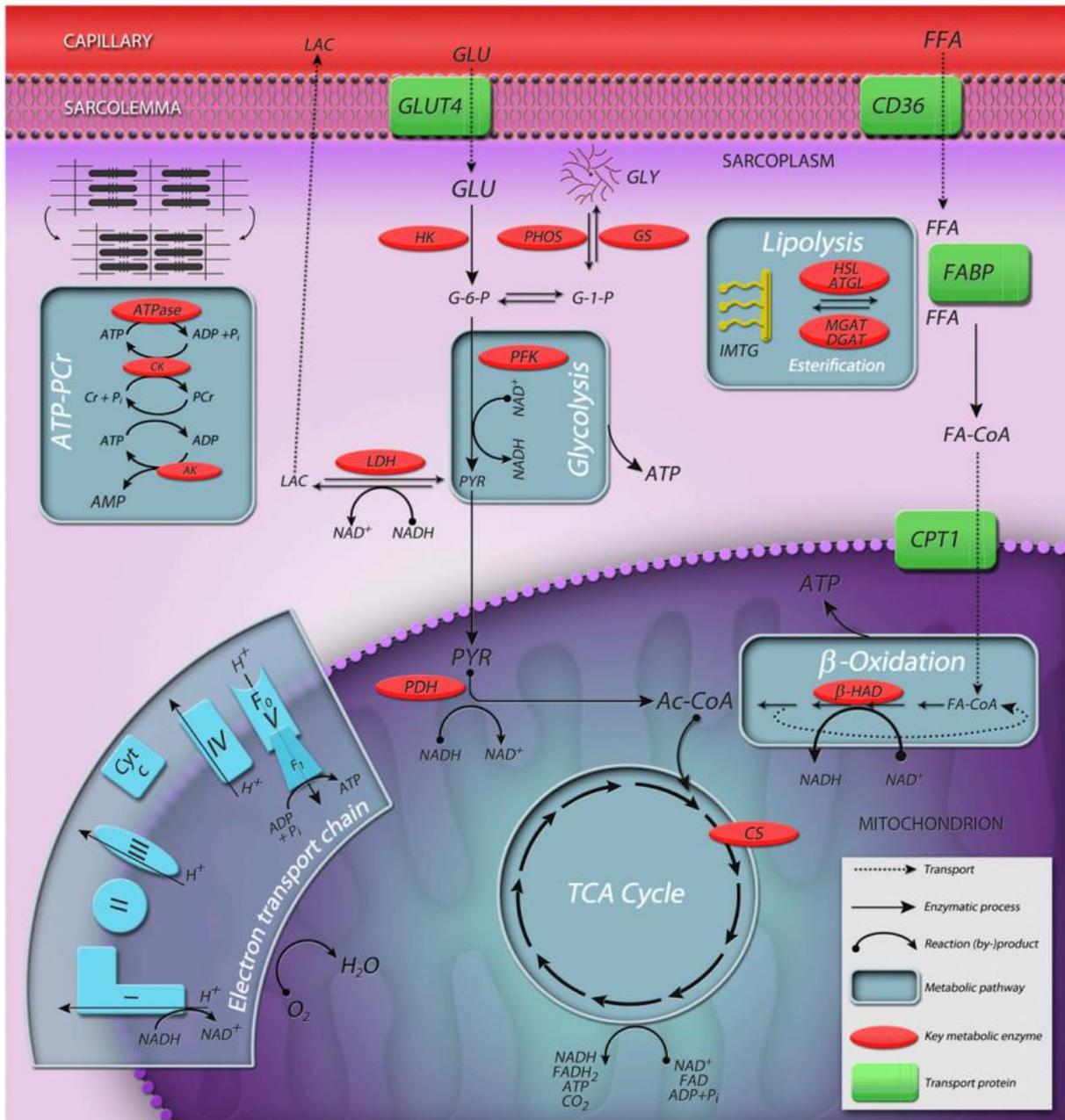


Figura 2 - Provisão de energia no músculo esquelético durante o exercício. CK, creatina quinase; AK, adenilato a reação da quinase; GLY, glicogênio muscular; PHOS, glicogênio fosforilase; GLU, glicose sanguínea circulante; HK, hexoquinase; PYR, piruvato; LAC, lactato; LDH, lactato desidrogenase; Ac-CoA, acetil-CoA; TCA, ácido tricarbóxico; ETC, cadeia de transporte de elétrons; PDH, piruvato desidrogenase; GS, glicogênio sintase FAT/CD36, ácido graxo translocase; FABPpm, proteína de ligação de ácidos graxos; CPT1, carnitina palmitoiltransferase 1; MGAT, monoacilglicerol aciltransferase; DGAT diacilglicerol aciltransferase; CS, citrato sintase; Cyt c, citocromo c; PFK, fosfofrutoquinase. *Fonte: (EGAN; ZIERATH, 2013)*

1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO JEJUM

Em jejum a via de oxidação de gordura é predominantemente utilizada em exercícios de baixa intensidade ($< 45\% \text{ VO}_2\text{máx}$), sendo que para suportar intensidades moderadas (45- 65% $\text{VO}_2\text{máx}$) são requisitados carboidrato e gordura. Já para intensidades mais altas ($>65\% \text{VO}_2\text{máx}$) a utilização de energia provinda de carboidratos predomina (WALLIS; GONZALEZ, 2018).

Estudos que avaliaram indivíduos considerados saudáveis em jejum demonstraram a utilização prioritária de ácidos graxos em relação a glicose, quando comparado com indivíduos que realizaram exercício em estado alimentado (AIRD; DAVIES; CARSON, 2018; VAN PROEYEN *et al.*, 2011).

Van Proeyen *et al.* (2011) ainda ressalta que o exercício em um estado de restrição de carboidratos eventualmente causa adaptações moleculares nas células musculares para regular capacidade de produção de energia via oxidação de gordura.

Pesquisas anteriores estabeleceram que tanto o aumento da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa no plasma quanto a utilização de TAG (triacilglicerol) intramuscular, são importantes para suportar o aumento da oxidação de gordura observado durante o exercício no estado de jejum noturno, pelo menos em indivíduos magros (COYLE *et al.*, 1997; DE BOCK *et al.*, 2005).

Em uma revisão sobre os efeitos do exercício realizado em jejum comparado ao estado alimentado no metabolismo de gorduras e carboidratos Vieira *et al.* (2016) concluíram que ingestão de uma refeição contendo carboidrato antes do exercício reduziu oxidação de gordura enquanto aumentou de carboidrato durante a realização do exercício de até 2h de duração com intensidade de 70% $\text{VO}_2\text{máx}$. Isso sugere que os benefícios do exercício podem ser potencializados quando este for realizado em jejum, considerando maior mobilização e oxidação de lipídeos e adaptações metabólicas superiores comparado ao exercício em estado alimentado.

Hoje se sabe que a maior contribuição durante o exercício é provinda de carboidratos e lipídeos intra e extra muscular (HAWLEY; MAUGHAN; HARGREAVES, 2015). Durante o estado de jejum aumenta-se a lipólise no tecido adiposo enquanto se estimula oxidação de gordura periférica, o que resulta, segundo Zouhal *et al.* (2020), em perda de peso por aumentar a utilização de gordura.

Nos últimos anos, estratégias com períodos de restrição na alimentação, tanto na prática clínica quanto na área da pesquisa, relacionada à saúde metabólica têm estado em ascensão.

Pesquisadores buscam investigar os efeitos do jejum sob diferentes parâmetros, entre eles melhorias em biomarcadores metabólicos, perda de peso e modificação da utilização do substrato energético durante a realização do exercício (PATTERSON; SEARS, 2017; VAN PROEYEN *et al.*, 2011).

Jejum é caracterizado por abster-se de alimentos e/ou bebidas por um determinado período de tempo, podendo este variar desde horas há dias sem ingestão de energia. Entre os tipos de jejum conhecidos na literatura destacam-se diversas estratégias que objetivam benefícios fisiológicos como jejum completo em dias alternados, regimes de jejum modificado e alimentação com restrição de tempo. Além disso, uma diversidade de estratégias com cunhos religiosos e espirituais também são praticadas (PATTERSON; SEARS, 2017).

Uma destas práticas religiosas bem conhecida e investigada na literatura é o Ramadan, um tipo de jejum intermitente praticado por muçulmanos com duração de um mês, que trata-se da privação de alimentos e bebidas do período do nascer ao pôr do sol durante um mês, que é tido como mês santo para esta população (ZARE A *et al.*, 2011).

Independente da prática, metabolicamente durante o período de jejum os níveis séricos de glicose diminuem e o pâncreas secreta glucagon, que inicia uma série de respostas no fígado com o objetivo de restaurar a homeostase. Nas primeiras horas de jejum, o combustível dispendido de glicogenólise se faz suficiente para suprir os tecidos extra-hepáticos com glicose. Com a continuação de uma situação de privação de energia, a síntese de glicose novamente provinda de outros substratos que não carboidratos (gliconeogênese) assume o comando na produção de glicose. Em jejum prolongado, a depleção de precursores gliconeogênicos como aminoácidos derivados do músculo, glicerol do tecido adiposo e a síntese de corpos cetônicos provenientes de acetil-coa (cetogênese) tornam-se a principal fonte de energia no fígado. Ambos cetogênese e gliconeogênese são dependentes de substratos extra-hepáticos (CAHILL, 2006; WALLIS; GONZALEZ, 2018).

O fígado responde ao jejum através de um programa transcricional abrangente, do qual dependem a glicogenólise, oxidação de ácidos graxos e cetogênese. Diversos fatores específicos de transcrição estão envolvidos nesta resposta complexa, estes também respondem a hormônios como o glucagon e glicocorticoides que quando ativados regulam os genes envolvidos em vias metabólicas que atuam para a recuperação da homeostase. A utilização de substrato no jejum predominantemente é alterada de glicogenólise para lipídeos (GOLDSTEIN; HAGER, 2015).

Em decorrência do período de sono, a maioria da população normalmente realiza jejum noturno, este pode variar de 8 a 12h de privação de energia, dependendo do estilo de vida, rotina de trabalho e padrões de alimentação (AIRD; DAVIES; CARSON, 2018).

Dadas as evidências existentes acerca da comparação de regimes de jejum *vs* outras estratégias nutricionais de restrição calórica contínua, autores sugerem que o jejum não parece exercer um efeito superior sob efeitos metabólicos gerais (BARNOSKY *et al.*, 2014; HARVIE; HOWELL, 2016; HEADLAND *et al.*, 2016; SEIMON *et al.*, 2015; VARADY, 2011).

Evidências de estudos em animais e evidências sugestivas de estudos em humanos apoiam uma necessidade de investigação clínica rigorosa do uso de regimes de jejum intermitente para melhora nas condições de saúde em vista de que a literatura carece de estudos com controle de jejum e alimentação mais rígidos (PATTERSON; SEARS, 2017).

Além disso, jejum ativa a via de indução de proteínas de choque térmico como a *HSP70* (variações de NAD⁺/NADH) e em sequência ativação de SIRT1, *HSF*, nesse caso exercício juntamente com jejum talvez potencializaria essa resposta. (CANTÓ *et al.*, 2010; NEWSHOLME; DE BITTENCOURT JR, 2014; PARDO; BORIEK, 2011; RODGERS *et al.*, 2005).

1.4 INTERAÇÃO JEJUM E EXERCÍCIO

Exercício e jejum representam quebra da homeostase, e a relação complexa entre nutrição, exercício, metabolismo e os mecanismos que estão envolvidos nessa interação ainda não são totalmente conhecidos (AIRD; DAVIES; CARSON, 2018).

Segundo Egan & Zierath (2013) a prática regular de exercício aeróbico melhora o metabolismo em diferentes tecidos periféricos: músculo esquelético, assim como no fígado e tecido adiposo (THOMPSON *et al.*, 2012; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

Em busca de estratégias que otimizem os benefícios do exercício com a ideia de que suas modificações benéficas poderiam ser potencializadas quando este realizado em jejum, algumas evidências já demonstram resultados positivos conforme destacado na Figura 3 sobre as respostas agudas que podem ser vistas em variados tipos de populações e diferentes desenhos experimentais (BACHMAN; DEITRICK; HILLMAN, 2016; BILET *et al.*, 2015; CHACKO, 2017; CHEN *et al.*, 2017; CIVITARESE *et al.*, 2005; CLUBERTON *et al.*, 2005; COYLE *et al.*, 1997; DE BOCK *et al.*, 2005; ENEVOLDSEN *et al.*, 2004; FARAH; GILL, 2013; FRAYN *et al.*, 2012; GONZALEZ, 2014; GONZALEZ *et al.*, 2013; NYGAARD *et al.*, 2017; PETER *et al.*, 2011; SHAW; CLARK; WAGENMAKERS, 2010; VIEIRA *et al.*, 2016).



Figura 3 - Principais fatores metabólicos e comportamentais influenciados pelo exercício aeróbico realizado jejum noturno. TAG, triacilglicerol; IMTAG, triacilglicerol intramuscular; GLUT4, transportador de glicose do tipo 4; FAT/CD36, ácido graxo translocase; CPT1, carnitina palmitoil transferase 1; PDK4, piruvato desidrogenase quinase 4; AMPK, proteína quinase ativada por AMP; NEFA, ácidos graxos não esterificados; IRS, substrato 2 do receptor de insulina. Fonte: Adaptado de Wallis & Gonzalez (2018).

De acordo com Michalsen & Li (2013) o jejum é uma estratégia que beneficia efeitos fisiológicos e contribui na prevenção de várias doenças crônicas não infecciosas. Estratégias de jejum sozinho ou em combinação com exercício físico são frequentemente usados para investigar a regulação do metabolismo intermediário (MAUGHAN; FALLAH; COYLE, 2010).

Exercício em jejum tem demonstrado melhorias a longo prazo no metabolismo de lipídios e glicose. O tecido adiposo desempenha um papel relevante para a lipemia pós-prandial através do armazenamento de gorduras ingeridas e minimizando o armazenamento impróprio ou demasiado de lipídios. A alta renovação dos estoques lipídicos do tecido adiposo tem sido associada à melhora da saúde metabólica (FRAYN *et al.*, 2012; PETER *et al.*, 2011). Sugerindo que a oxidação frequente dos ácidos graxos do tecido adiposo aumenta a capacidade do tecido adiposo de tamponar o fluxo lipídico. Modificações nos padrões de alimentação podem alterar a fisiologia do tecido adiposo com implicações a saúde (WALLIS; GONZALEZ, 2018).

No exercício em estado alimentado as respostas agudas nas vias moleculares do músculo esquelético associadas à regulação positiva do metabolismo oxidativo, lipídico e de carboidratos tendem a ser atenuadas (por exemplo, expressão gênica de FAT/CD36, CPT1,

UCP3, PDK4, GLUT4, AMPK α 2), enquanto aperfeiçoados no jejum os efeitos na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, sensibilidade à insulina e captação de glicose pelo tecido adiposo (CHEN *et al.*, 2017; CIVITARESE *et al.*, 2005; CLUBERTON *et al.*, 2005).

Além disso, em homens jovens eutróficos, exercícios em jejum noturno aumentaram a utilização de IMTAG em fibras musculares esqueléticas tipo 1 (DE BOCK *et al.*, 2005). Visto que altas taxas de renovação IMTAG implicam na manutenção da sensibilidade muscular à insulina em decorrência de ocasionar armazenamento e degradação para oxidação de ácidos graxos livres não esterificados (SHAW; CLARK; WAGENMAKERS, 2010).

Modificações geradas pelo treinamento a longo prazo nos marcadores de adaptação como o conteúdo de proteínas, de GLUT4, FAT/CD36 e FABP e as atividades aprimoradas das enzimas mitocondriais, CS e β -hidroxiacil-coA desidrogenase foram observadas com treinamento físico associado a jejum noturno (DE BOCK *et al.*, 2008; VAN PROEYEN *et al.*, 2010, 2011; WALLIS; GONZALEZ, 2018).

1.5 RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO E PAPEL CITOPROTETOR DAS HSP70

A resposta ao choque térmico (*HSR*, do inglês *heat shock response*), é vista como um mecanismo de proteção celular. Um dos sistemas mais altamente conservados existentes em todos os organismos em que foi analisado desde arque bactérias à animais (LINDQUIST; CRAIG, 1988).

Todos os organismos respondem ao calor induzindo a síntese de um grupo de proteínas de choque térmico, chamadas de *HSP* (do inglês *heat shock protein*). Em mamíferos, são separadas de acordo com seu peso molecular, nas seguintes famílias: *HSP100*, *HSP90*, *HSP70*, *HSP60* e *HSP20*. As proteínas de choque térmico estão fortemente presentes em células danificadas (tumoriais ou infectadas por vírus) (MULTHOFF, 2007). As *HSP* formam um grupo de proteínas altamente conservadas em todos os organismos, constituem um conjunto diversificado de proteínas que tem como função biológica a prevenção e correção de problemas de enovelamento proteico e agregação, os quais são responsáveis por diversas patologias. Em resposta ao estresse, a expressão de *HSP* previne agregação proteica, reconstitui proteínas danificadas, e promove a degradação de proteínas irreversivelmente desnaturadas, auxiliando no renovelamento de proteínas mal formadas e acumuladas por estresse fisiológico ou ambiental (ASEA; CALDERWOOD, 2010).

Em condições de ausência de estresse, as *HSP* são responsáveis por manter a homeostase proteica no citosol, facilitando o transporte, mediando assim um efeito citoprotetor. Os níveis de *HSP* intracelular regulados positivamente protegem as células de danos induzidos por estresse ambiental ou fisiológico. As da família de 70 quilodaltons (*HSP70*) foram identificadas como sendo as principais reguladoras do sistema imunológico do hospedeiro, bem como as *HSP90* (MULTHOFF, 2007).

A ação anti apoptótica da *HSP70* se dá por impedir a saída do citocromo C da mitocôndria, quando em meio intracelular produz efeito antiinflamatório por meio da interação fatores de transcrição nucleares da família κ B (NF κ B), bloqueando sua translocação para o núcleo e dessa maneira cessando processo inflamatório (HOMEM DE BITTENCOURT *et al.*, 2007; KRAUSE *et al.*, 2015).

Enquanto a AMPK (Proteína Kinase ativada por AMP) é vista como guardiã do metabolismo e homeostase mitocondrial e encontra-se ativada quando em privação energética celular, como por exemplo em situações de jejum e exercício. Quando ATP está diminuído e AMP elevado, a AMPK é responsável por ativar as vias catabólicas designadas para produzir energia por meio do metabolismo oxidativo e na biogênese mitocondrial, ao mesmo tempo que inativa vias anabólicas que consomem ATP (lipogênese) AMPK também é responsável pelo aumento da SIRT1, por meio do aumento de NAD oxidado(NAD⁺) e diminuição de NAD reduzido (NADH), que posteriormente ativa a via de resposta ao choque térmico e PGC1 α , aumentando biogênese mitocondrial (CANTÓ *et al.*, 2009; MENSHIKOVA *et al.*, 2006; TONKONOJI; SAHLIN, 2002; ZANG *et al.*, 2004).

Ao mesmo tempo que a proteína SIRT1 também se encontra ativa em ambientes de privação de energia celular, em decorrência do aumento das razões NAD⁺/NADH. Trabalhando como importante proteína deacetilase removendo grupamento acetil de proteínas específicas regulatórias do metabolismo, como PGC1 α , responsável quando deacetilada por aumento na biogênese mitocondrial proporcionando maior eficiência na produção energética. Além disso a sirtuína 1 constitui a via de choque térmico iniciando a *HSR*, responsável pela síntese da proteína de choque térmico de 70kDa (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012).

Embora as respostas em cada organismo sejam variadas, alguns comportamentos das *HSP* se repetem, ainda que a gama de indutores sofra variação de organismo para organismo. Mais recentemente também se viu que as *HSP* ou seus parentes mais próximos estão presentes em todos os organismos em temperaturas normais e desempenham papéis vitais na função celular normal. Esta última descoberta forneceu informações importantes sobre as funções moleculares específicas das proteínas. Uma das suposições iniciais da resposta ao choque

térmico era que as *HSP* protegem a célula de efeitos tóxicos do calor e de outros estresses. Primeiro porque a resposta de indução das *HSPs* é rápida e intensa, ou seja, de emergência. E segundo que existe uma relação entre a temperatura de indução e o ambiente em que o organismo se encontra. E o mais convincente dos argumentos é a forte correlação entre sua indução e a indução da termotolerância um grupo de células ou organismos quando deslocado diretamente de sua temperatura normal de crescimento para uma temperatura mais alta é morto rapidamente, enquanto um grupo correspondente dado um tratamento suave para induzir *HSPs* é morto mais lentamente (LINDQUIST; CRAIG, 1988).

Tratamentos pré aquecimento induzem tolerância a outras formas de estresse, e outras formas de estresse induzem tolerância ao calor. Assim então as proteínas de choque térmico são induzidas por estresse moderado, que não necessariamente letais, a fim de proteger os organismos de estresses mais severos. O sistema parece fazer um sentido biológico eminente (LINDQUIST; CRAIG, 1988).

As *HSP70*, 60 e 90KDa são as mais abundantes até agora nos organismos e células investigados. O aumento na síntese de proteínas de choque térmico sob condições de estresse é conhecido há pouco mais de 50 anos até onde se tem conhecimento (BECKER; CRAIG, 1994). O que ainda se investiga é a função das *HSPs*, contudo já se sabia que estão diretamente ligadas em processos vitais como de biogênese mitocondrial, e por conta desse envolvimento são chamadas de chaperonas moleculares (ELLIS; VAN DER VIES, 1991).

Os genes *HSP70* codificam abundantes *HSPs* de 70KDa induzíveis pelo calor, todas as *HSP70* e proteínas relacionadas tem alta afinidade com ATP (CHAPPELL *et al.*, 1986; WELCH; FERAMISCO, 1985). Muitas delas são abundantes nas células e frequentemente encontradas em associação com outras proteínas (LINDQUIST; CRAIG, 1988). Todos os organismos tem ao menos uma *HSP70* no citosol, em mamíferos existe uma abundante forma constitutiva *HSP73* e uma forma induzível *HSP72*. Condições de estresse comprometem a integridade estrutural de proteínas, o que expõe domínios interativos ocultos, as *HSPs* funcionando como chaperonas se ligam a essas proteínas danificadas protegendo esses domínios e impedindo que essas proteínas se agreguem. A estabilização de proteínas danificadas em uma conformação parcialmente “dobrada” pode fornecer a oportunidade de redobramento ou degradação daquelas danificadas. (BECKER; CRAIG, 1994).

A transcrição de *HSP70* bem como outras *HSP* é induzível pelo fator de transcrição de choque térmico conhecido como *HSF* (do inglês *heat shock factor*). Controlada por uma alça reguladora que liga a função de *HSP70* a atividade de *HSF* (ABRAVAYA *et al.*, 1992; STONE; CRAIG, 1990).

A ligação de proteínas parcialmente desdobradas esgota o montante de proteínas de choque térmico de 70KDa livres, que possivelmente desencadeia a *HSP*. A expressão aumentada de *HSP70* satisfaz a demanda por mais chaperonas *HSP70*, um *pool* restabelecido de *HSP70* não ligado reprime a transcrição, possivelmente por ligação direta ao *HSF* (BALER; WELCH; VOELLMY, 1992).

Portanto, a capacidade de *HSP70* de se ligar a proteínas fornece os meios para proteger a célula e regula sua própria expressão em resposta a mudanças no ambiente (CRAIG; GROSS, 1991; MORIMOTO, 1993) que podem ser vistas em situações como jejum e/ou exercício.

Asea *et al.* (2000) demonstraram que a *HSP70* exógena atua como uma citocina para monócitos humanos estimulando uma cascata de transdução de sinal pró-inflamatória que resulta em uma regulação positiva na expressão de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α :via dependente de CD14 e cálcio intracelular. E uma via independente de CD14 mas dependente de cálcio intracelular que resulta na produção de TNF- α mas não de IL-1 β ou IL-6. Assim, *HSP70* funciona em um papel duplo atuando tanto como citocina, que são proteínas reguladoras secretadas por células, modificando as propriedades funcionais das células imunocompetentes, quanto como acompanhante (chaperona).

Esse duplo papel, tanto como chaperona quanto como citocina, elucida que *HSPs* podem ser potentes indutoras de respostas imunes e poderosas indutoras de imunidade antitumoral. Sendo assim a indução de *HSPs* por meio do exercício provém um possível alvo terapêutico capaz de proporcionar melhorias metabólicas para doenças de caráter inflamatório.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Investigar o efeito subagudo de uma sessão de exercício aeróbico, em jejum ou no estado alimentado, em ratos wistar machos sedentários sobre variáveis metabólicas e sinalização celular.

2.1.2 Objetivos específicos

Verificar as concentrações plasmáticas de:

- Glicose
- Triglicerídeos
- Colesterol

- Proteínas totais
- Lactato

Verificar as concentrações de glicogênio e triglicerídeos nos seguintes tecidos:

- gastrocnêmio
- sóleo
- tecido adiposo marrom
- fígado

Determinar o imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 nos seguintes tecidos:

- gastrocnêmio
- sóleo
- tecido adiposo marrom
- fígado.

2.2 TIPO DE ESTUDO, POPULAÇÃO E AMOSTRA

2.2.1 Abordagem Experimental

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

2.2.2 Animais

Foram utilizados ratos wistar rattus norvegicus (n=32) provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade do Rio Grande do Sul, com 60 dias de idade. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS. Seguiram-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%, com ração e água *ad libitum*. 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 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (protocolo 34271).

2.2.3 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). Assim, estimou-se um “n” total igual a 30 animais.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Conforme ilustrado na Figura 4, todos os animais realizaram uma semana de aclimação à esteira, que consistiu em cinco sessões diárias de 15min em velocidade de 5m/min sem inclinação da esteira. Um período de *washout* de 5 dias, entre o último dia de aclimação e a sessão de exercício agudo, foi incluído para evitar quaisquer adaptações ou efeitos subagudos da última sessão de aclimação. Ao final disso, os animais foram alocados aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais: repouso alimentado (REA), exercício alimentado (EXA), repouso em jejum (REJ) e exercício em jejum (EXJ).

Antes da sessão de exercício, os animais dos grupos REJ e EXJ foram submetidos a um período de jejum noturno de 8 h. O exercício agudo consistiu em uma sessão de 30 min na esteira, com velocidade correspondente a uma intensidade de 60% do $VO_{2m\acute{a}x}$ (10m/min, sem inclinação), segundo Rodrigues *et al.* (2007). Para testar os efeitos subagudos de nossa intervenção, os animais foram eutanasiados 12h após a sessão de exercícios. Os animais de grupos controle foram mantidos em repouso e mortos ao mesmo tempo. Os animais foram mortos por decapitação e as amostras de sangue, fígado, coração, sóleo, gastrocnêmio e tecido adiposo marrom foram coletados. As amostras de sangue foram centrifugadas (10min, 1510x g), e o soro foi usado para avaliar os níveis de glicose, proteínas totais, colesterol total, triglicerídeos e lactato. As concentrações de glicogênio e triglicerídeos foram determinadas para as amostras dos tecidos. O imunoconteúdo de HSP70, sirtuína 1 (SIRT1) foi determinado para amostras de músculo esquelético, fígado e tecido adiposo marrom.

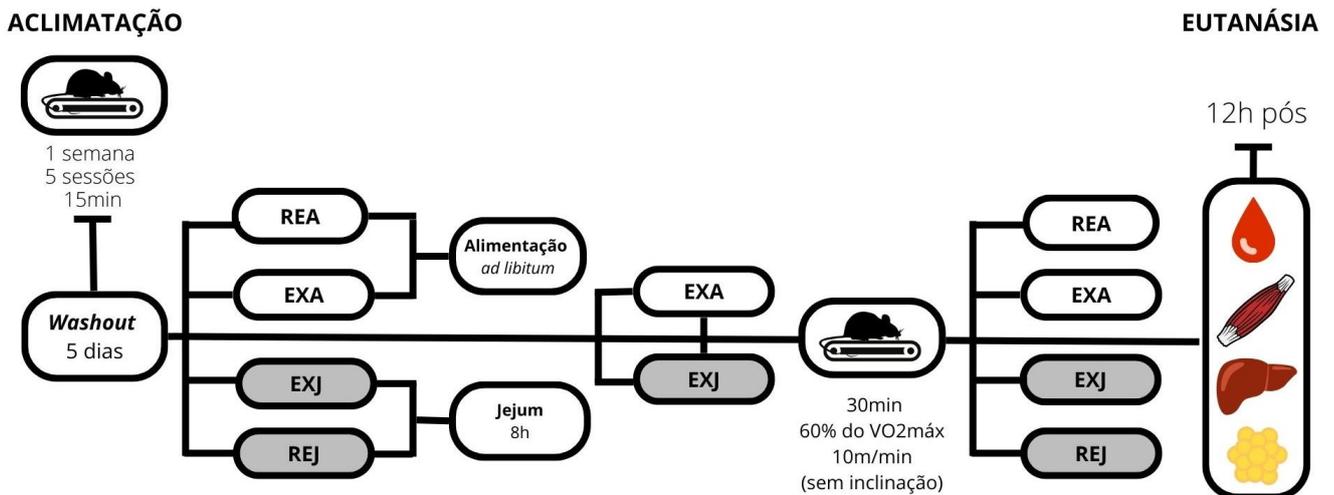


Figura 4 - Desenho experimental. REA, Repouso alimentado; EXA, Exercício alimentado; EXJ, Exercício jejum; REJ, Repouso jejum.

3 INSTRUMENTOS DE MEDIDA E PROCEDIMENTOS DE COLETA

3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Glicose, lactato, colesterol total, triglicerídeos e proteínas totais foram quantificados com a utilização de kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) para análise. As concentrações de glicose, triglicerídeos, e colesterol total foram expressas em $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ de soro, proteínas totais em $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ e lactato em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.1.1 Amostras de tecido

Resumidamente, as amostras de tecido foram primeiramente homogeneizadas com 30% de KOH, depois lavadas com etanol, hidrolisadas com HCl 4N, neutralizadas com Na_2CO_3 2M e finalmente diluídas com água destilada.

3.1.1.1 Triglicerídeo tecidual

Para extrair os triglicerídeos teciduais, as amostras de tecido foram homogeneizadas com solução salina a 0,9% e a concentração de triglicerídeos foi determinada com o mesmo kit usado para o ensaio de plasma (MODEL *et al.*, 2021). Os resultados foram expressos em mg de triglicerídeos.g de tecido⁻¹ (peso úmido).

3.1.1.2 Glicogênio tecidual

A concentração de glicogênio nas amostras de tecido foi determinada como descrito anteriormente (MODEL *et al.*, 2021). 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 a 4°. Terminada essa etapa, os tubos foram invertidos para que fosse descartado o sobrenadante.

O glicogênio foi ressuspensão 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 ressuspensão 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 10μL 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. As concentrações de glicogênio foram determinados como equivalentes de glicose usando um kit de glicose e expressas como mg de glicogênio.g de tecido-1 (peso úmido).

3.2 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%. Parte do tecido adiposo marrom, fígado, músculos sóleo e gastrocnêmio foram processados por homogeneizador de facas (Ultra Stirrer modelo Ultra.80 ser.no: 175418) em SDS 0,1 % (5 mL/ g de tecido) e coquetel de inibidores de protease e fosfatase. A concentração proteica foi determinada por kit BCA (Thermo Fisher) e preparadas com solução de Laemmli (LAEMMLI, 1970), fervidas 5 min a 100 °C e aplicados 40 μg de proteína 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, a uma diferença de potencial de 100V.

A fim de conferir 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 30 minutos 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 *overnight* a 4°C no anticorpo primário e em temperatura ambiente por 1 h com os anticorpos secundários ou terciário, quando necessário, lavando-se três vezes de 10 min em *TTBS* entre as incubações. Para determinar a expressão de HSP72 e HSP73 foi utilizado anticorpo monoclonal anti HSP70 1:1000 (Sigma Aldrich H5147) que reconhece tanto a forma induzível de 72 kDa quanto a forma constitutiva de 73 kDa.; como anticorpo secundário foi utilizado o anti-*mouse* peroxidase HRP 1:10000 (Sigma Aldrich A9044); para SIRT1 foi utilizado anticorpo policlonal anti SIRT1 1:500 (Sigma Aldrich 2501994), com secundário biotilado anti-*goat* 1:50000 (Sigma Aldrich B7014) e terciário streptavidina 1:1000 (Sigma Aldrich S2438); como normalizador foi utilizado GAPDH detectado pelo anticorpo policlonal anti GAPDH 1:1000 (Sigma Aldrich G9545), como anticorpo secundário foi utilizado anti-*rabbit* 1:10000 (Sigma Aldrich A0545), diluídos em *BSA* 0,1% com *TTBS*. A reação de quimiluminescência se deu por meio do sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (utilizado kit comercial *ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent*. GERPN2106, Sigma Aldrich).

Após a incubação com a solução de quimiluminescência por 3 minutos, as membranas de NC foram reveladas no equipamento (*ImageQuant™ LAS 4000*) *Video Documentation System* de aquisição digital e processamento de imagens 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 (GAPDH).

4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição dos dados e, posteriormente, ao teste de homogeneidade de Levene. Os dados paramétricos foram analisados usando ANOVA de duas vias para comparar os efeitos do jejum (alimentado × jejum) e exercício (repouso × exercício), bem como a interação entre esses fatores, com o post hoc de Bonferroni para dados homogêneos ou Games-Howell para dados não homogêneos. Os dados não paramétricos foram examinados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo pós-teste de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. As análises foram feitas com o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 25.0, IBM, Armonk, NY, EUA) e os gráficos representativos foram feitos utilizando o *Graph Pad Prism* versão 8.0.1.

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 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (número 34271).

6 RESULTADOS

6.1 GLICEMIA

Conforme figura 5 a concentração de glicemia nos animais não apresentou diferença entre os diferentes protocolos jejum $p=0,440$ e exercício $p=0,065$. Tão pouco entre a combinação dos protocolos jejum e exercício $p=0,303$.

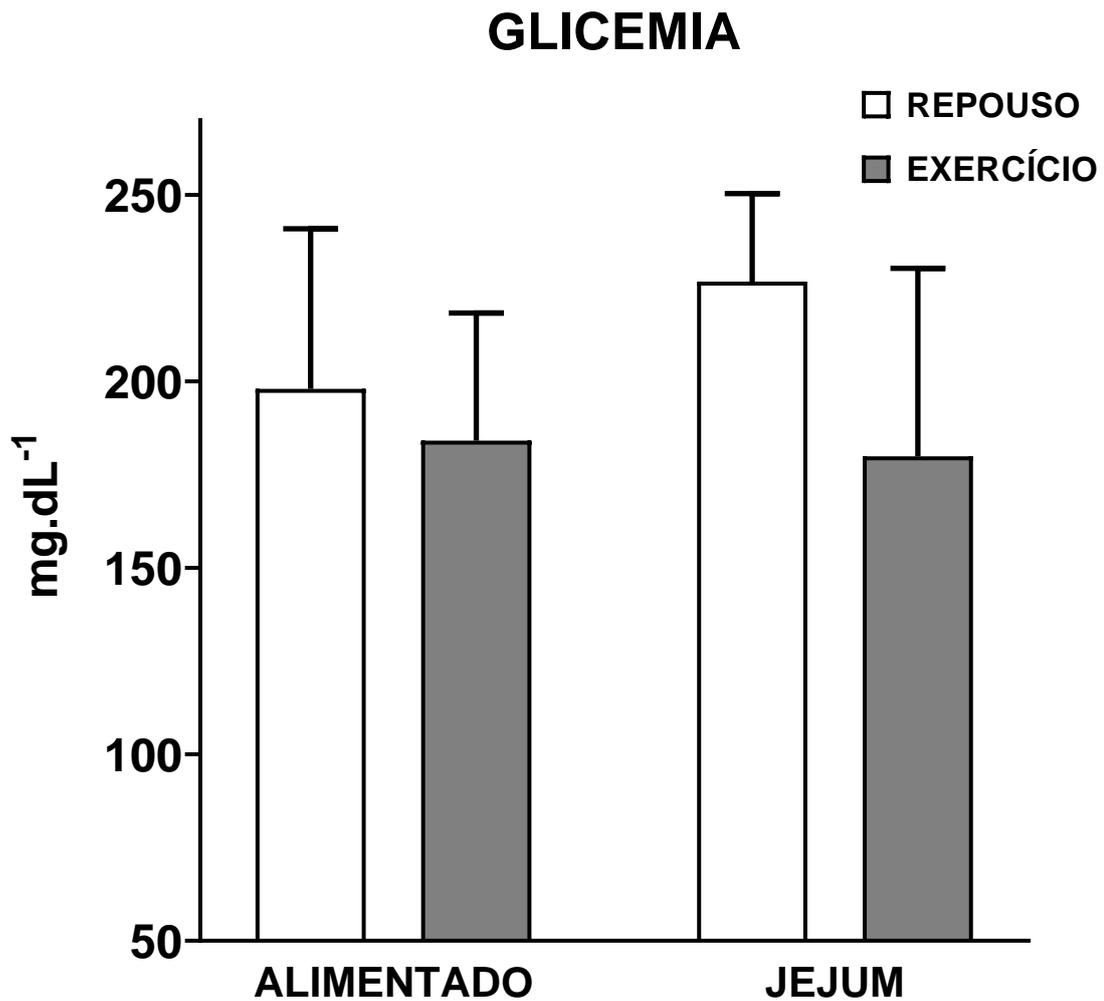


Figura 5 - Concentração de glicose. Concentração de glicose ao final do tratamento experimental. Dados expressos como média \pm DP. Valor de $p > 0,05$.

6.2 TRIGLICERIDEMIA

A concentração de triglicérides ao final do tratamento não apresentou resultado significativo tanto em relação ao jejum quanto ao exercício e a combinação dos dois protocolos ($p=0,278$, $p=0,615$ e $p=0,214$, respectivamente) conforme Figura 6 a seguir.

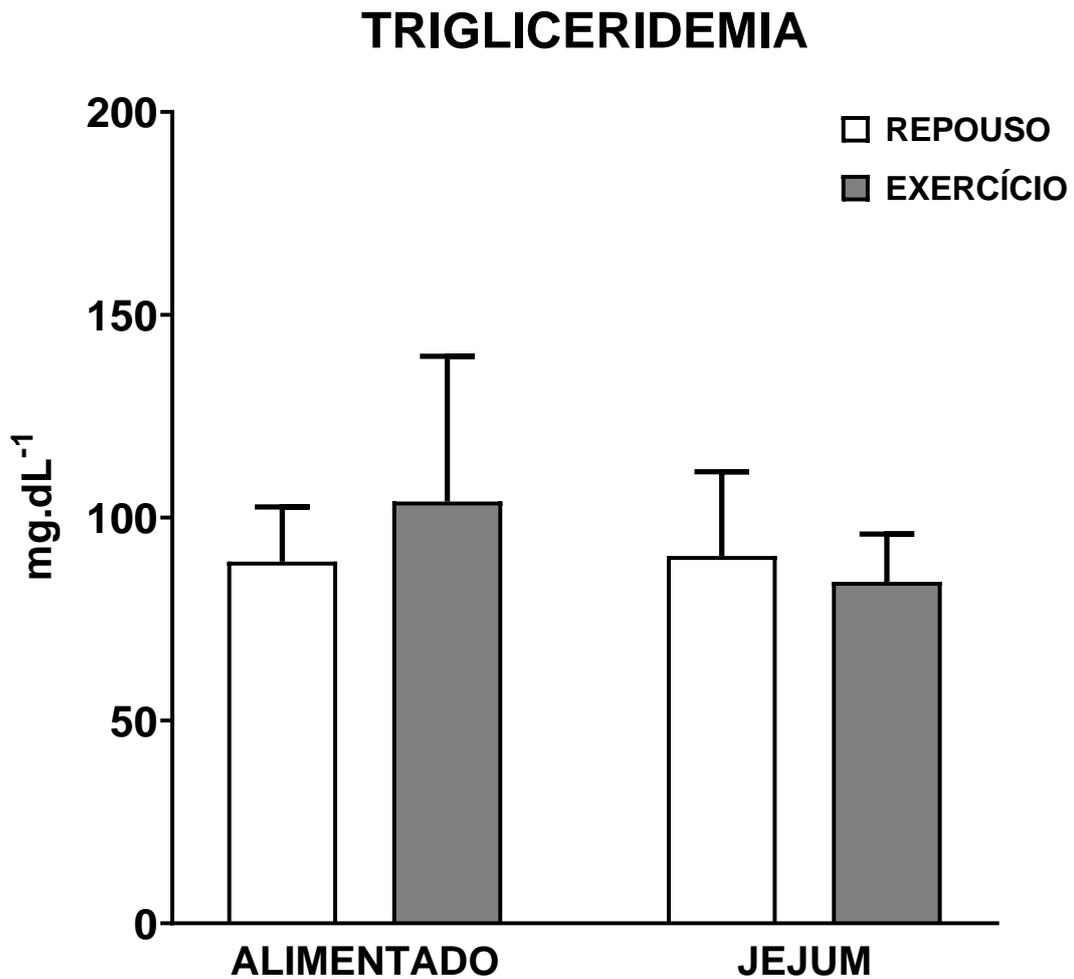


Figura 6 - Concentração de triglicerídeos. Concentração de triglicerídeos ao final do tratamento experimental. Dados expressos como média \pm DP. Valor de $p > 0,05$.

6.3 COLESTEROLEMIA

Em relação a colesterolemia dos animais tanto o jejum quanto o exercício diminuíram a concentração de colesterol total ($p=0,023$ e $p=0,005$, respectivamente). No entanto a combinação de exercício e jejum não apresentou diferença significativa ($p=0,216$). Conforme demonstrado na Figura 7.

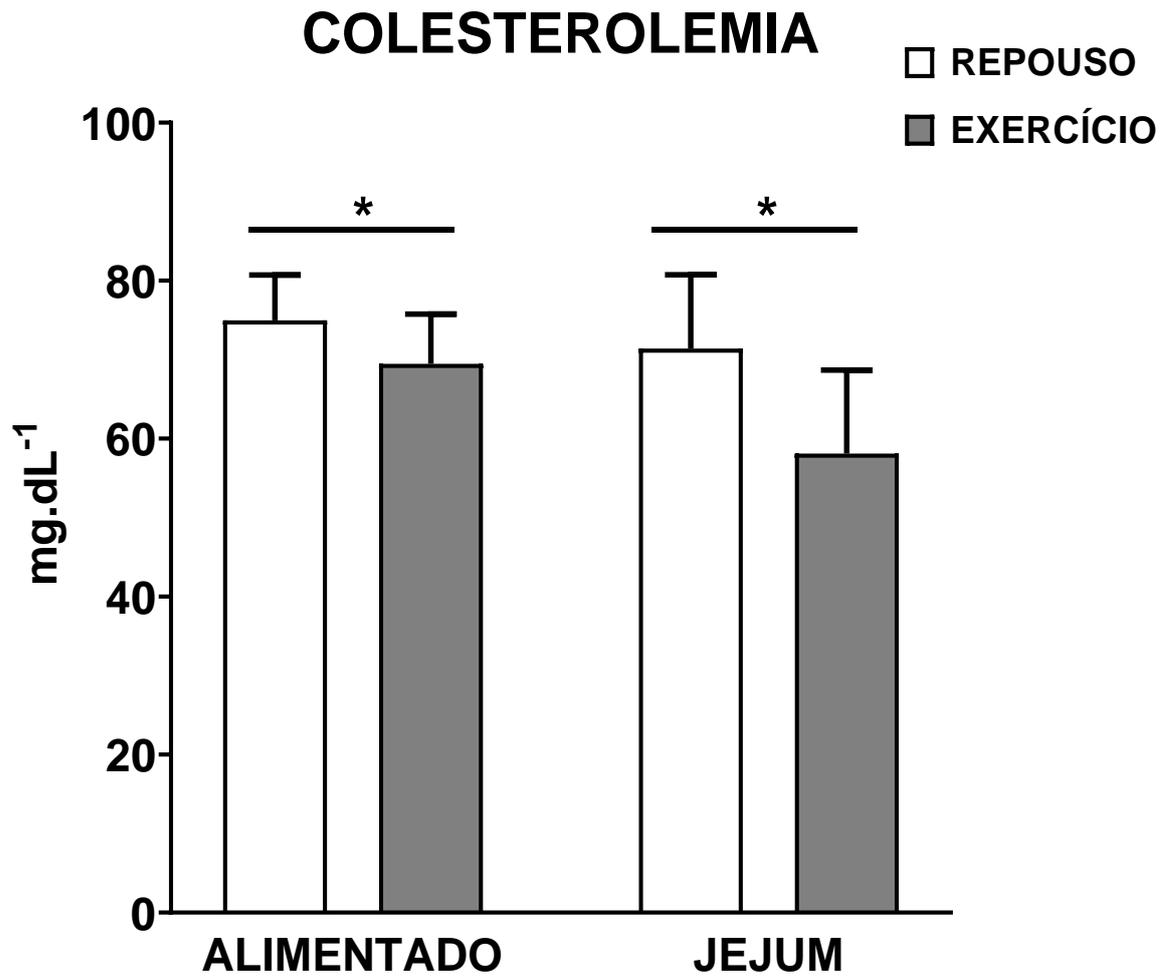


Figura 7 - Concentração plasmática de colesterol total. Concentração plasmática do colesterol total ao final de tratamento experimental. Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0,05$. * representa diferença significativa entre os grupos.

6.4 PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais não apresentou diferença significativa entre os grupos jejum e exercício ($p=0,877$ e $p=0,618$, respectivamente) e jejum + exercício ($p=0,110$) conforme demonstrado na Figura 8.

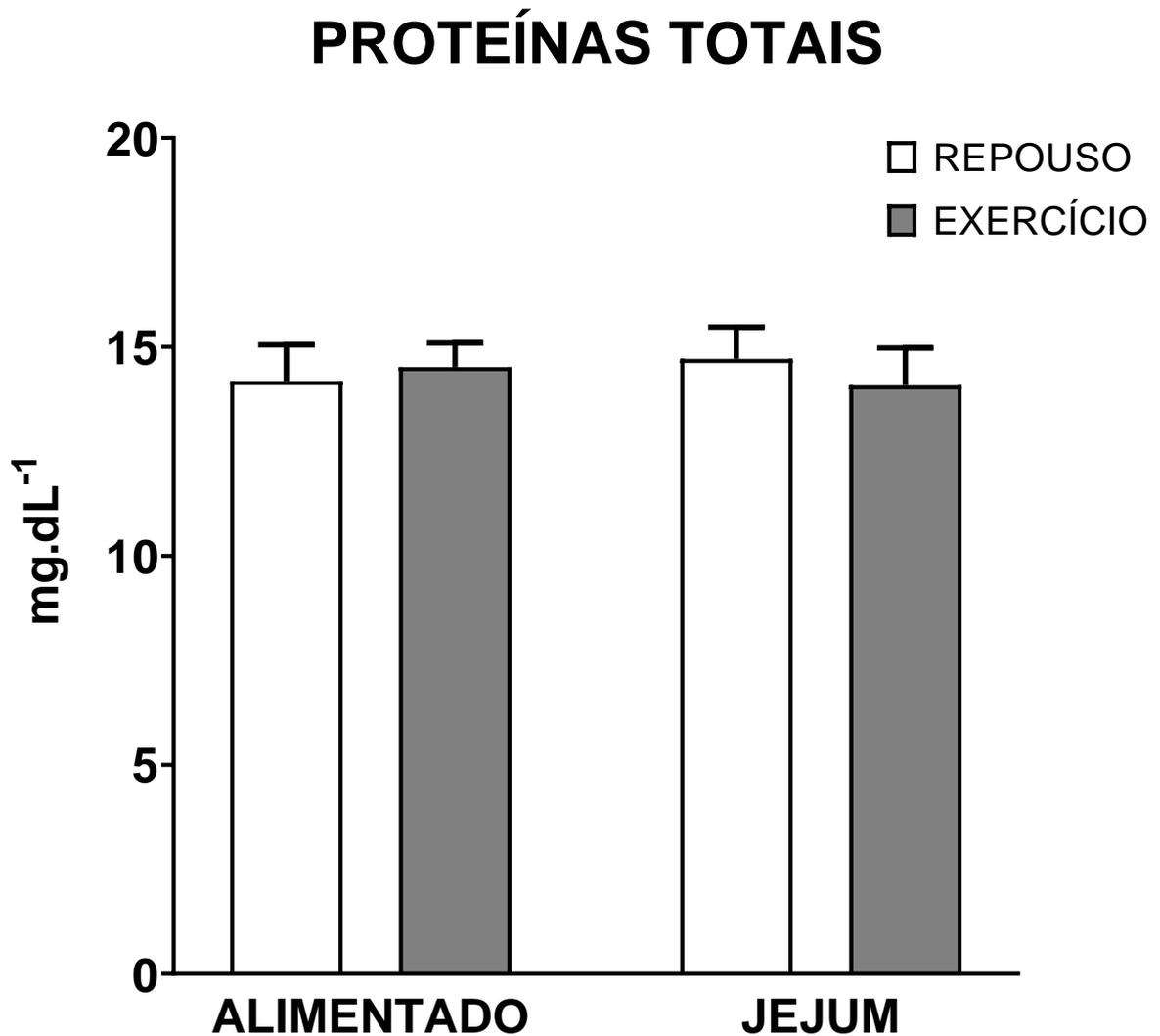


Figura 8 - Concentração de proteínas totais. Concentração de proteínas totais no plasma ao final de tratamento experimental. Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p > 0,05$.

6.5 LACTATEMIA

A concentração plasmática de lactato, de acordo com os dados apresentados na Figura 9, aumentou na condição de jejum ($p=0,001$), enquanto a interação de exercício e jejum não resultou em mudanças significativas.

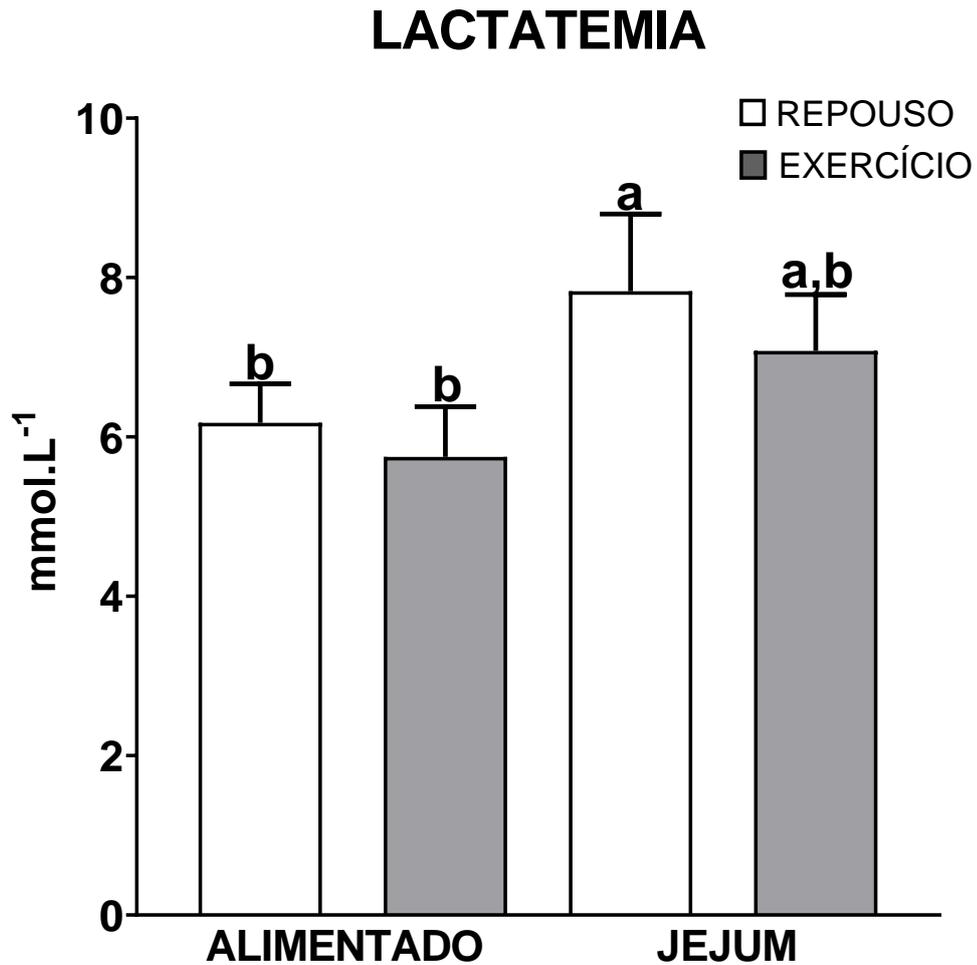


Figura 9 - Concentração plasmática de lactato. Concentração plasmática de lactato ao final de tratamento experimental. Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0,05$. Letras representam diferença significativa entre cada grupo experimental.

6.6 GLICOGÊNIO

Em relação a concentração de glicogênio nos tecidos, 12h pós uma sessão de exercício aeróbico em jejum ou em estado alimentado, pode-se observar, conforme o que mostra a figura 10, que o jejum aumentou o glicogênio apenas no músculo sóleo ($p=0,039$), enquanto os outros tecidos não apresentaram diferença significativa.

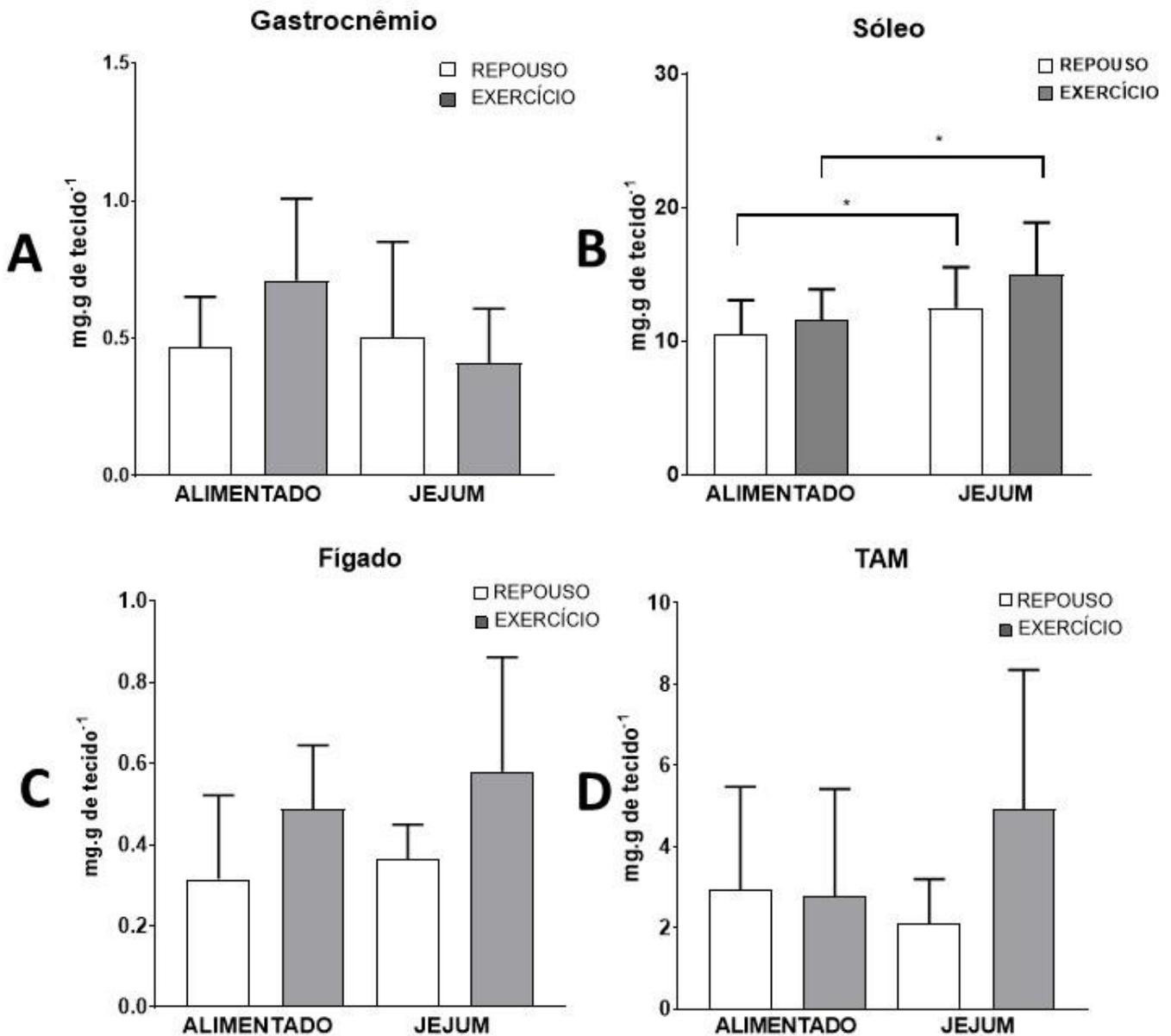


Figura 10 - Concentração de glicogênio nos tecidos. Concentração de glicogênio nos tecidos ao final do protocolo experimental: Gastrocnêmio (A), Sóleo(B), Fígado (C), Tecido Adiposo Marrom (TAM) (D). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$. *representa diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$.

6.7 TRIGLICERÍDEOS

Conforme demonstrado na Figura 11, o jejum aumentou triglicerídeos no fígado ($p=0,025$) e o exercício em jejum foi capaz de aumentar a concentração de triglicerídeos no tecido adiposo marrom ($p=0,010$). Enquanto nos músculos gastrocnêmio e sóleo não se obtiveram alterações significativas.

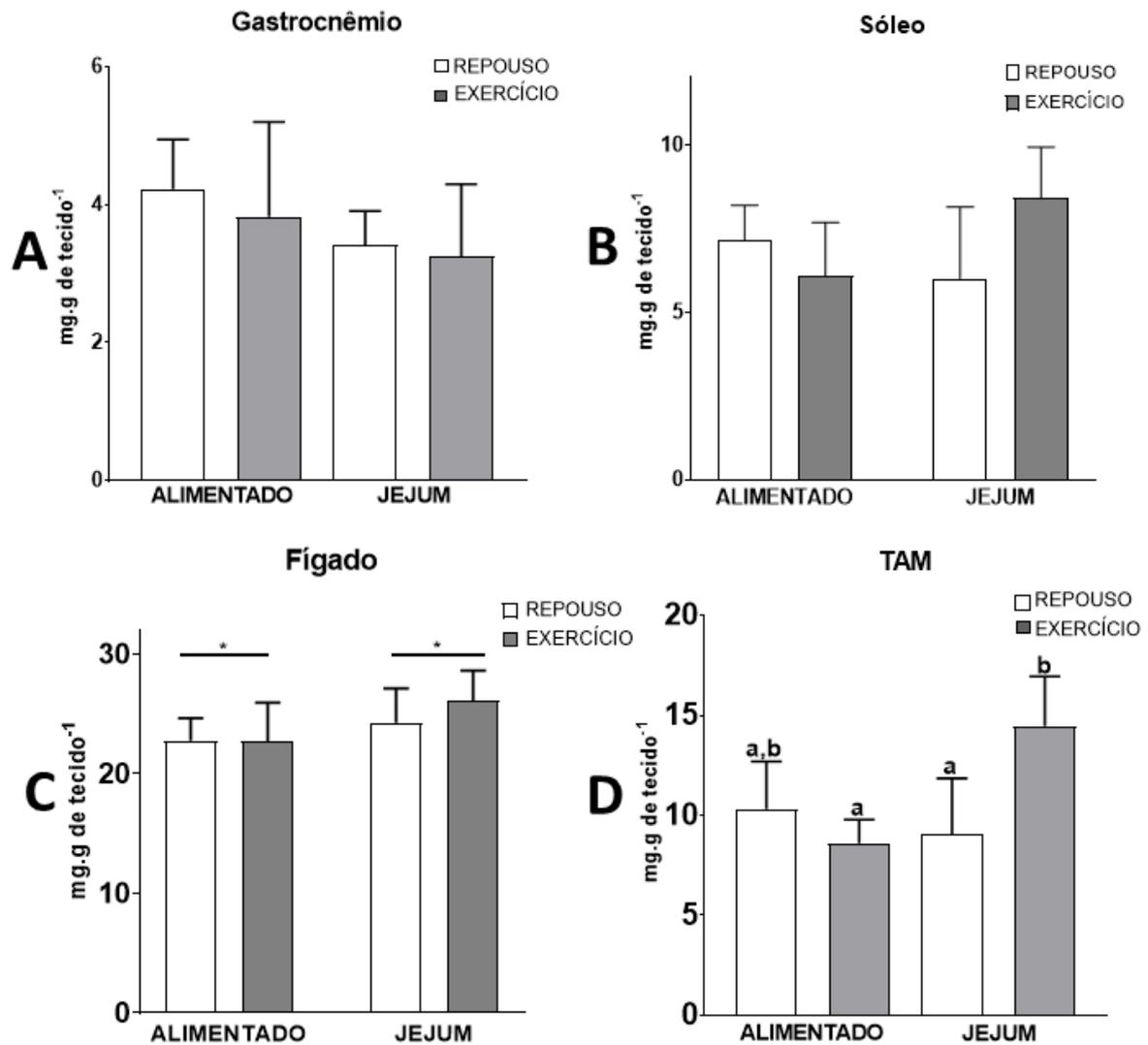


Figura 11 - Concentração de triglicerídeos nos tecidos. Concentração de triglicerídeos ao final do tratamento experimental. Gastrocnêmio (A), Sóleo (B), Fígado (C), Tecido Adiposo Marrom (TAM) (D). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$. Letras representam diferença significativa entre cada grupo experimental.

6.8 IMUNOCONTEÚDO DE SIRT1 E HSP70 NOS TECIDOS

O imunocnteúdo de proteínas de choque térmico *HSP70* e da sirtuína1 não apresentaram resultados estatisticamente significativos em nenhum dos tecidos: músculo sóleo e gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo marrom, conforme demonstrado a seguir nas Figuras 12, 13, 14, 15 respectivamente.

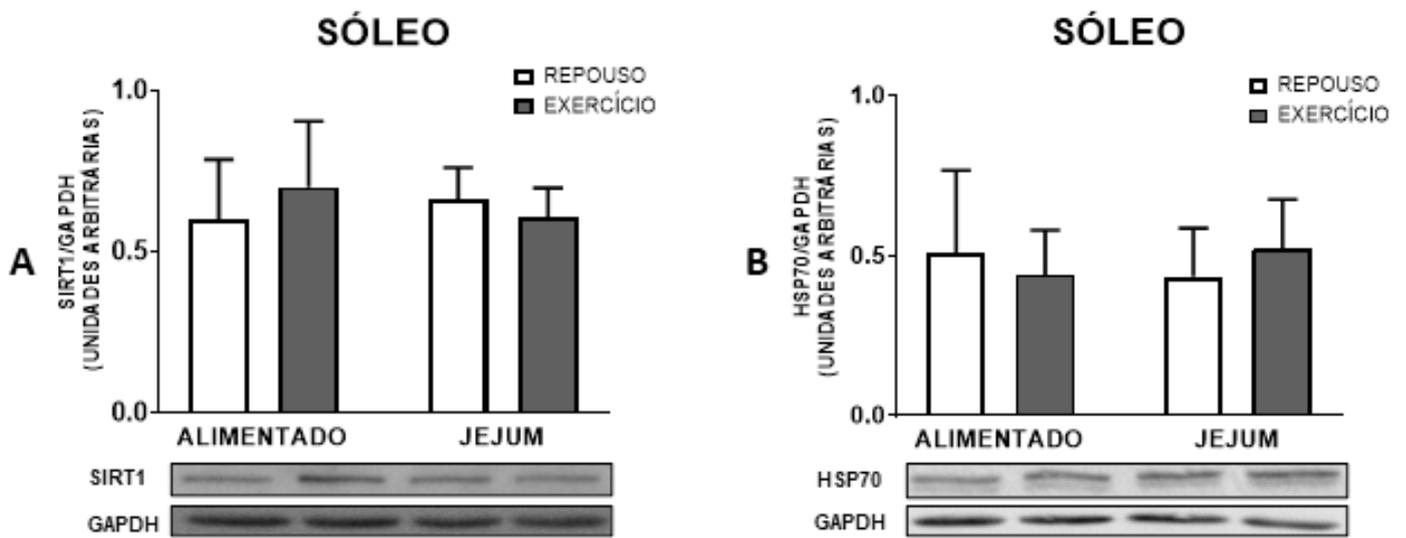


Figura 12 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no sóleo. Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no músculo sóleo no tempo de 12h pós protocolo experimental. SIRT1 (A), HSP70 (B). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$.

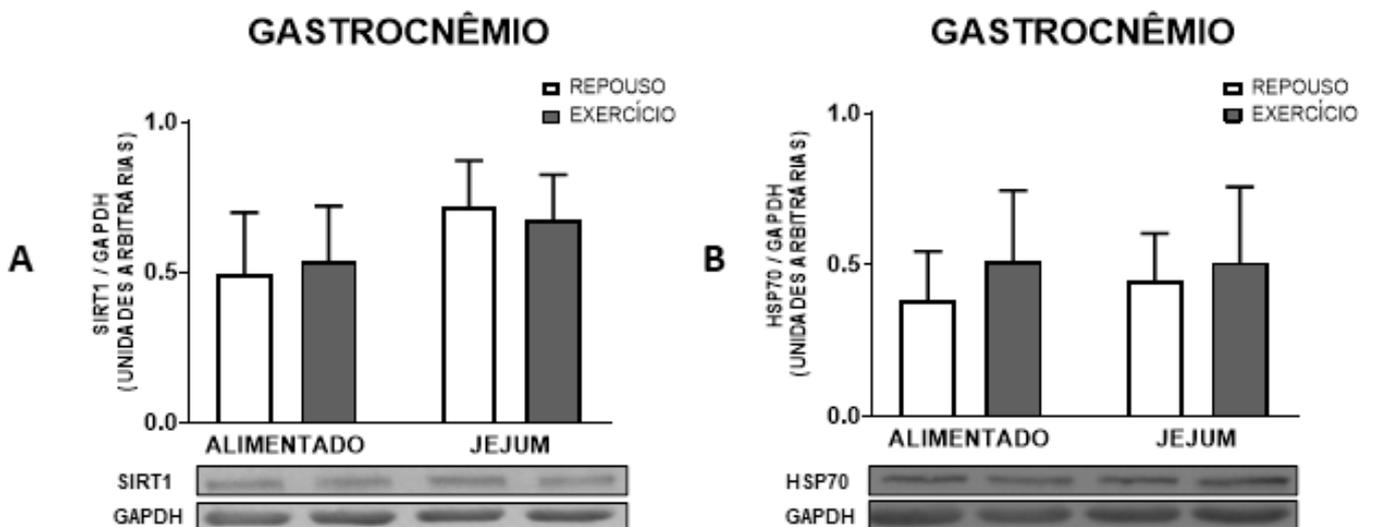


Figura 13 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no gastrocnêmio. Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no músculo gastrocnêmio no tempo de 12h pós protocolo experimental. SIRT1 (A), HSP70 (B). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$.

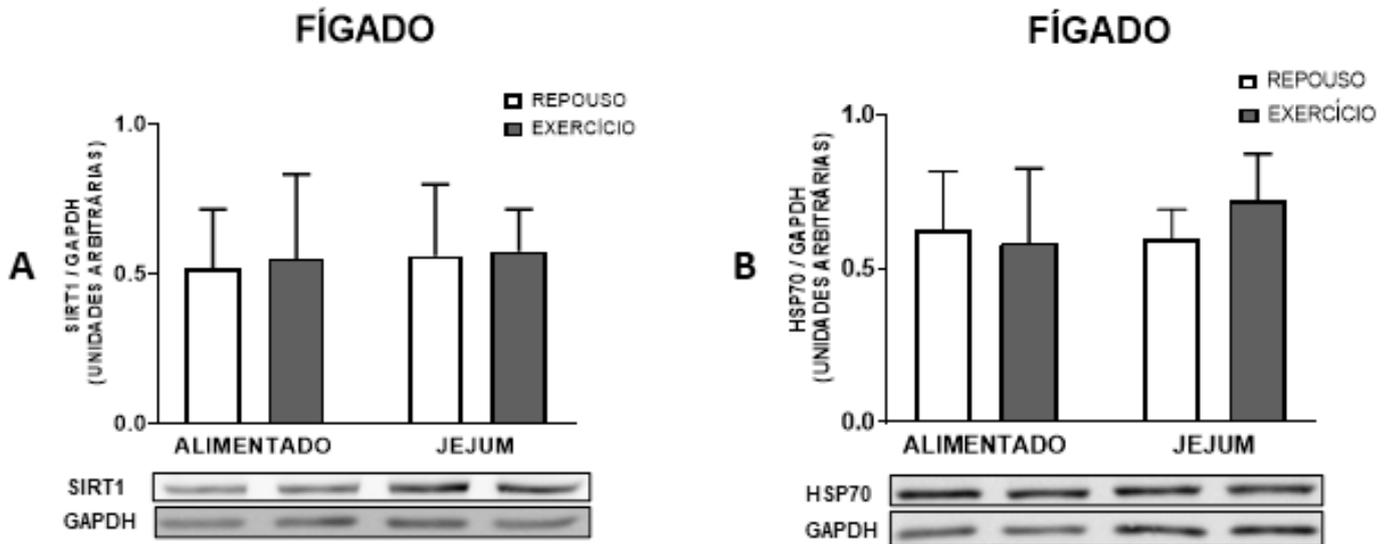


Figura 14 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no fígado. Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no fígado no tempo de 12h pós protocolo experimental. SIRT1 (A), HSP70 (B). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$.

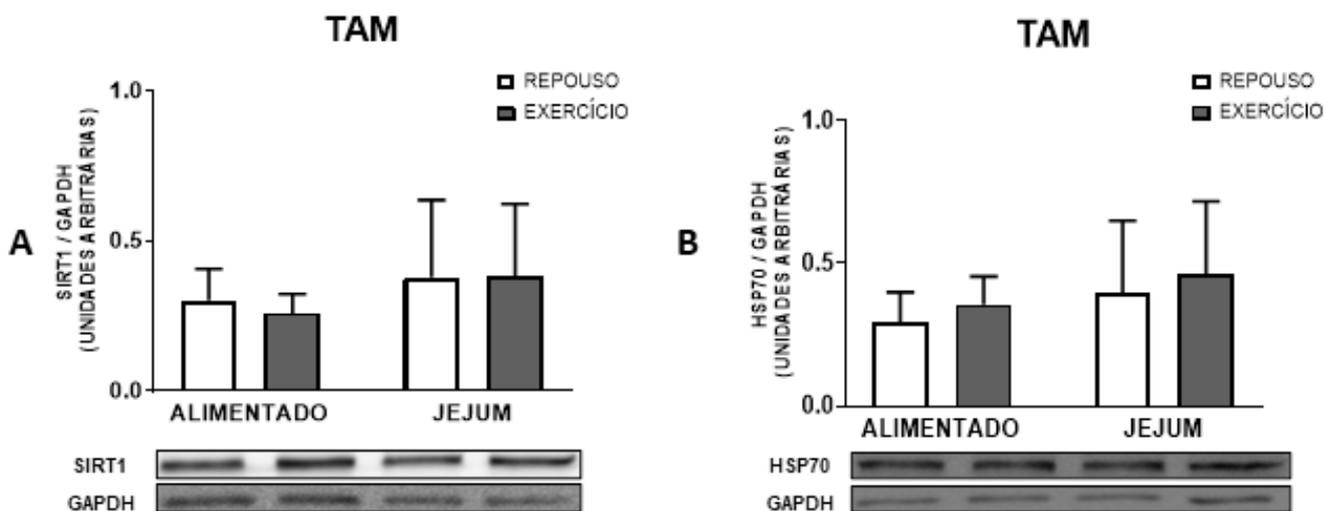


Figura 15 - Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no tecido adiposo marrom. Imunoconteúdo de SIRT1 e HSP70 no tecido adiposo marrom (TAM) no tempo de 12h pós protocolo experimental. SIRT1 (A), HSP70 (B). Dados expressos como média \pm DP. Valor de significância $p < 0.05$.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho faz parte de um estudo "guarda-chuva" que visa analisar os efeitos de uma única sessão de exercício físico aeróbico, de intensidade moderada, realizado no estado alimentado ou em jejum, em ratos Wistar sedentários magros e sedentários obesos (obesidade induzida por dieta hiperlipídica). Nesse projeto, os tecidos biológicos dos diferentes grupos foram analisados em tempos distintos após a finalização do exercício e/ou jejum, sendo eles: i) imediato; ii) 12 horas e iii) 24 horas pós-exercício.

Em nosso estudo, tivemos como principal objetivo avaliar os efeitos subagudos (12 horas) de uma sessão de exercício aeróbico de intensidade moderada, realizado no estado alimentado ou em jejum, sobre parâmetros metabólicos e de sinalização celular, em ratos macho magros sedentários. Conforme apresentado nos resultados, os principais efeitos que perduraram até 12 horas pós-exercício foram: i) redução na concentração plasmática de colesterol total nos animais dos grupos jejum (repouso e exercício); ii) aumento na concentração de lactato plasmático no grupo jejum; iii) aumento na concentração de glicogênio no músculo sóleo dos grupos jejum (repouso e exercício) e iv) aumento do conteúdo de triglicerídeos no tecido adiposo marrom do grupo de animais que realizou exercício em jejum. Esses resultados não foram acompanhados por mudanças significativas na expressão das proteínas SIRT1 e HSP70, em nenhum dos tecidos analisados (fígado, tecido adiposo marrom, músculos gastrocnêmio e sóleo), ao menos no tempo de recuperação estudado.

Já é bem demonstrado na literatura que um grande número de doenças está relacionado ao sedentarismo, dentre elas a obesidade. Ambas mudanças metabólicas (sedentarismo e obesidade) induzem rapidamente resistência à insulina, o que resulta no aparecimento de diversas doenças, tais como dislipidemia, diabetes Mellitus tipo 2, disfunção endotelial, hipertensão, doença renal, entre outras (KNUDSEN *et al.*, 2012; NEWSHOLME; KRAUSE, 2014). Embora indivíduos obesos apresentem uma diminuída capacidade muscular oxidativa, uma das principais medidas não farmacológicas de combate à obesidade é a realização regular de exercícios físicos, devido à sua capacidade de melhorar o perfil metabólico e capacidade oxidativa de seus praticantes (CARBONE *et al.*, 2019; FUJITA *et al.*, 2018). Levando em consideração todos os aspectos relacionados à obesidade e como o exercício físico pode combatê-los, a prática de exercícios no estado de jejum tem ganhado espaço e popularidade. A principal hipótese para a realização de tal prática é que o jejum poderia potencializar os efeitos metabólicos, particularmente em lipídeos, induzidos pelo exercício.

É sabido que uma única sessão de exercício aumenta o conteúdo de mRNA muscular do PGC-1 α , que é um regulador chave da biogênese mitocondrial (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003; WU *et al.*, 1999). Além disso, o exercício induz a expressão de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FAT/CD36) e do transportador mitocondrial carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1) (TUNSTALL *et al.*, 2002). Desta forma, o exercício aumenta a expressão de proteínas envolvidas não somente no transporte como também metabolismo de ácidos graxos, resultando em adaptações importantes ao treinamento aeróbico. O resultado final é que o músculo esquelético se torna mais capaz de captar e utilizar gorduras como fonte energética, particularmente por aumentar a atividade de enzimas mitocondriais, tais como a citrato sintase (etapa inicial do ciclo de Krebs para a formação do citrato, e a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD), enzima chave na beta-oxidação. Apesar de algumas evidências, incluindo revisões sistemáticas com metanálise, terem indicado um possível efeito adicional na oxidação/utilização de ácidos graxos durante o exercício, outros estudos contestam tal benefício (AKERSTROM *et al.*, 2009; DE BOCK *et al.*, 2005, 2008; VIEIRA *et al.*, 2016).

A oferta de carboidratos antes do exercício poderia, por exemplo, resultar na redução de todas as etapas envolvidas na captação e utilização de ácidos graxos, em um mecanismo que envolve, por exemplo, redução na ativação da AMPK e ativação da piruvato desidrogenase cinase (PDK4) (CURI *et al.*, 2016; SIDOSSIS *et al.*, 1996).

É conhecido que a ingestão de carboidratos durante o exercício prolongado melhora o desempenho do exercício em indivíduos bem treinados (WIDRICK *et al.*, 1993). No entanto, em teoria, como há menos desequilíbrio energético durante o exercício quando o carboidrato é ingerido, o resultado seria a menor ativação de vias de sinalização chave, como a AMPK e, portanto, menos estímulo para gerar adaptação ao treinamento aeróbico (SPENCER; YAN; KATZ, 1991). Da mesma forma, em indivíduos obesos, onde é ideal uma maior ativação da oxidação de gordura e melhora da saúde metabólica/mitocondrial, que a realização de exercício no estado alimentado possa, de alguma forma, atenuar os efeitos benéficos do exercício aeróbico. Desta forma, a estratégia de realizar exercício no estado de jejum, parece uma alternativa interessante.

Considerando o potencial efeito da associação do exercício e jejum no metabolismo lipídico, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao conteúdo de triglicerídeos 12h pós sessão na musculatura esquelética (Figura 11). Cabe ressaltar que, em nosso experimento, os animais realizaram exercício em jejum por 30 minutos e depois retornaram ao biotério por mais 12 horas, com livre acesso a alimentação. Dessa forma, é possível que quaisquer mudanças induzidas pelo jejum ou exercício tenham retornado aos

valores originais durante o período de recuperação. Interessantemente, embora não apresentado neste trabalho (por ser parte de outra tese), imediatamente após a intervenção, no sóleo, um músculo predominantemente oxidativo, tanto o jejum quanto o exercício, resultaram em aumentos na oxidação de glicose e palmitato, porém, sem efeito adicional de exercício e jejum. Esse resultado foi acompanhado pelo aumento na expressão gênica da AMPK no sóleo. Desta forma, é possível especular que a alteração imediata na oxidação de palmitato no sóleo seja, ao menos em parte, ligada ao efeito subagudo (12 horas após) do jejum e do exercício nos níveis de colesterol plasmático total, que foram significativamente reduzidos (Figura 7). Esse efeito, considerando o colesterol como um marcador de risco cardiovascular, é um resultado promissor na melhora da saúde de indivíduos sedentários, ainda mais por se tratar de um efeito que perdura por até 12 horas. De fato, em um trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo, esse efeito redutor de colesterol, e ainda de triglicerídeos plasmáticos, também pode ser observado em animais obesos resistentes à ação da insulina submetidos aos mesmos protocolos de intervenção (jejum e exercício) (VOGT *et al.*, 2021).

No sóleo, a combinação de jejum e exercício pode ter resultado em um efeito poupador de glicogênio, possivelmente associado ao aumento da oxidação do palmitato. Nossos resultados apontam que, tanto o jejum quanto o exercício, resultaram em aumentos significativos do conteúdo de glicogênio muscular no sóleo (Figura 10). Em um estudo anterior, realizado com humanos realizando exercício em jejum, foi demonstrado que, particularmente em células musculares do tipo I, o exercício praticado em jejum resultou em aumentos significativos da ressíntese de glicogênio muscular 3 vezes maior que o exercício realizado no estado alimentado (DE BOCK *et al.*, 2005), corroborando com nossos resultados. No mesmo estudo, os autores encontraram reduções mais significativas do conteúdo de triglicerídeos intramusculares (sóleo) nos sujeitos que realizaram exercício em jejum, além de maior ativação da AMPK. Outro fator importante a ser considerado são as modificações hormonais induzidas pelo exercício e o jejum. Apesar dessas medidas não terem sido realizadas em nosso trabalho, resultados do estudo de De Bock, K., *et al.*(2005) demonstraram que as concentrações de insulina no período de recuperação foram diferentes quando compararam indivíduos que realizaram exercício em jejum ou no estado alimentado. As concentrações plasmáticas de insulina durante a recuperação foram marcadamente maiores em indivíduos que realizaram o exercício em jejum. Essa modificação também auxilia no entendimento de uma maior reserva de glicogênio muscular encontrada em decorrência do jejum e exercício. Outro dado relevante a ser considerado é a concentração de adrenalina plasmática, que aumentou mais em condições de exercício no jejum. Esse resultado poderia explicar, pelo menos em parte, uma maior

utilização/oxidação (devido a maior disponibilidade pela lipólise) de palmitato e a redução dos lipídios plasmáticos.

É importante considerar que a resposta até aqui discutida é aguda - subaguda. Adaptações crônicas (de treinamento) devem ser separadamente interpretadas. Embora pareça sugestivo que, considerando as aparentes vantagens de realizar exercício em jejum, treinar sempre em jejum poderia causar mais adaptações metabólicas (aeróbicas/oxidativas) do que treinar no estado alimentado, esse pensamento não é adequado. De fato, trabalhos que estudaram os efeitos do treinamento em jejum ou estado alimentado (com ingestão de carboidratos), encontraram essencialmente que a ingestão de carboidrato durante o treinamento físico tem pouco ou nenhum efeito sobre as adaptações metabólicas ao treinamento físico (AKERSTROM *et al.*, 2009; DE BOCK *et al.*, 2008). Embora os autores tenham encontrado uma diminuição da degradação do glicogênio induzida pelo exercício e um aumento em proteínas envolvidas no manuseio de gordura após treinamento em jejum (FABPm), a oxidação de gordura durante o exercício com ingestão de carboidratos ou em jejum, não foi alterada.

Em relação aos resultados de lactato (Figura 9) encontramos que a interação de exercício e jejum não resultou em mudanças significativas 12 horas após o exercício. No entanto, animais que realizaram jejum anteriormente, aumentaram o lactato plasmático no período de recuperação estudado. Neste ponto, é importante ressaltar as diferenças de lactato medido durante/pós exercício e da medida de 12 horas. Em nosso trabalho, utilizamos a coleta de sangue da cauda do animal (sangue venoso, durante/imediatamente após exercício) como estratégia de verificar a intensidade do exercício, e esta medida foi realizada com fitas e lactímetro portátil específico. Conforme demonstrado na Figura 16, as concentrações de lactato ficaram abaixo dos 4 mmol/L-1.

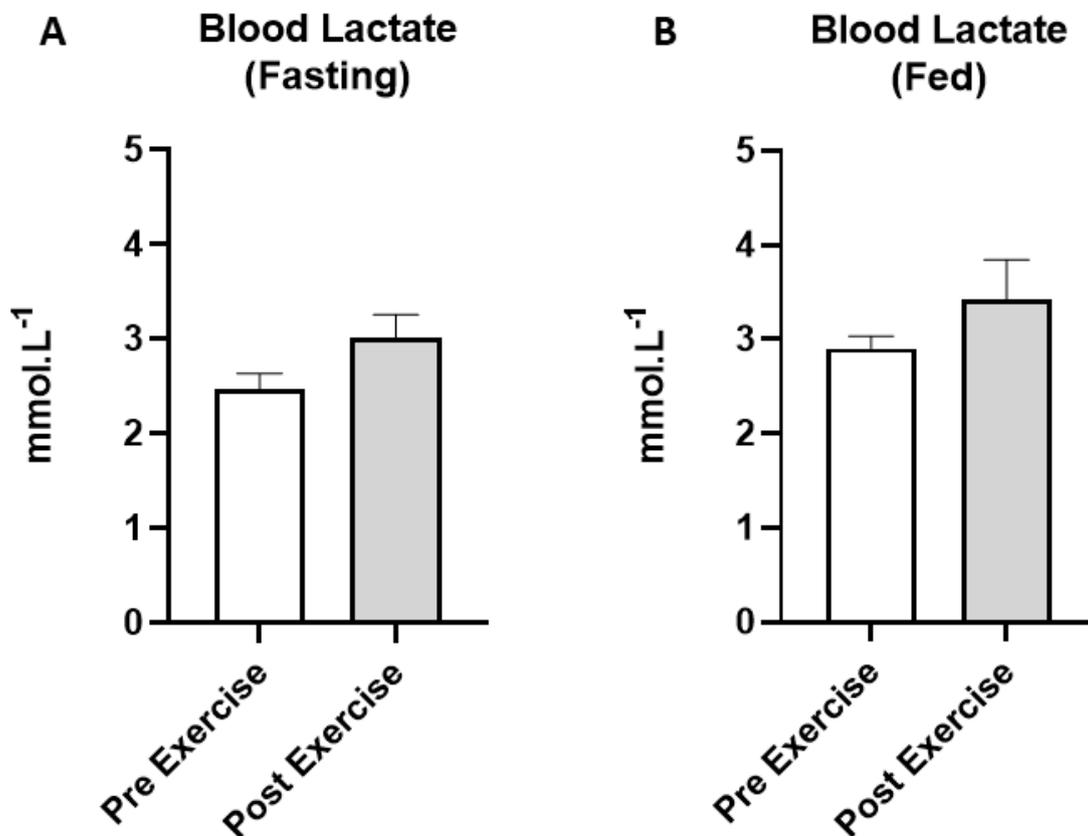


Figura 16 - Lactato no sangue venoso. Lactato no sangue venoso dos ratos antes e imediatamente depois do exercício.

Os resultados de lactato apresentados na Figura 9 foram coletados diretamente após o período de recuperação, por decapitação. Os valores significativamente maiores são, provavelmente, causados pela mistura de sangue venoso, arterial, do líquido cérebro-espinhal e de leitos que, na medida do lactato venoso da cauda, não são incluídos (particularmente de leitos cuja o fluxo sanguíneo é consideravelmente reduzido durante o exercício - ex: tecido hepato-esplâncnico). Os maiores valores de lactato encontrados após 12 horas de recuperação no grupo que realizou jejum, podem refletir alguma contribuição deste metabólito para os processos de gliconeogênese ou ainda, conforme evidências mais recentes, estar atuando como molécula sinalizadora envolvida nos processos adaptativos que se seguem após estresse metabólico, como é o caso do exercício e do jejum (BROOKS, 2018). Muito mais do que um simples produto metabólico, o lactato parece estar envolvido em diversas adaptações a curto e a longo prazo, uma vez que pode apresentar funções de molécula sinalizadora autócrina, parácrina e até mesmo endócrina. Uma das ações "*hormone like*" conhecidas do lactato é a partir de sua ligação com receptores como receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR-1, do inglês *hydroxycarboxylic acid receptor 1*) no tecido adiposo, que resulta na inibição do processo de

lipólise e conseqüentemente em redução da disponibilidade de ácidos graxos para a oxidação (BROOKS, 2020). O lactato é o principal precursor de carbonos para a gliconeogênese hepática e renal e parece ser o substrato preferencial (mais que glicose e ácidos graxos) para gerar energia por oxidação, quando disponível em concentrações aumentadas. Sendo assim, podemos especular que o jejum resultou em manutenção de níveis aumentados de lactato como possível fonte de energia após o período de jejum, mas que jejum e exercício não resultaram na mesma (ou maior) resposta porque células musculares do tipo I e outros tecidos, como o fígado, realizaram utilização imediata deste metabólito como fonte energética durante o exercício.

Outro resultado interessante encontrado no presente trabalho, foi o aumento do conteúdo de triglicerídeos no tecido adiposo marrom dos animais que realizaram exercício em jejum (Figura 11). Conforme ilustrado na Figura 17 a principal função do tecido adiposo marrom (TAM) é dissipar energia na forma de calor, propriedade impulsionada pela presença da proteína mitocondrial UCP1 (*uncoupling protein 1*) que desacopla a respiração mitocondrial (TOWNSEND; TSENG, 2014). O TAM também é densamente innervado pelo sistema nervoso simpático (SNS) e é altamente vascularizado. A capacidade termogênica do TAM pode ser importante para a produção de calor em recém-nascidos, essencial para roedores e mamíferos hibernantes, e possivelmente auxilia na oxidação do excesso de consumo de energia dietética. O TAM dissipa energia como calor para manter a termogênese ideal e contribuir para o gasto de energia em roedores e possivelmente humanos. Os processos energéticos executados pelo TAM requerem um fornecimento de combustível prontamente disponível, que inclui glicose e ácidos graxos. Os ácidos graxos são disponibilizados pela captação celular, de novo lipogênese e gotículas lipídicas multiloculares nos adipócitos marrons. O TAM também possui uma grande capacidade de captação e metabolismo de glicose e uma capacidade de regular a sensibilidade à insulina. Essas propriedades tornam o TAM um alvo atraente para o tratamento da obesidade, diabetes e outros distúrbios metabólicos. Experimentos anteriores usando camundongos expostos ao frio mostraram que os genes envolvidos no metabolismo da glicose, lipogênese e captação e catabolismo de AGs são regulados positivamente como parte da adaptação ao frio, e os ácidos graxos são utilizados para a ativação da UCP1 (TOWNSEND; TSENG, 2014).

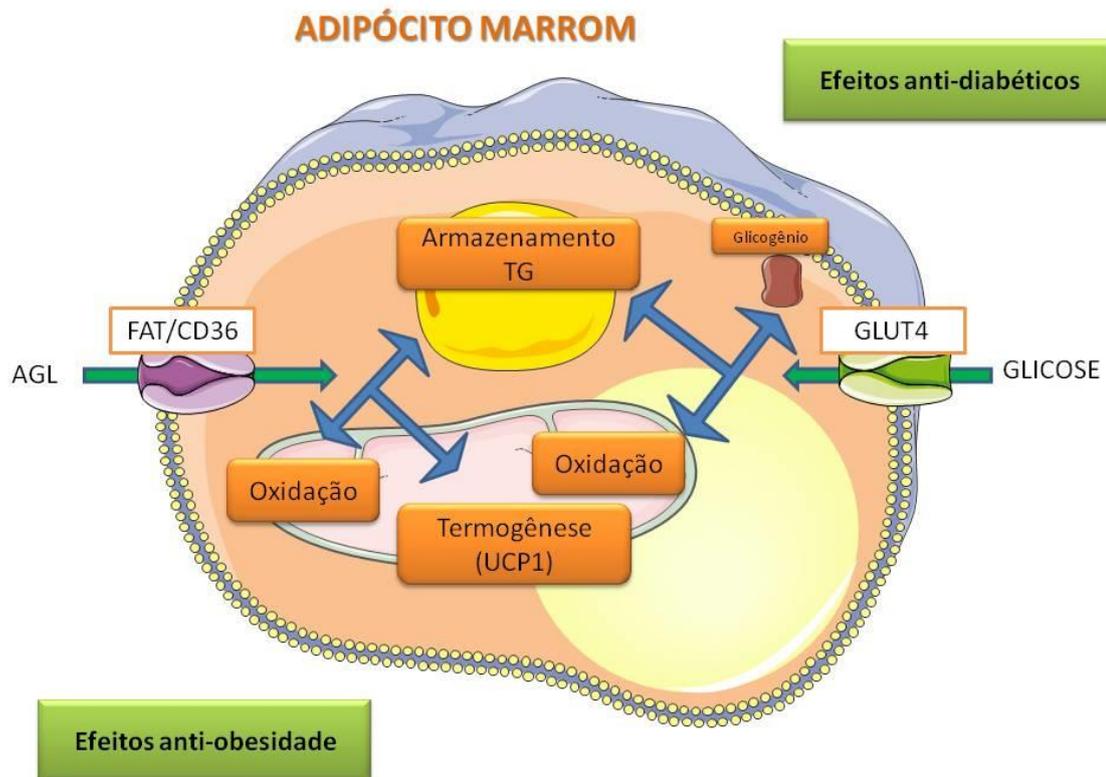


Figura 17 – Funções do tecido adiposo marrom. Funções do tecido adiposo marrom no combate a obesidade e diabetes. Fonte: Adaptado de Townsend & Tseng (2014).

O exercício físico, além do consumo energético adicional para sua manutenção, é capaz de estimular a termogênese, tornando a máquina orgânica mais eficiente para a metabolização dos lipídeos (BOSTRÖM *et al.*, 2012). A termogênese no tecido adiposo marrom é resultado da ação de uma proteína desacopladora UCP-1 (*Uncoupling Protein 1*), cuja expressão é modulada por coativadores produzidos no tecido muscular durante o próprio exercício (BOSTRÖM *et al.*, 2012) e ainda por catecolaminas (CASSARD-DOULCIER *et al.*, 1993), hormônios da tireoide (CASSARD-DOULCIER *et al.*, 1994), ácidos graxos, insulina (KELLY *et al.*, 1998) e leptina (ARVANITI *et al.*, 1998). A termogênese pode ainda ser estimulada por hormônios como a irisina, por exemplo (FAGUNDO *et al.*, 2016). Este hormônio está relacionado ao escurecimento do tecido adiposo, ou seja, conversão do tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom. Dessa forma, parece que o exercício físico atua em várias vias para que seja possível um controle efetivo da expressão desses hormônios e fatores relacionados ao metabolismo celular. O fato de termos observado um aumento na concentração de triglicerídeos no TAM, pode indicar que a realização de exercício físico em jejum, intensifica a captação de ácidos graxos e carboidratos e, possivelmente, a sua utilização posterior, um efeito muito

desejável em pacientes obesos e diabéticos, ou uma possível compensação no consumo por déficit energético. Dessa forma, a realização de exercício em jejum parece exercer efeitos importantes no que concerne à saúde metabólica.

Em relação a expressão das proteínas SIRT1 e *HSP70*, ao menos no tempo de recuperação estudado, não foram encontradas alterações significativas no imunoconteúdo em nenhum dos tecidos analisados (Figuras 12, 13, 14 e 15). O exercício físico é capaz de estimular a síntese de proteínas de choque-térmico, em especial a família de 72 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 (KRAUSE *et al.*, 2015), 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 *HSP72* 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, exercendo-a, fundamentalmente, por bloquear a translocação do NF- κ B para o núcleo celular, dessa forma cessando o processo inflamatório (KRAUSE *et al.*, 2015). Interessantemente, trabalhos publicados na última década 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 (CHUNG *et al.*, 2008; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012).

Além de seu potencial anti-inflamatório e sua essencial participação na proteostase celular, essas proteínas também parecem estar relacionadas com a regulação dos processos de lipólise. O aumento no fornecimento de ácidos graxos livres aos tecidos periféricos pode ser resultado de processos como a autofagia mediada por chaperonas, onde a *HSP70* reconhece e marca proteínas da gotícula lipídica (perilipinas) e induz o seu consequente tráfego para os lisossomos. Essa diminuição da presença dessas perilipinas na gotícula lipídica permite o recrutamento de enzimas lipolíticas e posterior ativação de seus intermediários específicos, culminando em maior atividade lipolítica (MORIGNY *et al.*, 2016). A ausência de resposta no imunoconteúdo de *HSP70* no intervalo de recuperação estudado pode estar relacionado ao tempo de análise pós-estresse metabólico, jejum ou exercício. De fato, diversos trabalhos têm

demonstrado que o pico de expressão da *HSP70* pós agente estressor se dá, dependentemente do tecido, entre 4-8 horas após (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019; LOVELL *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a ausência de modificações na expressão da SIRT1 pode ser decorrente do período na qual a mesma foi analisada. A redução nas quantidades de energia disponível nas células musculares (demonstrada através, por exemplo, de aumento nas relações AMP/ATP e NAD⁺/NADH), promovido em ambientes de deprivação energética celular, como o exercício físico ou restrição calórica, resulta na ativação de uma importante proteína deacetilase, denominada SIRT-1. Entre suas principais funções, encontra-se a remoção de grupamento acetil de diversas 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 *HSR*, responsável, em último grau, pela síntese das proteínas de choque térmico (*HSP70*, por exemplo). Da mesma forma que nossos resultados para *HSP70*, a ausência de alterações significativas na expressão da SIRT1 no período de 12 horas de recuperação, deve-se, provavelmente, em função do período de pico de ativação desta proteína frente a estresse metabólico, como o exercício e o jejum. De fato, diversas evidências demonstram que, após o estresse (jejum ou exercício), as mudanças de NAD⁺/NADH induzem o aumento da atividade da SIRT1 somente 3 horas após a queda no conteúdo energético/redox das células (CANTÓ *et al.*, 2009; KRAUSE *et al.*, 2015). Sendo assim, sugerimos que as alterações do imunoconteúdo de SIRT1 bem como suas ações, ao menos em indivíduos (ratos) magros, ocorreram anteriormente ao período de 12h pós-exercício/jejum. Além disso, considerando que os animais voltaram a se alimentar (*ad libitum*) durante a recuperação, os níveis energéticos celulares já haviam retornado à normalidade, sem a necessidade de manter essa via de sinalização ativa. Em função disso, sem a ativação da SIRT1, a via das *HSR* e, conseqüentemente a expressão de *HSP70*, estariam mais baixas, como observado em nosso estudo. Dados do nosso estudo anterior, que analisou o imunoconteúdo de SIRT1 e *HSP70*, também 12 horas após exercício e jejum, mas em animais obesos resistentes à insulina, verificaram que, SIRT1 e *HSP70* ainda estão aumentados (VOGT *et al.*, 2021), o que não foi observado em nosso grupo de animais magros. Conforme demonstrado para outras proteínas centrais no metabolismo, como a AMPK, que também é ativadora da SIRT1 e *HSR*, ao contrário de indivíduos magros e saudáveis, indivíduos diabéticos tem a indução desta proteína de forma atrasada (SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2007) após o estresse. Novamente, essas evidências reforçam nossa sugestão de que a ausência nas respostas destas proteínas analisadas foi decorrente do tempo de recuperação de 12 horas.

8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Apesar das limitações, este foi o primeiro estudo, realizado em uma população de animais sedentários, que avaliou os efeitos do exercício, do jejum, e da combinação de ambos, 12 horas após o estresse metabólico, em parâmetros metabólicos e de sinalização celular em diversos tecidos. Nossos resultados indicam que a realização de exercício físico em jejum, pode resultar em efeitos metabólicos benéficos para indivíduos sedentários. Particularmente, a redução do colesterol plasmático total e o aumento na capacidade do tecido adiposo marrom em metabolizar e armazenar nutrientes na forma de triglicerídeos. O fato de termos observado um aumento na concentração de triglicerídeos no TAM, pode indicar que a realização de exercício físico em jejum, intensifica a captação de ácidos graxos e carboidratos e, possivelmente, a sua utilização posterior, um efeito muito desejável em pacientes obesos e diabéticos.

Como perspectivas, sugerimos analisar outras proteínas envolvidas na lipogênese e lipólise no tecido adiposo marrom, assim como sua capacidade de oxidar os triglicerídeos, observando a expressão de proteínas como a UCP-1, os transportadores de ácidos graxos e as enzimas mitocondriais envolvidas na beta-oxidação e ciclo de Krebs. Além disso, nosso trabalho analisou apenas os efeitos subagudos do exercício e jejum. Como continuação deste trabalho sugerimos a análise dos efeitos do treinamento aeróbico + jejum nos mesmos parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS

- ABRAVAYA, K. *et al.* The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. **Genes and Development**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1153–1164, 1992.
- ADAMS, G. R. *et al.* Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 911–915, 1993.
- AIRD, T. P.; DAVIES, R. W.; CARSON, B. P. 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**, Denmark, v. 28, n. 5, p. 1476–1493, 2018.
- AIRD, T. P.; DAVIES, R. W.; CARSON, B. P. 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**, Denmark, v. 28, n. 5, p. 1476–1493, 2018.
- AKERSTROM, T. C. A. *et al.* Glucose ingestion during endurance training does not alter adaptation. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 106, n. 6, p. 1771–1779, 2009.
- ARVANITI, K. *et al.* Leptin and corticosterone have opposite effects on food intake and the expression of UCP1 mRNA in brown adipose tissue of lep(ob)/lep(ob) mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 9, p. 942–945, 1998.
- ASEA, A. *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 435–442, 2000.
- ASEA, A. A. A.; CALDERWOOD, S. K. **Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology**. [S. l.: s. n.], 2010.
- BACHMAN, J. L.; DEITRICK, R. W.; HILLMAN, A. R. Exercising in the Fasted State Reduced 24-Hour Energy Intake in Active Male Adults. **Journal of nutrition and metabolism**, [s. l.], v. 2016, p. 1984198, 2016.
- BALER, R.; WELCH, W. J.; VOELLMY, R. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1151–1159, 1992.
- BARNOSKY, A. R. *et al.* Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: A review of human findings. **Translational Research**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 302–311, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.013>.
- BECKER, J.; CRAIG, E. A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **European Journal**

- of **Biochemistry**, [s. l.], v. 219, n. 1–2, p. 11–23, 1994.
- BENZIANE, B. *et al.* Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 295, n. 6, 2008.
- BEY, L.; HAMILTON, M. T. Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: A molecular reason to maintain daily low-intensity activity. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 551, n. 2, p. 673–682, 2003.
- BILET, L. *et al.* Acute exercise does not decrease liver fat in men with overweight or NAFLD. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 1–7, 2015.
- BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 541–585, 1991.
- BOSTRÖM, P. *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, [s. l.], v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.
- BROOKS, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. **Redox Biology**, [s. l.], v. 35, n. February, p. 101454, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101454>.
- BROOKS, G. A. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 757–785, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>.
- CAHILL, G. F. Fuel metabolism in starvation. **Annual review of nutrition**, [s. l.], v. 26, p. 1–22, 2006.
- CANTÓ, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, [s. l.], v. 458, n. 7241, p. 1056–1060, 2009.
- 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.
- CARBONE, S. *et al.* Obesity, risk of diabetes and role of physical activity, exercise training and cardiorespiratory fitness. **Progress in Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 327–333, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2019.08.004>.
- CASSARD-DOULCIER, A. M. *et al.* In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. 39, p. 24335–24342, 1994.
- CASSARD-DOULCIER, A. M. *et al.* Tissue-specific and β -adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: Control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 497–506, 1993.

- CHACKO, E. A time for exercise: The exercise window. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 206–209, 2017.
- CHAPPELL, T. G. *et al.* Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. **Cell**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 3–13, 1986.
- CHEN, Y. C. *et al.* Feeding influences adipose tissue responses to exercise in overweight men. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 313, n. 1, p. E84–E93, 2017.
- CHEN, L. *et al.* Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **International Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 2015, 2015.
- CHUNG, J. *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 1739–1744, 2008.
- CIVITARESE, A. E. *et al.* Glucose ingestion during exercise blunts exercise-induced gene expression of skeletal muscle fat oxidative genes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 289, n. 6, p. 1023–1029, 2005.
- CLUBERTON, L. J. *et al.* Effect of carbohydrate ingestion on exercise-induced alterations in metabolic gene expression. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 1359–1363, 2005.
- COLBERG, S. R. *et al.* Physical activity/exercise and diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 2065–2079, 2016.
- COYLE, E. F. *et al.* Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 273, n. 2 36-2, 1997.
- COZER, A. G. *et al.* Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue. **Biochimie**, [s. l.], v. 138, p. 50–55, 2017.
- CRAIG, E. A.; GROSS, C. A. Is hsp70 the cellular thermometer?. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 16, n. C, p. 135–140, 1991.
- CURI, R. *et al.* Regulatory principles in metabolism -Then and now. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 473, n. 13, p. 1845–1857, 2016.
- DE BOCK, K. *et al.* Effect of training in the fasted state on metabolic responses during exercise with carbohydrate intake. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, United States, v. 104, n. 4, p. 1045–1055, 2008.
- DE BOCK, K. *et al.* Exercise in the fasted state facilitates fibre type-specific intramyocellular lipid breakdown and stimulates glycogen resynthesis in humans. **The Journal of physiology**,

[*s. l.*], v. 564, n. Pt 2, p. 649–660, 2005.

DE LEMOS MULLER, C. H. *et al.* Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role for HSP70. **Journal of Science in Sport and Exercise**, [*s. l.*], v. 1, n. 2, p. 97–115, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42978-019-0015-6>.

DE MELO, E. A. S. *et al.* Nuances between sedentary behavior and physical inactivity: Cardiometabolic effects and cardiovascular risk. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [*s. l.*], v. 67, n. 2, p. 335–343, 2021.

DEFRONZO, R. A. *et al.* The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose. **Diabetes**, [*s. l.*], v. 590, n. 14, p. 1000–1007, 1981. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2012.235127>.

DING, D. *et al.* The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 388, n. 10051, p. 1311–1324, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30383-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30383-X).

DUNSTAN, D. W. *et al.* Association of television viewing with fasting and 2-h postchallenge plasma glucose levels in adults without diagnosed diabetes. **Diabetes care**, United States, v. 30, n. 3, p. 516–522, 2007.

EDINBURGH, R. M. *et al.* Preexercise breakfast ingestion versus extended overnight fasting increases postprandial glucose flux after exercise in healthy men. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, [*s. l.*], v. 315, n. 5, p. E1062–E1074, 2018.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, [*s. l.*], v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>.

EKELUND, U. *et al.* Does physical activity attenuate, or even eliminate, the detrimental association of sitting time with mortality? A harmonised meta-analysis of data from more than 1 million men and women. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 388, n. 10051, p. 1302–1310, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30370-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30370-1).

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular Chaperones. **Annual Review of Biochemistry**, [*s. l.*], v. 60, p. 321–347, 1991.

ENEVOLDSEN, L. H. *et al.* The combined effects of exercise and food intake on adipose tissue and splanchnic metabolism. **The Journal of physiology**, [*s. l.*], v. 561, n. Pt 3, p. 871–882, 2004.

FAGUNDO, A. B. *et al.* Modulation of irisin and physical activity on executive functions in obesity and morbid obesity. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 6, n. August, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep30820>.

- FARAH, N. M. F.; GILL, J. M. R. Effects of exercise before or after meal ingestion on fat balance and postprandial metabolism in overweight men. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 2297–2307, 2013.
- FIUZA-LUCES, C. *et al.* Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 731–743, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0065-1>.
- FORD, E. S. *et al.* Sedentary behavior, physical activity, and concentrations of insulin among US adults. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 59, n. 9, p. 1268–1275, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.11.020>.
- FRAYN, K. *et al.* Adipocyte triglyceride turnover is independently associated with atherogenic dyslipidemia. **Journal of the American Heart Association**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 1–9, 2012.
- FUJITA, N. *et al.* Changes in lipid metabolism and capillary density of the skeletal muscle following low-intensity exercise training in a rat model of obesity with hyperinsulinemia. **PLoS one**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e0196895, 2018.
- GARBER, C. E. *et al.* Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.
- GOLDSTEIN, I.; HAGER, G. L. Transcriptional and chromatin regulation during fasting – The genomic era. **Trends Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 22, 2015.
- GONZALEZ, J. T. *et al.* Breakfast and exercise contingently affect postprandial metabolism and energy balance in physically active males. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 721–732, 2013.
- GONZALEZ, J. T. Paradoxical second-meal phenomenon in the acute postexercise period. **Nutrition**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 961–967, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.12.001>.
- GONZÁLEZ, K.; FUENTES, J.; MÁRQUEZ, J. L. Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases. **Korean journal of family medicine**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 12–13, 2017.
- GREEN, H. J. *et al.* Metabolic adaptations to training precede changes in muscle mitochondrial capacity. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 484–491, 1992.
- GUTHOLD, R. *et al.* Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. e1077–e1086, 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30357-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30357-7).

- HAMBURG, N. M. *et al.* Physical Inactivity Rapidly Induces Insulin Resistance and Microvascular Dysfunction in Healthy Volunteers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 334, n. 6053, p. 255–258, 2007.
- HAMILTON, M. T.; HAMILTON, D. G.; ZDERIC, T. W. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 11, p. 2655–2667, 2007.
- HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1222–1236, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.08.019>.
- HARVIE, M. N.; HOWELL, T. Could intermittent energy restriction and intermittent fasting reduce rates of cancer in obese, overweight, and normal-weight subjects? A summary of evidence. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 690–705, 2016.
- HAWLEY, J. A.; MAUGHAN, R. J.; HARGREAVES, M. Exercise Metabolism: Historical Perspective. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 12–17, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.016>.
- HEADLAND, M. *et al.* Weight-loss outcomes: A systematic review and meta-analysis of intermittent energy restriction trials lasting a minimum of 6 months. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2016.
- HEALY, G. N. *et al.* Objectively measured light-intensity physical activity is independently associated with 2-h plasma glucose. **Diabetes care**, United States, v. 30, n. 6, p. 1384–1389, 2007.
- HEALY, G. N. *et al.* Objectively measured sedentary time, physical activity, and metabolic risk: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab). **Diabetes care**, United States, v. 31, n. 2, p. 369–371, 2008.
- HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 831–838, 1984.
- HOLTERMANN, A.; STAMATAKIS, E. Do all daily metabolic equivalent task units (METs) bring the same health benefits?. **British Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 53, n. 16, p. 991–992, 2019.
- HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. *et al.* LipoCardium: Endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 245–258, 2007.
- KELLY, L. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors γ and α mediate in vivo

regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. **Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 12, p. 4920–4927, 1998.

KIRWAN, J. P. *et al.* Effects of 7 days of exercise training on insulin sensitivity and responsiveness in type 2 diabetes. **Diabetes**, T.P.J. Solomon, v. 58, 2009. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L70134514&from=export>

KLEIN-WIERINGA, I. R. *et al.* Adipocytes Modulate the Phenotype of Human Macrophages through Secreted Lipids. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 191, n. 3, p. 1356–1363, 2013.

KNUDSEN, S. H. *et al.* Changes in insulin sensitivity precede changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in healthy young men. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 7–15, 2012.

KOHL, H. W. *et al.* The pandemic of physical inactivity: Global action for public health. **The Lancet**, [s. l.], v. 380, n. 9838, p. 294–305, 2012. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60898-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60898-8).

KOOPMAN, R. *et al.* Intramyocellular lipid and glycogen content are reduced following resistance exercise in untrained healthy males. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 525–534, 2006.

KRAUSE, M. *et al.* The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2015, 2015.

KRAUSE, M. *et al.* The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. **Clinical Science**, [s. l.], v. 128, n. 11, p. 789–803, 2015.

LAEMMLI, U. . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 227, p. 680–685, 1970. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>.

LECHLEITNER, M. Obesity and the metabolic syndrome in the elderly - A mini-review. **Gerontology**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 253–259, 2008.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat -shock proteins. **Annual review of genetic**, [s. l.], 1988.

LITTLE, J. P. *et al.* An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 α and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**,

[*s. l.*], v. 300, n. 6, p. 1303–1310, 2011.

LOVELL, R. *et al.* The time-profile of the PBMC HSP70 response to in vitro heat shock appears temperature-dependent. **Amino Acids**, [*s. l.*], v. 33, n. 1, p. 137–144, 2007.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, [*s. l.*], v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MAUGHAN, R. J.; FALLAH, J.; COYLE, E. F. The effects of fasting on metabolism and performance. **British journal of sports medicine**, England, v. 44, n. 7, p. 490–494, 2010.

MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. Exercise and Myocyte Enhancer Factor 2 Regulation in Human Skeletal Muscle. **Review Literature And Arts Of The Americas**, [*s. l.*], v. 1, n. 1, p. 1–13, 2004.

MENSHIKOVA, E. V. *et al.* Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, [*s. l.*], v. 61, n. 6, p. 534–540, 2006.

MICHALSEN, A.; LI, C. Fasting therapy for treating and preventing disease - Current state of evidence. **Forschende Komplementarmedizin**, [*s. l.*], v. 20, n. 6, p. 444–453, 2013.

MODEL, J. F. A. *et al.* Liraglutide improves lipid and carbohydrate metabolism of ovariectomized rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [*s. l.*], v. 524, n. June 2020, 2021.

MORIGNY, P. *et al.* Adipocyte lipolysis and insulin resistance. **Biochimie**, [*s. l.*], v. 125, p. 259–266, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.024>.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, [*s. l.*], v. 259, n. 5100, p. 1409–1410, 1993.

MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. **Methods**, [*s. l.*], v. 43, n. 3, p. 229–237, 2007.

MYERS, J.; KOKKINOS, P.; NYELIN, E. Cardiorespiratory Fitness, Physical Activity, and Metabolic Syndrome. **Cardiorespiratory Fitness in Cardiometabolic Diseases: Prevention and Management in Clinical Practice**, [*s. l.*], p. 207–215, 2019.

NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT JR, P. I. H. The fat cell senescence hypothesis: A mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [*s. l.*], v. 17, n. 4, p. 295–305, 2014.

NEWSHOLME, P.; KRAUSE, M. Diet, Obesity, and Reactive Oxygen Species – Implications for Diabetes and Aging. **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**, [*s. l.*], v.

9783642300, p. 3361–3374, 2014.

NIMPTSCH, K.; KONIGORSKI, S.; PISCHON, T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 92, p. 61–70, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.006>.

NING, F. *et al.* Development of coronary heart disease and ischemic stroke in relation to fasting and 2-hour plasma glucose levels in the normal range. **Cardiovascular Diabetology**, [s. l.], v. 11, p. 1–7, 2012.

NYGAARD, H. *et al.* Effects of exercise in the fasted and postprandial state on interstitial glucose in hyperglycemic individuals. **Journal of Sports Science and Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 254–263, 2017.

OWEN, N. *et al.* Too much sitting: The population health science of sedentary behavior. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 105–113, 2010.

PARDO, P. S.; BORIEK, A. M. The physiological roles of Sirt1 in skeletal muscle. **AGING**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 430–437, 2011.

PATTERSON, R. E.; SEARS, D. D. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 37, p. 371–393, 2017.

PEKKANEN J, TUOMILEHTO J, QIAO Q, JOUSILAHTI P, L. J. Glucose tolerance and mortality: Comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. **Lancet**, [s. l.], v. 354, n. 9179, p. 617–621, 1999.

PERRY, C. G. R. *et al.* Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 588, n. 23, p. 4795–4810, 2010.

PETER, A. *et al.* Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. [s. l.], v. 478, n. 7367, p. 110–113, 2011.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, D. P. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 546, n. 3, p. 851–858, 2003.

PRIEUR, X. *et al.* Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. **Diabetes**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 797–809, 2011.

ROBERTS, C. K.; HEVENER, A. L.; BARNARD, R. J. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–58, 2013.

RODGERS, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α

and SIRT1. **Nature**, [s. l.], v. 434, n. 7029, p. 113–118, 2005.

RODRIGUES-KRAUSE, J. *et al.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: Does fat matter?. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 293–302, 2012.

RODRIGUES, B. *et al.* Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, [s. l.], v. 6, p. 1–7, 2007.

ROSS, R. *et al.* **Importance of Assessing Cardiorespiratory Fitness in Clinical Practice: A Case for Fitness as a Clinical Vital Sign: A Scientific Statement from the American Heart Association**. [S. l.: s. n.], 2016-. ISSN 15244539.v. 134

SAFDAR, A. *et al.* Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 286, n. 12, p. 10605–10617, 2011.

SALLIS, J. F. *et al.* Progress in physical activity over the Olympic quadrennium. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10051, p. 1325–1336, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30581-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30581-5).

SAUNDERS, T. J. *et al.* Sedentary behaviour and health in adults: an overview of systematic reviews. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. S218–S231, 2020.

SEIMON, R. V. *et al.* Do intermittent diets provide physiological benefits over continuous diets for weight loss? A systematic review of clinical trials. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 418, p. 153–172, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.014>.

SHAW, C. S.; CLARK, J.; WAGENMAKERS, A. J. M. The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 30, p. 13–34, 2010.

SIDOSSIS, L. S. *et al.* Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 98, n. 10, p. 2244–2250, 1996.

SPENCER, M. K.; YAN, Z.; KATZ, A. Carbohydrate supplementation attenuates IMP accumulation in human muscle during prolonged exercise. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 261, n. 1 30-1, 1991.

SPINA, R. J. *et al.* Mitochondrial in response enzymes increase in muscle to 7-10 days of cycle exercise. [s. l.], 1996.

SRIWIJITKAMOL, A. *et al.* Effect of Acute Exercise on AMPK Signaling in Skeletal Muscle

- of Subjects With Type 2 Diabetes.: **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 836–848, 2007.
- STONE, D. E.; CRAIG, E. A. Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1622–1632, 1990.
- THOMPSON, D. *et al.* Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 157–191, 2012.
- THORP, A. A. *et al.* Deleterious associations of sitting time and television viewing time with cardiometabolic risk biomarkers: Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) study 2004-2005. **Diabetes care**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 327–334, 2010.
- THORP, A. A. *et al.* Sedentary behaviors and subsequent health outcomes in adults: A systematic review of longitudinal studies, 1996-2011. **American Journal of Preventive Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 207–215, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2011.05.004>.
- TONKONOOGI, M.; SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 129–137, 2002.
- TOWNSEND, K. L.; TSENG, Y.-H. Brown Fat Fuel Utilization and Thermogenesis. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–20, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- TREFTS, E.; WILLIAMS, A. S.; WASSERMAN, D. H. Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, [s. l.], v. 135, p. 203–225, 2015.
- TREMBLAY, M. Letter to the editor: Standardized use of the terms “sedentary” and “sedentary behaviours”. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 540–542, 2012.
- TUNSTALL, R. J. *et al.* Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 283, n. 1 46-1, p. 66–72, 2002.
- VAN PROEYEN, K. *et al.* Beneficial metabolic adaptations due to endurance exercise training in the fasted state. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 236–245, 2011.
- VAN PROEYEN, K. *et al.* Training in the fasted state improves glucose tolerance during fat-rich diet. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 588, n. 21, p. 4289–4302, 2010.
- VARADY, K. A. Intermittent versus daily calorie restriction: Which diet regimen is more effective for weight loss?. **Obesity Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 593–601, 2011.
- VIEIRA, A. F. *et al.* Effects of aerobic exercise performed in fasted v. fed state on fat and

carbohydrate metabolism in adults: a systematic review and meta-analysis. **The British journal of nutrition**, England, v. 116, n. 7, p. 1153–1164, 2016.

VOGT, É. L. *et al.* Metabolic and Molecular Subacute Effects of a Single Moderate-Intensity Exercise Bout, Performed in the Fasted State, in Obese Male Rats. **International journal of environmental research and public health**, [s. l.], v. 18, n. 14, 2021.

WALLIS, G. A.; GONZALEZ, J. T. Is exercise best served on an empty stomach?. **Proceedings of the Nutrition Society**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 1–8, 2018.

WATT, M. J.; SPRIET, L. L. Triacylglycerol lipases and metabolic control: Implications for health and disease. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 299, n. 2, p. 162–168, 2010.

WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 1229–1237, 1985.

WHITAKER, K. M. *et al.* Sedentary Behaviors and Cardiometabolic Risk: An Isotemporal Substitution Analysis. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 187, n. 2, p. 181–189, 2017.

WHO. **Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world**. [S. l.: s. n.], 2018. v. 28

WHO. **WHO Guidelines on physical activity and sedentary behaviour**. [S. l.: s. n.], 2016.

WIDRICK, J. J. *et al.* Carbohydrate feedings and exercise performance: Effect of initial muscle glycogen concentration. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 2998–3005, 1993.

WIDRICK, J. J. *et al.* Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 283, n. 2 52-2, p. 408–416, 2002.

WINNICK, J. J. *et al.* Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 771–778, 2008.

WIRTH, A.; WABITSCH, M.; HAUNER, H. The prevention and treatment of obesity. **Deutsches Ärzteblatt international**, [s. l.], v. 111, n. 42, p. 705–713, 2014.

WU, Z. *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. **Cell**, [s. l.], v. 98, p. 740–743, 1999.

ZANG, M. *et al.* AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v.

279, n. 46, p. 47898–47905, 2004.

ZARE A *et al.* Effect of Ramadan fasting on serum heat shock protein 70 and serum lipid profile. **Original Article Singapore Med**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 491–540, 2011. Disponível em: <http://smj.sma.org.sg/5207/5207a4.pdf>.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Obesity, inflammation, and insulin resistance - A mini-review. **Gerontology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 379–386, 2009.

ZOUHAL, H. *et al.* Exercise Training and Fasting: Current Insights. **Open access journal of sports medicine**, [s. l.], v. 11, p. 1–28, 2020.