

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

**EFEITOS DO JEJUM DE DIAS ALTERNADOS NO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA¹
EFFECTS OF ALTERNATE DAY FASTING ON THE GASTROCNEMIUS
MUSCLE IN WISTAR RATS TREATED WITH HIGH FAT DIET**

**Bruna Letícia Endl Bilibio², Diovana Gelati De Batista³, Lílian Corrêa
Costa Beber⁴, Lucas Machado Sulzbacher⁵, Gabriele Denque Cansi⁶,
Thiago Gomes Heck⁷**

¹ Pesquisa desenvolvida pelo Grupo de pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPeF

² Aluna do curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral Saúde-PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI), bruna_endl@hotmail.com.

³ Aluna do curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral Saúde-PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI), Diovana.G.deBatista@hotmail.com.br.

⁴ Aluna do curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral Saúde-PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI), liliantutty@hotmail.com.

⁵ Acadêmico de Enfermagem, bolsista PROBIC-FAPERGS no Grupo de Pesquisa em Fisiologia Humana da UNIJUI-GPeF, lucas.sulzbacher@hotmail.com.

⁶ Bolsista de Iniciação Científica do Ensino Médio, PIBIC-CNPQ no Grupo de Pesquisa em Fisiologia Humana da UNIJUI-GPeF, gabrieledenquecansi@gmail.com.

⁷ Professor Doutor, Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde-PPGAIS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia(GPeF), Departamento de Ciências da Vida-DcVida, UNIJUI, thiago.heck@unijui.edu.br.

INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública, cuja prevalência vem crescendo continuamente (IBGE, 2010), e está relacionada a ocorrência de inúmeras doenças cardiovasculares e metabólicas. Embora a obesidade possa ser decorrente de fatores genéticos, hormonais e ao sedentarismo, grande parte se deve a maus hábitos alimentares, como o consumo de dietas ricas em gorduras (Pereira, 2003). Nesse sentido, é fundamental a utilização de estratégias alimentares que auxiliem no combate ao ganho de peso e no emagrecimento.

No processo de emagrecimento, é recomendado que a perda de peso corporal ocorra com manutenção da massa magra e sem impactos negativos no metabolismo do indivíduo, pois o tecido muscular exerce grande influência no metabolismo (Pereira e De Souza Junior, 2010). Contudo, frente à alterações de consumo alimentar, como períodos prolongados de jejum, a massa muscular pode diminuir (Francischi, Pereira, Lancha, 2001), e junto a perda de massa muscular, pode ocorrer estresse oxidativo tecidual (DE ARAÚJO e DE MELO, 2012).

O jejum intermitente é uma estratégia de intervenção alimentar que vem sendo estudada no

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

tratamento de doenças metabólicas, principalmente obesidade e diabetes mellitus (Azevedo, Ikeoka, Caramelli, 2013). O jejum de dias alternados é uma modalidade de jejum intermitente onde intercala o consumo livre de alimentos dentro de um janela de tempo de 24 h e o jejum no dia posterior. Este modelo de jejum resulta em perda de peso (Stockman et al, 2018), no entanto, ainda não se têm conhecimento sobre o seus efeitos na massa magra ou estado redox muscular. Sabendo que o estresse oxidativo pode prejudicar a manutenção do tecido muscular (De Araújo e De Mello, 2012) o objetivo deste trabalho foi verificar se o Jejum de Dias Alternados (JDA) modifica parâmetros de estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de ratos *wistar* submetidos a dieta hiperlipídica.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo piloto, onde foram utilizados 6 ratos Wistar machos, com 14 semanas de idade. Eles foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério da UNIJUI, em caixas, com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água a vontade (*ad libitum*). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Uso de Animais (CEUA) da UNIJUI sob parecer 013/18.

Os animais receberam dieta hiperlipídica (DHL) *ad libitum* por quatro semanas e a seguir foram divididos em dois grupos: grupo DHL (n=3) e grupo JDA (n=3). o grupo JDA iniciou o jejum intermitente de dias alternados (jejum de 24 horas, seguido de consumo de DHL *ad libitum* no dia seguinte) e permaneceu até a oitava semana, enquanto o grupo DHL continuou recebendo DHL *ad libitum* durante esse período. A Dieta hiperlipídica era composta por 58,3% de gorduras, 24,5 % de carboidratos e 17, 2% de proteínas (Goettems-Fiorin, 2019), produzida semanalmente no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, a partir da ração padrão de animais de laboratório (Nuvilab ®) com adição de banha de porco.

Coleta e preparo do material biológico: na oitava semana, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de tecidos. Os músculos gastrocnêmio foram imediatamente coletados, pesados em balança analítica e congelados com auxílio da freeze clamp, e mantidos a -20°C . O peso do tecido muscular foi dividido pelo peso corporal para avaliação da massa muscular de cada animal. Posteriormente, esses tecidos foram homogeneizados com tampão KPi (pH 7,4) e inibidores de proteases (PMSF) para análise das variáveis de estresse oxidativo. Nos homogeneizados foi verificado a concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).

Foi avaliado o nível de de Lipoperoxidação das amostras pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), (Buege e Aust, 1978) e os resultados foram expressos em nmol/gTecido. Também foi avaliada a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) pelo método de inibição da auto-oxidação do pirogallol, por 120 min, a 420 nm (Marklund, 1974). Os resultados foram expressos em uSOD/gTecido.

Análise estatística: os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão. Os grupos foram comparados por teste Mann Whitney, considerado um nível de significância de 5% ($P < 0,05$), no programa GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

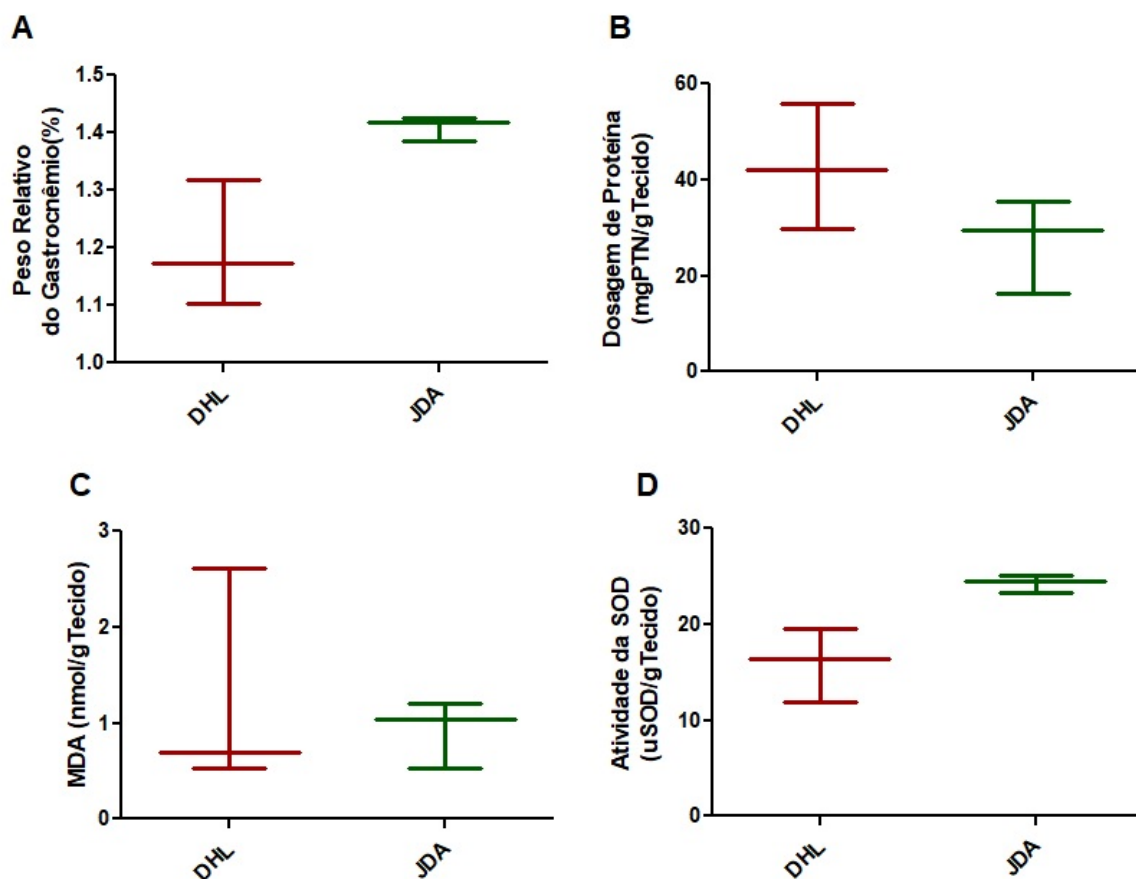


Figura 1. Resultados das análises do músculo gastrocnêmio referentes aos grupos DHL e JDA. **A.** Peso relativo do músculo gastrocnêmio (%) ($P=0,1$). **B.** Dosagem de Proteína no músculo gastrocnêmio (mgPTN/gTecido) ($P=0,2$). **C.** Concentração de malondialdeído (MDA) no músculo gastrocnêmio (nmol/gTecido) ($P=0,1$). **D.** Atividade de enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) no músculo gastrocnêmio (uSOD/gTecido) ($P=0,1$). Realizado Teste T não pareado seguido de teste de Mann Whitney, considerando nível de significância menor que 5%.

O JDA não teve efeitos sobre o peso relativo de tecido muscular entre os grupos (**Figura 1A**, $P=0,1$). Esses dados demonstram que o JDA, nesse período analisado, não comprometeu a massa muscular dos animais, comparado aos que permaneceram com livre acesso a DHL. Tais achados corroboram com os estudos de Gotthardt et al (2016) e de Moro et al (2016), onde os protocolos de JDA não alteraram a massa muscular em animais e humanos.

Ao analisar a quantidade de proteínas presente no gastrocnêmio (**Figura 1B**), observou-se não

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

haver diferença entre os grupos ($P = 0,2$). Contudo, estudos semelhantes apontam que o jejum parece afetar a expressão do genes específicos relacionados a manutenção das fibras musculares (Jia et al, 2019) reduzindo a síntese proteica (Dunn, Hputz e Hartsook, 1982). Essa manutenção da massa muscular, mesmo sob JDA, pode ser dar devido a adaptações do status redox muscular.

O JDA não alterou a concentração de MDA (**Figura 1C**, $P = 0,1$, tampouco a atividade da enzima SOD (**Figura 1D**, $P = 0,1$). No entanto, considerando que os valores de atividade da SOD dos três animais do grupo JDA estão acima dos valores dos três animais do grupo DHL, este estudo piloto indica que possa haver efeito nesta variável na continuidade do estudo, quando o número amostral observado for suficiente. Nesse sentido, alguns estudos mostram que o jejum de dias alternados pode melhorar as defesas antioxidantes (Sutton et al, 2018) em humanos. O JDA, inclusive, já foi associado a melhorias nas defesas antioxidantes e na resposta inflamatória no cérebro de ratos Wistar (Yuan Hu et al, 2017).

Estudos apontam ainda que o JDA não é capaz reverter o acúmulo de gordura intramuscular em ratos submetidos a dieta hiperlipídica, assim como a resistência insulínica nesse tecido (Higashida et al, 2013), além de não repercutir efeito sobre a fadiga e dor muscular em humanos (Boukhris et al, 2019). Estes efeitos, assim como os efeitos do JDA sobre estresse oxidativo e massa muscular serão foco da continuidade deste estudo.

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares indicam que o JDA não altera os parâmetros de estresse oxidativo no gastrocnêmio. As respostas deste estudo piloto indicam que as alterações metabólicas do jejum intermitente poderão ser observadas com uma quantidade amostral necessária, estimada a partir desses dados, em 8 animais por grupo. A conclusão deste trabalhos pode auxiliar no entendimento de como o JDA repercute no metabolismo muscular.

Palavras-chave: jejum intermitente; obesidade; perda de peso; massa muscular; estresse oxidativo.

Keywords: *intermittent fasting; obesity; weight loss; muscle mass; oxidative stress.*

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BOUKHRIS, Omar et al. Sleep Patterns, Alertness, Dietary Intake, Muscle Soreness, Fatigue, and Mental Stress Recorded before, during and after Ramadan Observance. **Sports**, v. 7, n. 5, p. 118, 2019.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. **In: Methods in enzymology**. Academic Press, 1978. p. 302-310.

CENSO, I. B. G. E. Disponível em: < <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>>., v. 23, 2010. Acesso em: 30/07/19.

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

DE ARAÚJO, Michel Barbosa; DE MELLO, Maria Alice Rostom. Exercício, estresse oxidativo e suplementação com creatina. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 15, 2012.
DE AZEVEDO, Fernanda Reis; IKEOKA, Dimas; CARAMELLI, Bruno. Effects of intermittent fasting on metabolism in men. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 59, n. 2, p. 167-173, 2013.

DUNN, Michael A.; HOUTZ, Sharyn K.; HARTSOOK, E. W. Effects of fasting on muscle protein turnover, the composition of weight loss, and energy balance of obese and nonobese Zucker rats. **The Journal of nutrition**, v. 112, n. 10, p. 1862-1875, 1982.

FRANCISCHI, Rachel Pamfilio; PEREIRA, L. O.; LANCHETA JR, A. H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Rev Paul Educ Fís**, v. 15, n. 2, p. 117-40, 2001.

GOETTEMES-FIORIN, Pauline Brendler et al. Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter exposure's effects by altering metabolic, oxidative, pro-inflammatory, and heat-shock protein levels. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2019.

HIGASHIDA, Kazuhiko et al. Effects of alternate-day fasting on high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. **Life sciences**, v. 93, n. 5-6, p. 208-213, 2013.

JIA, Wei-hua et al. Effect of skeletal muscle phenotype and gender on fasting-induced myokine expression in mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 514, n. 2, p. 407-414, 2019.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MORO, Tatiana et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 290, 2016.

PEREIRA, Benedito; DE SOUZA JUNIOR, Tácito Pessoa. **Metabolismo celular e exercício físico: aspectos bioquímicos e nutricionais**. Phorte Editora LTDA, 2010.

PEREIRA, Luciana O. et al. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2003.

STOCKMAN, Mary-Catherine et al. Intermittent fasting: is the wait worth the weight?. **Current obesity reports**, v. 7, n. 2, p. 172-185, 2018.

SUTTON, Elizabeth F. et al. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. **Cell metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1212-1221. e3, 2018.

HU, Yuan et al. Intermittent fasting pretreatment prevents cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. **The Journal of nutrition**, v. 147, n. 7, p. 1437-1445, 2017.