

**EFEITOS METABÓLICOS DE DOIS PROTOCOLOS DE JEJUM INTERMITENTE
EM COMPARAÇÃO À RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS**

Geneci Santos de Jesus Reis¹, Sandra Soares Melo², Daiana Perardt², Ana Paula Dalmagro²
Ana Elisa Gonçalves², Priscila Laiz Zimath², Márcia Maria de Souza²

RESUMO

O jejum intermitente (JI) tem sido alvo de investigações científicas para melhorar a saúde e aumentar a longevidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos metabólicos de dois protocolos de JI, 6 e 12h, em comparação à restrição dietética. Foram utilizados 28 ratos Wistar, machos, adultos, divididos em 4 Grupos (n=7): Controle (C) - dieta padrão ad libitum; Jejum 12h (J12); Jejum 6h (J6) - jejum por 6h e Grupo Restrição dietética de 20% (RD). Foram coletados peso corporal, consumo alimentar, ingestão hídrica, excreção urinária e fecal. Na quarta semana foram realizados os testes comportamentais para sistema motor, depressão e memória. Ao final das cinco semanas de estudo foi realizada a eutanásia com coleta de sangue, órgãos e gordura abdominal. O estresse oxidativo foi mensurado pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e glutathione reduzida (GSH) hepática. O jejum de 6 e 12h, bem como a RD não influenciaram ganho de peso, CEA, ingestão hídrica, excreção urinária e os testes comportamentais. Entretanto, ambos protocolos de jejum resultaram em menor bolo fecal, concentrações séricas de creatinina, hepáticas de GSH e peso de cérebro sem alterar os testes comportamentais, em comparação ao Grupo RD. O jejum de 6h promoveu maiores concentrações séricas de colesterol total e de AST. Ressalta-se que o Grupo J12 apresentou maior peso de fígado e o Grupo RD maior quantidade de gordura abdominal. Conclui-se que os protocolos de jejum de 6 e 12h apresentaram melhores efeitos metabólicos em comparação à restrição calórica de 20%.

Palavras-chave: Jejum. Restrição Calórica. Ratos. Perda de Peso.

ABSTRACT

Metabolic effects of two intermittent fasting protocols compared to caloric restriction in rats

Intermittent fasting (IJ) has been the target of scientific research to improve health and increase longevity. The present study aimed to evaluate the metabolic effects of two IJ protocols, 6 and 12h, compared to dietary restriction. Twenty-eight adult male Wistar rats were used, divided into 4 groups (n=7): Control (C) - standard ad libitum diet; Fasting 12h (J12); Fasting 6h (J6) - Fasting for 6h and Group Dietary restriction of 20% (DR). Body weight, food intake, water intake, urinary and fecal excretion were collected. In the fourth week the behavioral tests for motor system, depression and memory were performed. At the end of the five weeks of the study, euthanasia was performed with blood, organs and abdominal fat collection. Oxidative stress was measured by the determination of thiobarbituric acid reactive substances and reduced hepatic glutathione (SHG). The 6h and 12h fasting as well as the DR did not influence weight gain, CEA, water intake, urinary excretion and behavioral tests. However, both fasting protocols resulted in lower fecal bolus, serum creatinine, hepatic SHG concentrations, and brain weight without altering behavioral tests compared to the DR Group. The 6h fasting promoted higher serum total cholesterol and AST concentrations. It is noteworthy that Group J12 had higher liver weight and Group R12 had higher abdominal fat. It was concluded that the 6h and 12h fasting protocols presented better metabolic effects compared to the caloric restriction of 20%.

Key words: Fasting. Calorie restriction. Mice. Weight loss.

1 - Curso de Nutrição, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI/SC, Brasil.

2 - Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI/SC, Brasil.

INTRODUÇÃO

O jejum intermitente (JI) é uma abordagem dietética relativamente nova no campo de pesquisa para o controle do peso, pois sua eficácia e efeitos adversos não foram totalmente elucidados (Park e colaboradores, 2017).

O JI compreende um número específico de protocolos que podem ser agrupados em uma das três categorias: dias alternados de jejum, dia inteiro de jejum e tempo restrito de alimentação (Tinsley e La Bounty, 2015).

Decorrente da insuficiência de dados em animais e humanos, incluindo ensaios controlados quase inexistentes, esta conduta tem sido alvo de investigações na área de Nutrição (Horne e colaboradores, 2012).

De acordo com Longo e Mattson (2014) o JI promove em roedores proteção contra diabetes, câncer, doenças cardíacas e neurodegeneração.

Nos seres humanos o consumo de aproximadamente 500 kcal/dia, durante dois dias por semana, tem mostrado efeitos benéficos sobre as concentrações séricas de insulina, glicose, proteína C reativa e pressão sanguínea, além de aprimorar o desempenho cognitivo (Harvie e colaboradores, 2011; Patterson e colaboradores, 2015).

Em adição Wegman e colaboradores, (2015) sugerem que o JI pode ter efeitos benéficos nas vias biológicas afetando diretamente o metabolismo e aumentando a longevidade, mesmo em indivíduos saudáveis.

O jejum de dias alternados envolve "dias de jejum" em que não são consumidos alimentos ou bebidas contendo energia, variando com dias em que são ingeridos alimentos e bebidas ad libitum (Patterson e colaboradores, 2015).

Em humanos esse método é viável para períodos curtos em pessoas não obesas, não sendo indicado por longos períodos, pois efeitos colaterais como tontura, constipação, irritabilidade e ansiedade são referidos nos períodos de jejum (Hutchison e Heilbronn, 2016).

Os efeitos do jejum de dias alternados em roedores dependem da espécie e da idade em que tem início o protocolo, podendo variar de um efeito negativo até o aumento da longevidade em 30% (Arum e colaboradores, 2009).

Os ciclos de jejum prolongado em ratos, com duração de dois ou mais dias, separados por pelo menos uma semana de dieta normal, é uma estratégia altamente eficaz para proteger células e órgãos de condições tóxicas, enquanto aumenta a morte de muitos tipos de células cancerígenas (Shi e colaboradores, 2012).

A redução nas concentrações séricas de glicose, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é acompanhada por autofagia, além de causar redução de glóbulos brancos, seguida da regeneração do sistema imunológico com células-tronco após realimentação, redução do peso do fígado e massa corporal em ratos (Madeo e colaboradores, 2010; Cheng e colaboradores, 2014; Wasselin e colaboradores, 2014).

No entanto, o jejum prolongado, com ingestão apenas de água, é difícil para a grande maioria da população, e sua natureza extrema pode causar efeitos adversos, principalmente em indivíduos velhos e frágeis como a exacerbação de má nutrição. Neste caso, tornam-se necessárias intervenções dietéticas que induzam efeitos semelhantes minimizando o risco e a carga de restrição alimentar completa (Brandhorst e colaboradores, 2015).

A restrição calórica (RC) refere-se a uma dieta em que a ingestão energética se encontra abaixo do valor recomendado para animais e humanos, restringindo o consumo de energia em 20% a 50%, ou seja, é uma limitação do consumo alimentar abaixo do nível ad libitum com ausência de desnutrição. É considerada eficaz para perda de peso e manutenção da saúde para alguns indivíduos, porém difícil, pois requer cuidado vigilante e contagem de calorias diária.

Deste modo, o JI torna-se uma estratégia viável em animais, sendo que em humanos o tempo equivalente de jejum não tem sido estabelecido (Ribaric, 2012; Bales e Kraus, 2013; Barnosky e colaboradores, 2015).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos metabólicos de dois protocolos distintos de jejum intermitente, 6 e 12 horas, em comparação à restrição calórica em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), do Curso de Nutrição, da

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí-SC e os testes para memória, depressão e sistema motor nos Laboratórios do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da UNIVALI. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UNIVAFI, com número de parecer 040/17. Os procedimentos adotados seguiram a Lei nº 11.794 de 2008, para utilização de animais com fins científicos.

Animais: Foram utilizados 28 ratos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar e variação albinus, com 10 semanas de idade, peso médio inicial de $366 \pm 17,13$ g, procedentes do Biotério Central da UNIVALI, Campus I, Itajaí-SC. Os animais foram divididos em blocos ao acaso, em quatro Grupos: Controle (C) - ratos saudáveis que receberam dieta padrão (AIN 93M) (n=7); Grupo Jejum 12h (J12) - ratos que permaneceram em jejum por 12 horas e receberam dieta padrão ad libitum nas 12 horas restantes (n=7), Grupo Jejum 6 h (J6) - ratos que permaneceram em jejum por 6 horas e receberam dieta padrão ad libitum nas 18 horas restantes (n=7) e Grupo Restrição Dietética (RD) - ratos que receberam 80% das suas necessidades nutricionais ao longo das 24 horas (com redução de 20% das necessidades nutricionais) (n=7).

Dieta e ingestão hídrica: A dieta padrão oferecida para todos os grupos experimentais foi preparada segundo a recomendação do American Institute of Nutrition, que preconiza dieta adequada para manutenção de roedores adultos (AIN-93 M) (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993). A água para todos os grupos foi ofertada ad libitum.

Jejum intermitente e restrição dietética: Os animais do Grupo J12 foram submetidos a jejum de 12 horas, das 07:30 horas até às 19:30 horas do mesmo dia, recebendo dieta padrão ad libitum nas 12 horas restantes. Os animais do Grupo J6 foram submetidos a jejum de 6 horas, das 07:30 horas até às 13:30 horas, recebendo dieta padrão ad libitum nas 18 horas restantes. O Grupo RD recebeu 80% das necessidades energéticas consumidas pelo Grupo C. Para tanto ao longo do experimento foram registrados semanalmente o consumo médio habitual do Grupo C para readequar a quantidade de dieta oferecida.

Ambiente e gaiolas: Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, específicas para ratos, com maravalha e enriquecimento ambiental. Uma vez por

semana os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de dados referentes à ingestão hídrica, consumo alimentar, excreção urinária e excreção fecal.

A sala dos animais possuía ventilação promovida por insufladores e exaustores, com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h.

Delineamento experimental

Os animais permaneceram em período de adaptação ao ambiente durante cinco dias recebendo dieta comercial peletizada (Biobase®) e água ad libitum.

Após este período os animais receberam suas respectivas dietas de acordo com cada protocolo. Ao longo das cinco semanas de experimento foram coletados, uma vez por semana, os dados de consumo alimentar, peso corporal, ingestão hídrica, excreção urinária e fecal.

Na semana anterior a finalização do estudo foram coletados dados referentes a memória, sistema motor e depressão nos Grupos C, J12 e RD. O maior tempo de jejum foi escolhido para avaliação. Durante os experimentos os animais foram conduzidos para sala experimental e permaneceram em ambientação por um período mínimo de 1 hora.

Protocolo para estudo de memória - Teste do Reconhecimento de Objetos (TRO): O TRO baseia-se no princípio de que, animais criados em laboratório (roedores) sentem maior atração por objetos novos em seu ambiente de criação, do que por objetos já familiarizados.

Esta preferência é utilizada como um indicativo de memória. O procedimento foi realizado de acordo com Izquierdo e colaboradores (1998). O teste consiste em colocar o animal inicialmente frente a um objeto e, após 24 horas, expor este mesmo animal ao objeto apresentado anteriormente juntamente com um novo objeto.

A memória de reconhecimento é avaliada comparando o tempo gasto pelo animal explorando cada objeto durante a segunda tentativa. Com o tempo gasto em cada objeto calcula-se o índice de reconhecimento (IR) ($\text{Tempo B} \times 100 / \text{Tempo A} + \text{Tempo B}$). No 40º dia de experimento os animais foram colocados no aparato do Campo Aberto sem objetos, por 15 minutos somente para ambientação. No 41º dia os animais foram novamente colocados no

mesmo aparato com a presença do objeto A, por um período de 10 minutos (sessão treino). No 42º dia eles foram submetidos à avaliação da memória de reconhecimento (sessão teste). Nesta sessão, os animais foram novamente expostos ao aparato por 10 minutos, na presença de dois objetos: o objeto A e o um novo (B). Foram considerados satisfatórios os IRs com valores maiores de 50% (B>A).

Protocolo para estudo do sistema motor e depressão: Teste de campo aberto (TCA): O aparato utilizado para os experimentos com ratos foi confeccionado em madeira (30x30x15cm) com a frente de vidro para melhor visualizar os animais.

O interior de aparato foi subdividido em 9 quadrantes. Neste modelo, os três grupos foram testados (Grupos C, J12 e RC). Os testes avaliam os efeitos inespecíficos sobre o sistema nervoso central, sobretudo sobre o sistema motor dos animais. Foram observados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos dos quadrantes e número de atividades exploratórias caracterizadas por tentativas de levantar o corpo, apoiando-se sobre as patas traseiras conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2006). O tempo de observação foi de 6 minutos.

Protocolo para estudo de depressão: Modelo da natação forçada (MNF): Para a investigação do efeito antidepressivo os experimentos foram realizados conforme descrito por Sánchez-Mateo e colaboradores (2005).

Os animais foram colocados individualmente num tanque de vidro (25cm de altura e 10cm de diâmetro), cheio com água a temperatura de 24 a 25°C, durante 6 minutos. Foi cronometrado o tempo de imobilidade dos animais, o qual foi usado como parâmetro comportamental de anedonia, comportamento este, que indica o estado de desesperança do animal após perceber que a fuga do recipiente não foi possível, o tempo de nado (mobilidade) e de escalada (tentativa de escape) também foram parâmetros avaliados no teste.

Eutanásia e coleta de material biológico: Ao final da quinta semana de experimento foi realizada a eutanásia dos animais, por punção cardíaca do ventrículo direito, sem jejum prévio, para avaliar o efeito do jejum crônico e não agudo. Primeiramente, os animais foram anestesiados em plano anestésico profundo com Cloridrato de Cetamina 75mg/kg; Cloridrato de Xilazina 10mg/kg; Acepromazina 5mg/kg do animal, em

única aplicação, via intraperitoneal. Após abertura da parede tóraco-abdominal o sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm, a temperatura ambiente, por quinze minutos para a obtenção do soro. As determinações das concentrações séricas ao final do estudo de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia foram realizadas com auxílio de kits específicos para cada substância e a leitura realizada em equipamento automatizado Cobas Mira (Roche®). A peroxidação lipídica foi mensurada pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) no fígado, pelo método descrito por Uchiyama e Mihara (1978). Mediuse a absorbância em comprimento de onda igual a 535 nm, contra o branco da reação. As concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) foram calculadas por meio do coeficiente de absorvidade molar do produto ($E_{535} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A dosagem de glutathiona reduzida hepática (GSH) foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Raymond (1968).

O fígado, pâncreas, rim, baço, cérebro e gordura abdominal dos animais foram retirados, lavados em solução salina gelada, colocados sobre papel filtro e imediatamente pesados para comparação do peso entre os grupos.

Análise Estatística: As variáveis foram apresentadas como médias e desvios padrão. A determinação das diferenças entre os grupos experimentais foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), de duas vias, com pós-teste de Tukey-Kramer e auxílio do programa estatístico GraphPad InStat®, versão 3.0. Em todos os testes realizados foram consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) avalia a relação entre o ganho de peso corporal (g) e a média de consumo alimentar dos animais (g).

A Tabela 1 apresenta as médias de ganho de peso dos animais ao final do estudo e do CEA, sendo que os grupos não diferiram estatisticamente entre si para estas variáveis, assim como para ingestão hídrica e excreção urinária ao longo das cinco semanas de estudo (dados não demonstrados).

Tabela 1 - Médias e desvios padrão de ganho de peso (g) e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos diferentes grupos experimentais ao final das cinco semanas de estudo.

Grupos	Ganho de peso	CEA
C	49,43 (10,13)	2,92 (0,96)
RD	54,71 (15,85)	3,24 (1,17)
J6	47,28 (14,50)	2,49 (0,69)
J12	51,00 (16,77)	2,78 (0,42)
Valor de p	0,8072	0,4487

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h.

A Tabela 2 apresenta a excreção fecal dos animais nos períodos de estudo.

Os Grupos J6 e J12 diferiram com menor média em comparação aos Grupos C e

RD nas duas semanas iniciais e nas semanas subsequentes quando comparados ao Grupo RD.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da excreção fecal (g/dia) dos Grupos de estudo, durante as cinco semanas do experimento.

Grupos	1S	2S	3S	4S	5S
C	3,63(12,16) ^a	2,89 (1,20) ^a	2,16 (1,46) ^{ab}	3,20 (2,04) ^{ab}	2,11 (1,12) ^{ab}
RD	3,16 (0,50) ^a	2,85 (1,06) ^a	3,37 (1,44) ^a	3,31 (1,62) ^a	2,35 (1,28) ^a
J6	1,23 (0,38) ^b	1,45 (0,45) ^b	1,35 (0,64) ^b	1,35 (0,76) ^b	1,05 (0,46) ^b
J12	1,13 (0,35) ^b	1,44 (0,66) ^b	1,36 (0,39) ^b	1,21 (0,89) ^b	1,12 (0,52) ^b
Valor de p	0,0001	0,0037	0,0057	0,0125	0,0254

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; S – Semana; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

A Tabela 3 apresenta as médias e desvios padrão das concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol total e HDL-colesterol dos animais ao término do estudo.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para as concentrações de glicose, triglicérides e HDL-colesterol.

Em relação ao colesterol total o Grupo J6 exibiu maior média em comparação aos Grupos C e RD.

Observou-se tendência dos Grupos J6 e J12 exibirem maiores valores médios para HDL-colesterol quando comparados aos Grupos C e RD.

Tabela 3 - Médias e desvios padrão do perfil glicídico e lipídico (mg/dL) dos diferentes grupos experimentais, ao final do estudo.

Grupos	Glicose	Triglicérides	Colesterol Total	HDL-C
C	396,57(57,69)	132,28(34,28)	48,86 (7,90) ^a	25,43(5,62)
RD	331,71(57,04)	167,14(27,91)	49,28 (9,93) ^a	25,43(5,62)
J6	375,43(58,79)	131,71(57,48)	65,57 (10,58) ^b	31,80(3,42)
J12	421,86(113,55)	182,86(89,06)	54,28 (10,87) ^{ab}	30,06(5,07)
Valor de p	0,1780	0,2673	0,0141	0,0533

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

A Tabela 4 demonstra as médias e desvios padrão das concentrações séricas de AST, ALT, creatinina e ureia dos animais ao final do período experimental.

Observou-se menores médias de creatinina nos Grupos J6 e J12 em relação aos Grupos C e RD. Quanto às concentrações

séricas de AST o Grupo J6 apresentou maior média em comparação aos demais grupos.

Para as demais variáveis não foram identificadas diferenças estatísticas, sendo que os Grupos J6, seguido pelo Grupo J12 apresentaram tendência a exibir maiores valores médios de ALT e ureia.

Tabela 4 - Médias e desvios padrão do perfil hepático (U/L) e renal (mg/dL) dos grupos de estudo, ao término do experimento.

Grupos	AST	ALT	CREATININA	UREIA
C	104,57(19,93) ^a	28,57(10,11)	0,74(0,09) ^a	28,86(8,07)
RD	106,28(38,37) ^a	25,86(18,58)	0,66(0,13) ^a	27,86(6,17)
J6	179,00(51,53) ^b	51,28(24,15)	0,39(0,03) ^b	36,71(3,54)
J12	113,14(54,58) ^a	41,71(18,74)	0,33(0,04) ^b	32,28(6,50)
Valor de p	0,0039	0,0588	0,0001	0,0594

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

A Tabela 5 apresenta as médias e desvios padrão das concentrações hepáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e glutatona reduzida (GSH) dos grupos experimentais, ao final das cinco semanas do experimento.

Em relação às concentrações de GSH, observou-se que o Grupo RD diferiu com

menor média em comparação aos Grupos J6 e J12.

Embora sem diferença estatística significativa entre os Grupos, identificou-se tendência do Grupo J6 a exibir menor valor de SRATB em contraposição do Grupo RD, o qual apresentou maiores valores.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão das concentrações hepáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (nmol/mg tecido) e glutatona reduzida (GSH) (nmol/mg tecido) dos grupos experimentais, ao final do estudo.

Grupos	SRATB	GSH
C	1,21(0,29)	0,05(0,01) ^{ab}
RD	2,69(1,77)	0,04(0,01) ^a
J6	1,14(0,90)	0,05(0,01) ^b
J12	2,07(1,39)	0,05(0,01) ^b
Valor de p	0,0845	0,0242

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

A Tabela 6 apresenta os dados da variável gordura abdominal (g) nos animais ao final das cinco semanas de experimento. O

Grupo RD diferiu com maior média em relação ao Grupo C.

Tabela 6 - Médias e DP da gordura abdominal (g) dos grupos experimentais ao final do estudo.

Grupos	Gordura abdominal
C	4,45 (2,29) ^a
RD	7,77 (2,25) ^b
J6	6,36 (1,68) ^{ab}
J12	6,22 (1,80) ^{ab}
Valor de p	0,0433

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

Os dados referentes ao peso dos órgãos dos grupos experimentais ao final da quinta semana do estudo estão apresentados na Tabela 7.

Quanto aos valores de peso do fígado o Grupo J12 diferiu com maior média em

comparação ao Grupo RD. Em relação ao peso do cérebro os Grupos J6 e J12 exibiram menores médias do que os Grupos C e RD.

Para os demais órgãos não foram identificadas diferenças estatísticas.

Tabela 7 - Médias e desvios padrão do peso dos órgãos (g) dos animais ao final da pesquisa.

Grupos	Fígado	Cérebro	Rim	Baço	Pâncreas	Coração
C	12,59(0,73) ^{ab}	2,01 (0,07) ^a	1,25 (0,08)	0,88 (0,10)	0,76 (0,17)	1,04 (0,06)
RD	12,30 (1,14) ^a	2,03 (0,13) ^a	1,18 (0,11)	0,92 (0,10)	1,27 (0,88)	1,02 (0,09)
J6	13,71 (0,66) ^{ab}	1,73 (0,15) ^b	1,27 (0,07)	0,79 (0,09)	0,80 (0,29)	1,10 (0,06)
J12	14,52 (2,71) ^b	1,59 (0,17) ^b	1,18 (0,10)	0,81 (0,15)	0,88 (0,19)	1,09 (0,15)
Valor de p	0,0478	0,0001	0,1373	0,1454	0,2058	0,3736

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J6 – Jejum 6h; Grupo J12 – Jejum 12h; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com $p < 0,05$.

A Tabela 8 apresenta os dados referentes aos testes de memória, sistema motor e depressão realizados com os animais uma semana antes do final do experimento.

Foram coletados dados de campo aberto (crossing), campo aberto (rearing),

campo aberto (fezes), nado forçado (imobilidade), nado forçado (latência) e reconhecimento de objeto. Os grupos experimentais não diferiram entre si para os testes realizados.

Tabela 8 - Médias e desvios padrão dos testes comportamentais realizados na quarta semana de experimento.

Grupos	Teste reconhecimento Objeto (s)	Teste campo aberto Crossing (s)	Teste campo aberto rearing (s)
C	52,52 (20,36)	45,86 (12,43)	15,57 (3,87)
RD	41,16 (20,02)	54,86 (25,00)	18,58 (6,55)
J12	48,33 (24,60)	55,43 (8,20)	18,28 (7,20)
Valor de p	0,6219	0,5019	0,2481

Grupos	Teste campo aberto Fezes (g)	Teste nado forçado Imobilidade (s)	Teste nado forçado Latência (s)
C	0,00 (0,00)	64,14 (32,49)	32,43 (29,27)
RD	0,86 (1,07)	98,43 (91,92)	15,00 (18,80)
J12	0,86 (0,70)	87,71 (39,82)	15,57 (12,39)
Valor de p	0,658	0,5687	0,2477

Legenda: Grupo C – Controle; Grupo RD – Restrição Dietética; Grupo J12 – Jejum 12h.

DISCUSSÃO

O jejum intermitente é uma técnica que tem se tornado popular para o controle de peso por influenciara regulação metabólica por meio de efeitos no ciclo circadiano, na microbiota intestinal e fatores de estilo de vida (Patterson e colaboradores, 2015).

Entretanto, no presente estudo, o JI de 6 e 12h, assim como a RD, realizadas por cinco semanas, não influenciaram as variáveis ganho de peso e CEA, mantendo dados semelhantes ao do Grupo controle sem intervenção.

Diferentemente do presente estudo, pesquisas realizadas com JI de 24h em dias alternados com ratos, pelo período de três a

doze semanas resultou em menor consumo alimentar, coeficiente de eficácia alimentar e ganho de peso corporal.

Em humanos, a restrição calórica severa, por 12 semanas, com consumo de no máximo 25% das necessidades energéticas, alternado com dias de alimentação ad libitum, em indivíduos eutróficos e com sobrepeso apresentou redução de 5,2 kg do peso corporal e de 3,6 kg de massa adiposa em comparação ao Grupo Controle que foi de 1 Kg e 0,5Kg, respectivamente. Não foi observada diferença significativa da massa livre de gordura em comparação ao grupo controle (Varady e colaboradores 2013).

Michalsen (2013) relata que o jejum é capaz de induzir, diferentes respostas

neuroendócrinas. Inicialmente, ocorrendo ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal devido a redução da disponibilidade de glicose cerebral, redução das concentrações de insulina, leptina e sensação de fome.

Desta forma, no presente estudo, sugere-se que os protocolos de jejum intermitente de 6 e 12 horas e a restrição calórica não influenciaram as variáveis consumo alimentar, ganho de peso e CEA. Em contraposição os resultados observados na literatura foram realizados com restrição severa ou jejum de 24h, ou seja, com período de jejum maior. Entretanto, a adoção de tais protocolos na prática clínica seria de difícil adesão, devido à dificuldade em manter jejum por longos períodos.

Devido à insuficiência de estudos bem controlados, torna-se necessária a realização de mais pesquisas acerca do efeito dos diferentes protocolos de JI sobre a composição corporal, dentro de um delineamento dietoterápico individual. Os estudos disponíveis não justificam sua utilização de forma ampla e generalizada (Teng e colaboradores, 2011; Horne e colaboradores, 2012; Varady e colaboradores, 2013).

Quanto a excreção fecal os animais dos Grupos J6 e J12 exibiram menores médias em comparação aos Grupos C e RD, no decorrer de todo experimento. Embora sem diferença significativa no consumo alimentar e na ingestão hídrica, estes grupos apresentaram menores valores médios para estas variáveis, o que pode ter contribuído para a formação de menor bolo fecal.

Em relação ao perfil bioquímico o jejum intermitente de 6 horas conduziu a sobrecarga hepática, com elevação das concentrações séricas de colesterol total e de AST.

Tais resultados são diferentes do esperado, visto que no jejum de maior duração (12 h), estas alterações não foram encontradas. Uma possível explicação seria a liberação das reservas energéticas em curto prazo, aumentando as concentrações séricas de colesterol e da enzima AST e a utilização de todo estoque a longo prazo. Observou-se também a presença de catabolismo proteico, pela maior utilização de glicogênio, repercutindo em menores valores de creatinina sérica nos Grupos J6 e J12.

No presente trabalho observou-se que mesmo os animais não diferindo para a variável peso corporal, provavelmente devido

ao curto período de experimento (5 semanas) e diferentemente da literatura científica pela utilização de períodos menos prolongados de JI (6 a 12h versus 24 a 36h), percebeu-se que o Grupo J6 e J12 estavam iniciando provável perda de massa magra corporal em relação aos Grupos RD e C.

Desta forma sugere-se que caso a estratégia de jejum seja adotada e indicada por profissionais estes devem estar atentos a recomendá-lo por um período curto, a fim de evitar degradação proteica.

Juliet e colaboradores (2016) realizaram pesquisa com camundongos obesos C57BL6 por 8 semanas. Após um período de 4 semanas de JI com dieta padrão normolipídica e JI de dias alternados com dieta hiperlipídica os autores identificaram perda de peso com retenção da massa magra, por meio de um analisador de composição corporal.

De acordo com Wasselin e colaboradores (2014) o fígado, é um dos principais órgãos do metabolismo energético no organismo. Em casos de jejum, é observado estresse oxidativo exacerbado no fígado à medida que a duração do jejum é prolongada.

Mudanças no transcriptoma/proteoma induzidas por jejum tem relação com a utilização dos combustíveis metabólicos, independentemente das concentrações de ATP. Ocorre agravamento do estresse oxidativo durante a fase proteolítica de jejum, principalmente relacionados às concentrações séricas reduzidas de antioxidantes e diminuição da atividade enzimática da catalase hepática, malondialdeído (MDA) e proteína carbonil. Observa-se na literatura que o estágio prolongado de jejum (acima de 12h) conduz ao aumento da quebra de proteínas e maior estresse oxidativo.

Em contraposição para alguns autores ao esgotar o glicogênio das células do fígado, o jejum resulta em lipólise e na geração de corpos cetônicos, causando redução na gordura corporal. Os níveis de estresse oxidativo e inflamação são reduzidos em todo o corpo e cérebro em resposta à JI (Longo, Mattson 2014).

Corroborando com esses resultados o Grupo RD apresentou tendência a exibir maior valor médio de concentrações hepáticas de SRATB, marcador indireto de estresse oxidativo, mostrando que a restrição calórica de 20% resultou em maior formação de radicais livres, quando comparado ao jejum de

menor tempo (Grupo J6). Tais dados estão em consonância com as concentrações de GSH, visto que o Grupo RD utilizou maiores concentrações das enzimas antioxidantes hepáticas, em comparação aos Grupos J6 e J12.

O protocolo de restrição calórica de 20% resultou em menor peso de fígado dos animais quando comparado ao protocolo de jejum de maior tempo (Grupo J12). Em relação ao cérebro os Grupos J6 e J12 apresentaram menores médias quando comparados aos Grupos C e RD.

Weindruch e Sohal (1997) afirmam que em mamíferos, a privação grave de calorías resulta em diminuição do tamanho da maioria dos órgãos, exceto o cérebro, e os testículos em camundongos machos. Do ponto de vista evolutivo, é muito importante, a manutenção de alto nível de função cognitiva em condições de falta de alimentos.

Desde modo no presente estudo, sugere-se que os protocolos de jejum adotados proporcionaram menores valores de peso de cérebro, entretanto sem alterar as funções relacionadas à memória, à ansiedade e à depressão.

Pesquisa realizada em ratos Wistar, durante cinco semanas, com animais divididos em dois Grupos: 1 - restrição alimentar (n=8), sendo fornecido diariamente 50% de ração e Grupo 2 - controle (n=6), alimentado ad libitum, utilizou o mesmo método com teste de campo aberto. Os autores observaram que as cinco semanas de restrição alimentar aumentaram acentuadamente as concentrações plasmáticas de corticosterona e diminuíram significativamente as taxas de renovação de 5-hidroxitriptamina (5-HT) no hipocampo e no hipotálamo. Esses resultados sugerem que a restrição calórica crônica em ratos pode levar ao desenvolvimento de transtornos depressivos e aumento da ansiedade, provavelmente, em relação à disfunção do sistema 5-HT cerebral (Jahng e colaboradores, 2007).

Singh e colaboradores (2012) estudaram ratos albinos machos de linhagem Wistar na faixa etária de 3 meses, divididos em dois Grupos, 1 – animais privados de alimentação por 24h, a cada dois dias e 2 – Grupo controle alimentados ad libitum. Em roedores, o jejum de dias alternados melhorou a função cerebral, no desempenho em testes comportamentais de função sensorial e motora, aprendizagem e memória.

Benton e Nabb (2004) ressaltam que o jejum pode afetar a ingestão de energia e a disponibilidade de glicose. As concentrações baixas de glicose no sangue e no cérebro podem afetar o humor e o desempenho cognitivo. Os autores evidenciaram que refeições ricas em carboidratos aumentam a disponibilidade de triptofano e, portanto, a síntese de serotonina no cérebro.

Embora a literatura apresente dados que sugerem que a restrição dietética influencia aumentando o risco para ansiedade e depressão, e que o jejum contribui positivamente na função cerebral, no presente estudo o jejum de 6 e 12h, por ser de certo modo fisiológico, não influenciou os testes comportamentais. Provavelmente tal fato tenha ocorrido devido ao curto tempo de jejum 6 e 12h, diferente da literatura científica, que utilizou protocolos com maior tempo de jejum dos animais (24h).

Em relação à gordura abdominal ao final do estudo, a restrição dietética de 20% (Grupo RD), proporcionou aumento de gordura abdominal em comparação ao Grupo C, sendo que os protocolos de J1 não alteraram este parâmetro.

Varady e colaboradores, (2009) investigaram os impactos do jejum de dias alternados modificado em camundongos. Em um ensaio que comparou 85% de restrição de energia em dias de jejum alternados para a dieta ad libitum, a condição de energia restrita resultou em diminuição da gordura visceral.

CONCLUSÃO

O jejum de 6 e 12h, bem como a restrição dietética não influenciaram as variáveis ganho de peso, CEA, ingestão hídrica, excreção urinária e os testes comportamentais para o sistema motor, depressão e memória.

Entretanto, ambos protocolos de jejum resultaram em menor bolo fecal, concentrações séricas de creatinina, valores hepáticos de GSH e peso de cérebro sem alterar os testes que avaliaram o sistema motor, depressão e memória, em comparação ao Grupo RD. O jejum de 6h promoveu maiores concentrações séricas de colesterol total e de AST. Ressalta-se que o Grupo J12 apresentou maior peso de fígado e o Grupo RD maior quantidade de gordura abdominal.

Conclui-se que os protocolos de jejum de 6 e 12h embora não tenham se mostrado estratégias favoráveis para a perda de peso

em animais, apresentaram melhores efeitos metabólicos em comparação à restrição calórica de 20%.

Sugere-se a necessidade de realização de novos estudos de protocolos de jejum intermitente, com maior janela alimentar, para certificar-se da utilização destes como estratégias adjuvantes no controle metabólico.

REFERÊNCIAS

1-Arum, O.; Bonkowski, M.S.; Rocha, J.S.; Bartke, A. The growth hormone receptor gene-disrupted mouse fails to respond to an intermittent fasting diet. *Aging Cell*. Vol. 8. Num. 6. 2009. p. 617-769. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1474-9726.2009.00520.x>

2-Bales, C.W.; Kraus, W.E. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*. Vol. 33. Num. 4. 2013. p. 201-208. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3696577/>

3-Barnosky, A.R.; Hoddy, K.K.; Unterman, T.G.; Varady, K.A. Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Vol. 164. Num. 4. 2015. p. 312-311. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193152441400200X>

4-Benton, D.; Nabb, S. Breakfasts that release glucose at different speeds interact with previous alcohol intake to influence cognition and mood before and after lunch. *Behavioral Neuroscience*. Vol. 118. Num. 5. 2004. p. 936-943.

5-Brandhorst, S.; Choi, I.Y.; Wei, M.; Cheng, C.W.; Sedrakyan, S.; Navarrete, G.; Dubeau, L.; Yap, L.P.; Park, R.; Vinciguerra, M.; Biase, S.D.; Mirzaei, H.A. Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Health Span. *Cell Metabolism*. Vol. 22. Num. 1. 2015. p. 86-89. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413115002247>

6-Cheng, C.W.; Adams, G.B.; Perin, L.; Wei, M.; Zhou, X.; Lam, B.S.; Sacco, S.; Mirisola,

M.; Quinn, D.I.; Dorff, T.B.; Kopchick, J.J.; Longo, V.D. Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reserve immune suppression. *Cell Stem Cell*. Vol. 14. Num. 6. 2014. p. 810-823. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590914001519>

7-Harvie, M.N.; Pegington, M.; Mattson, M.P.; Frystyk, J.; Dillon, B.; Evans, G.; Cuzick, J.; Jebb, S.A.; Martin, B.; Cutler, R.G.; Son, T.G.; Maudsley, O.D.; Carlson, O.D.; Egan, J.M.; Flyvbjerg, A.; Howell, A. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women. *International Journal of Obesity*. Vol. 35. Num. 38. 2011. p. 714-727. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ijo2010171>

8-Horne, B.D.; Muhlestein, B.J.; May, T.H.; Carlquist, F.J.; Lappé, D.L.; Bair, A.J.L.; Heart, I. Relation of routine, periodic fasting to risk of diabetes mellitus, and coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *The American Journal of Cardiology*. Vol. 109. Num. 11. 2012. p. 1558-1562. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914912005954>

9-Hutchison, A.T.; Heilbronn, L.K. Metabolic impacts of altering meal frequency and timing - Does when we eat matter? *Biochimie*. Vol. 12. Num. 1. 2016. p. 187-197. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908415002333>

10-Izquierdo, M.J.; Liombart, M.P. El malestar em ladesigualdad. *Revista de Sociologia*. Vol. 62. Num. 1. 1998. p. 180-184.

11-Jahng, W.J.; Kim, H.J.; Chronic food restriction in young rats results in depression and anxiety like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Vol. 1150. Num. 1. 2007. p. 100-107. Disponível em* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899307005082>

12-Juliet, D.; Gotthardt, J.L.; Verpeut, B.L.; Yeomans, J.A.; Yang, A.Y.; Troy, A.R.; Nicholas, T.B. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss with Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and

Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology*. Vol. 55. Num. 2. 2016. p. 679-691.

13-Longo, V.D.; Mattson, M.P. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metabolism*. Vol. 19. Num. 2. 2014. p. 181-192.

14-Madeo, F.; Tavernarakis, N.; Kroemer, G. Can autophagy promote longevity? *Nature Cell Biology*. Vol. 12. Num. 9. 2010. p. 842-846. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncb0910-842>>

15-Michalsen, A.; L.I.C. Fasting therapy for treating and preventing disease - current state of evidence. *Forsch Komplement Med*. Vol. 20. Num. 6. 2013. p. 444-53.

16-Oliveira, L.; Cunha, A.O.S.; Mortari, M.R.; Coimbra, N.C.; Santos, W.F. Cataleptic activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. Vol. 30. Num. 2. 2006. p. 198-203. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584605003258>>

17-Park, S.; Yoo, K.M.; Hyun, J.S.; Kang, S. Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 40. Num. 63. 2017. p. 14-22. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316301243>>

18-Patterson, R.E.; Laughlin, G.A.; Croix, A.Z.L.; Marinac, C.; Gallo, L.C.; Hartman, S.J.; Natarajan, L.; Senger, C.M.; Martínez, M.E.; Villaseño, A. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. Vol. 115. Num. 8. 2015. p. 1203-1212.

19-Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*. Vol. 123. Num. 11. 1993. p. 1939-1951.

20-Ribaric, S. Diet and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 12. Num. 1. 2012. p. 1-20.

21-Sánchez-Mateo, C.C.; Bonkanka, C.X.; Prado, B.; Rabanal, R.M. Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. Extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 97. Num. 3. 2005. p. 541-547. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105000152>>

22-Singh, R.; Lakhanpal, D.; Kumar, S.; Sharma, S.; Kataria, H.; Kaur, M.; Kaur, G. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *American Aging Association*. Vol. 34. Num. 4. 2012. p. 917-933. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11357-011-9289-2>>

23-Sedlak, J.; Raymond, H. L. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*. Vol. 25. 192-205 1968.

24-Shi, Y.; Bosco, E.F.; Marti, T.M.; Orłowski, K.; Pruschy, M.; Stahel, R.A. Starvation-induced activation of ATM/Chk2/p53 signaling sensitizes cancer cells to cisplatin. *BMC Cancer*. Vol. 2. Num. 1. 2012. p. 553-571.

25-Teng, N.I.; Shahar, S.; Manaf, Z.A.; Das, S.K.; Taha, C.S.; Ngah, W.Z. Efficacy of fasting calorie restriction on quality of life among aging men. *Physiology e Behavior*. Vol. 104. Num. 5. 2011. p. 1059-1064. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938411003593>>

26-Tinsley, G.M.; La Bounty, P.M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. *Nutrition Reviews*. Vol. 73. Num. 10. 2015. p. 661-674.

27-Varady, K.A.; Bhutani, S.; Church, E.C.; Klempel, M.C. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 90. Num. 5. 2009. p. 1138-1143.

28-Varady, K.A.; Bhutani, S.; Klempel, M.C.; Kroeger, C.M.; Trepanowski, J.F.; Haus, J.M.; Hoddy, K.K.; Calvo, Y. Alternate day fasting for weight loss in normal weight and overweight subjects: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*. Vol. 12. Num. 1. 2013. p.146.

29-Wasselin, T.; Zahn, S.; Maho, Y.L.; Dorsselaer, A.V.; Raclot, T.; Bertile, F. Exacerbated oxidative stress in the fasting liver according to fuel partitioning. *Journal of Proteomics*. Vol. 14. Num. 6. 2014. p. 1905-1921. Disponível em:
 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201400051>>

30-Wegman, P.M.; Guo, M.H.; Bennion, D.M.; Shankar, M.N.; Chrzanowski, S.M.; Goldberg, L. A.; X.U.J.; Williams, T.A.; Lu, X.; Hsu, S.I.; Anton, S.D.; Leeuwenburgh, C.; Brantly, M.L. Practicality of Intermittent Fasting in Humans and its Effect on Oxidative Stress and Genes Related to Aging and Metabolism. *Rejuvenation Research*. Vol. 18. Num. 2. 2015. p. 162-172.

31-Weindruch, R.; Sohal, R.S.A. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 337. Num.14. 1997. p.986-994.

32-Uchiyama, M.; Mihara, M. Determinação do precursor do malonaldeído nos tecidos pelo teste do ácido tiobarbitúrico. *Analytical Biochemistry*. Vol. 86. 1978. p. 271-278.

E-mail dos autores:
 nutrigenecireis@gmail.com
 ssmelo@gmail.com
 daianaperardt@univali.br
 anap.dalmagro@gmail.com
 anaelisa.g@gmail.com
 prizimath@gmail.com
 msousa@univali.br

Autor para correspondência:
 Geneci Santos de Jesus Reis.
 Rua Irineu schimitz, número 140, Apt. 101.
 Bairro Águas Claras. Brusque-SC, Brasil.
 CEP: 88.353-613.

Recebido para publicação em 05/05/2020
 Aceito em 23/01/2021

AGRADECIMENTOS

Artigo 171 - FUMDES - Governo do Estado de Santa Catarina

CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse