



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Daniela Signorelli Balthazar**

**Efeitos de dois protocolos de jejum intermitente versus modificação dietética ou exercícios na microcirculação e na composição corporal de hamsters alimentados com ração hiperlipídica**

**Rio de Janeiro**

**2020**

Daniela Signorelli Balthazar

**Efeitos de dois protocolos de jejum intermitente versus modificação dietética ou exercícios na microcirculação e na composição corporal de hamsters alimentados com ração hiperlipídica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Castiglione

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B197 Balthazar, Daniela Signorelli.

Efeitos de dois protocolos de jejum intermitente versus modificação dietética ou exercícios na microcirculação e na composição corporal de hamsters alimentados com ração hiperlipídica / Daniela Signorelli Balthazar. – 2020. 106f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Castiglione.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliete Bouskela.

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Jejum - Teses. 2. Dieta hiperlipídica - Teses. 3. Composição corporal - Teses. 4. Microcirculação – Teses. 5. Permeabilidade capilar. I. Castiglione, Raquel Carvalho. II. Bouskela, Eliete. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.43

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Daniela Signorelli Balthazar

**Efeitos de dois protocolos de jejum intermitente versus modificação dietética ou exercícios na microcirculação e na composição corporal de hamsters alimentados com ração hiperlipídica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de outubro de 2020.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliete Bouskela

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Castiglione (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Daniel Alexandre Bottino

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luana Lopes de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Frauches Medeiros Coimbra

Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Maron Gutierrez

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2020

## DEDICATÓRIA

À minha mãe e ao meu filho, minhas fontes de inspiração e força.

## AGRADECIMENTOS

A Raquel, minha orientadora e amiga, por estar sempre presente me apoiando, compreendendo, estimulando, transmitindo confiança e contribuindo imensamente para o meu desenvolvimento profissional, assim como para a elaboração deste trabalho.

A professora Eliete Bouskela, minha coorientadora, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, inicialmente como técnica e hoje como sua aluna, pelo incentivo à ingressar no programa como doutoranda e por todo o suporte para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Fátima, pelo carinho e confiança, pela ajuda sempre que necessário, pelo treinamento nas técnicas de Biologia Microvascular e por sempre compartilhar sua expertise.

A Marcela, minha aluna de iniciação científica, por sua participação valiosa e dedicada no desenvolvimento desta pesquisa, e pela experiência como sua orientadora.

A Lorena e Lara, pela amizade e carinho, pelo apoio e parceria em momentos difíceis, e pela colaboração com o treinamento aeróbico e testes de capacidade física dos animais.

A Juliana, pela amizade e pela colaboração no treinamento na técnica de Western Blot.

A Carolina, pela colaboração com os experimentos de expressão de iNOS e eNOS.

A Graça, pelo material e conhecimento compartilhados, pelas críticas construtivas durante a elaboração desta tese e por sua revisão final.

Ao Fernando, pela colaboração na análise estatística dos resultados deste estudo.

Aos bioteristas Cláudio Natalino e Paulo José, pela ajuda e cuidado com os animais.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional da UERJ, especialmente ao técnico Jonathan Pereira, pela colaboração com os exames DEXA.

Ao meu filho Bernardo, por ser minha maior motivação e dar novo sentido à minha vida.

A minha mãe Hilda, por incentivar e apoiar incondicionalmente os meus sonhos, pelo suporte integral e irrestrito a todos os meus projetos, e por se dedicar incansavelmente a me proporcionar o melhor sempre, em todas as áreas da vida.

Aos meus avós, Aldo e Ilza, pelo carinho, cuidados e participação memorável na minha formação pessoal e acadêmica.

A minha terapeuta Suelen, pelo carinho e suporte psicológico.

Aos colegas do Laboratório BioVasc, amigos, familiares e a todos que contribuíram de alguma forma para esse projeto e para o meu desenvolvimento acadêmico, pelo apoio, por me motivarem e ensinarem, e por tornarem essa caminhada mais rica, leve e divertida.

But I still haven't found  
What I'm looking for  
*U2*

## RESUMO

BALTHAZAR, Daniela Signorelli. **Efeitos de dois protocolos de jejum intermitente versus modificação dietética ou exercícios na microcirculação e na composição corporal de hamsters alimentados com ração hiperlipídica.** 2020. 106 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O acúmulo anormal ou excessivo do tecido adiposo com potencial prejuízo à saúde é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como obesidade. O tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino ativo e, na obesidade, desencadeia um quadro de disfunção microvascular e aumenta a incidência de doenças cardiovasculares, com elevada morbidade e mortalidade. Estudos em roedores e humanos têm destacado a importância da frequência alimentar e os efeitos de períodos de jejum na redução da obesidade, e na prevenção e tratamento de diversas doenças, através da reprogramação de vias metabólicas. Nosso objetivo foi investigar os efeitos do jejum intermitente sobre a microcirculação e os parâmetros cardiometabólicos de hamsters com sobrepeso, comparando os resultados com a modificação dietética convencional (restrição calórica contínua) e treinamento por corrida em esteira (exercício físico aeróbio crônico). Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos foram alimentados por 12 semanas com ração padrão (comercial) ou hiperlipídica, iniciada 21 dias após o nascimento. Da semana 12 a 20, os animais foram alocados em 7 grupos: 1) CT (controle alimentado com ração padrão); 2) CTEX (controle associado ao exercício físico aeróbico moderado 5 vezes por semana); 3) HL (ração hiperlipídica); 4) HLRC (modificação da ração hiperlipídica para ração padrão); 5) HLJP (ração hiperlipídica com jejum de 48 horas consecutivas por semana); 6) HLJA (ração hiperlipídica com jejum de 24 horas em 2 dias alternados por semana); 7) HLEX (ração hiperlipídica com exercício físico 5 vezes por semana). A composição corporal foi analisada por densitometria por dupla emissão de raios-X (DEXA); a permeabilidade macromolecular microvascular foi avaliada na preparação da bolsa da bochecha do hamster e a expressão das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), no músculo cardíaco ventricular esquerdo e na aorta torácica, foi avaliada por imunoblotting. Observamos que a alimentação hiperlipídica promoveu aumento da massa corporal total e do tecido adiposo, redução da massa magra e aumento da permeabilidade microvascular após isquemia-reperfusão. O jejum intermitente periódico (HLJP) resultou em redução da massa corporal e do tecido adiposo semelhante à dieta convencional de restrição calórica contínua (HLRC), enquanto o jejum intermitente em dias alternados (HLJA) e o exercício físico (HLEX) não apresentaram o mesmo efeito. Os protocolos de jejum intermitente não parecem alterar a massa magra dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, o jejum em dias alternados (HLJA) recuperou a função microvascular ao diminuir a permeabilidade macromolecular. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão tecidual de iNOS ou eNOS. Portanto, nossos resultados sugerem que a frequência de jejum (em 2 dias alternados) parece restaurar a permeabilidade microcirculatória alterada pela sobrecarga de gordura, enquanto a duração do jejum (por 48 horas consecutivas) parece melhorar a composição corporal em hamsters alimentados com ração hiperlipídica.

Palavras-chave: Jejum intermitente. Dieta rica em gordura. Disfunção microcirculatória. Permeabilidade microvascular. Composição corporal.



## ABSTRACT

BALTHAZAR, Daniela Signorelli. **Effects of two intermittent fasting protocols versus dietary modification or exercise on microcirculation and body composition in hamsters fed with high-fat diet.** 2020. 106 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Abnormal or excessive accumulation of adipose tissue with potential damage to health is defined by the World Health Organization (WHO) as obesity. Adipose tissue is recognized as an active endocrine organ and, in obesity, elicits microvascular dysfunction and increases the incidence of cardiovascular diseases, with high morbidity and mortality. Studies in rodents and humans have highlighted the importance of feeding frequency and the effects of fasting periods in reducing obesity, and in the prevention and treatment of diseases, through reprogramming of metabolic pathways. Our aim was to investigate the effects of intermittent fasting on microcirculation and cardiometabolic variables in hamsters with overweight, comparing the results with conventional dietary modification (continuous caloric restriction) and treadmill training (chronic aerobic exercise). Male hamsters (*Mesocricetus auratus*) were fed for 12 weeks with standard (commercial chow) or high fat diet, delivered 21 days after birth. From week 12 to 20, the animals were distributed into 7 groups: 1) CT (control fed with standard chow); 2) CTEX (control associated with moderate chronic aerobic exercise 5 times a week); 3) HL (high fat diet); 4) HLRC (modification from high fat diet to standard chow); 5) HLJP (high fat diet with fasting for 48 consecutive hours per week); 6) HLJA (high fat diet with fasting for 24 hours on 2 alternate days per week); 7) HLEX (high fat diet with moderate chronic aerobic exercise 5 times a week). Body composition was analyzed by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA); the microvascular macromolecular permeability was assessed in the hamster's cheek pouch preparation and the expression of endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthases, in the left ventricular cardiac muscle and in the thoracic aorta, was assessed by immunoblotting. We observed that high fat feeding promoted an increase in total body mass and adipose tissue, a reduction in lean mass and an increase in microvascular permeability after ischemia-reperfusion. Periodic intermittent fasting (HLJP) resulted in a reduction in body mass and adipose tissue similar to the conventional diet of continuous caloric restriction (HLRC), while alternate day intermittent fasting (HLJA) and physical exercise (HLEX) did not exhibit the same effect. The intermittent fasting protocols do not seem to alter the lean mass of the animals fed with high fat diet. In addition, alternate day fasting (HLJA) recovered the microvascular function by decreasing macromolecular permeability. No significant differences were found in the tissue expression of iNOS or eNOS. Therefore, our findings suggest that the frequency of fasting (on 2 alternate days) seems to restore microcirculatory permeability altered by fat overload, while the duration of fasting (for 48 consecutive hours) seems to improve body composition in hamsters fed with high fat diet.

Keywords: Intermittent fasting. High fat diet. Microcirculatory dysfunction. Microvascular permeability. Body composition.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Mapa da prevalência de indivíduos obesos acima de 18 anos no mundo em 2016 entre mulheres (A) e homens (B).....	20
Figura 2–	Mapa da prevalência de indivíduos com sobrepeso acima de 18 anos no mundo em 2016 entre mulheres (A) e homens (B).....	21
Figura 3–	Mapa da prevalência de indivíduos obesos no Brasil e no mundo em 1980 e em 2015 (Azul); e mapa com a proporção do aumento da obesidade no Brasil e no mundo desde 1980 a 2015 (Laranja).....	22
Figura 4–	Adiposopatia: causas, respostas fisiológicas e consequências patogênicas.....	26
Figura 5–	Principais depósitos de tecido adiposo branco em pacientes obesos ou com sobrepesos: visceral, subcutâneo, epicárdico, medula óssea, perirrenal, periadventicial e pulmonar.....	29
Figura 6–	Imagem por microscopia eletrônica da microcirculação do músculo esquelético, onde os capilares (Ca) são orientados na mesma direção das fibras musculares e esta rede é suprida por uma arteríola (Ar) e coletada por uma vênula (Ve).....	31
Figura 7–	Síntese de óxido nítrico (NO) pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS): inicialmente ocorre a hidroxilação da L-arginina, gerando N-hidroxi-L-arginina (NHA) e, numa segunda etapa, ocorre a conversão de NHA em NO e citrulina.....	34
Figura 8–	Fotos mostrando a localização anatômica (A) e o tecido vascularizado em forma de saco (B) da bolsa da bochecha do hamster.....	37
Figura 9–	Imagens da microcirculação da bolsa da bochecha do hamster (A) feita através de 70 fotografias montadas e reproduzidas em escala reduzida; a proporção de 1 mm é indicada na figura; e detalhe da microcirculação observada na figura A, com ampliação de 35x (B); a proporção de 100 µm é indicada na figura.....	38
Figura 10–	Desenho experimental e grupos de tratamento.....	51
Figura 11–	Esquema com etapas do experimento de permeabilidade a macromoléculas por isquemia-reperfusão na bolsa da bochecha.....	57

Figura 12–	Fotos das etapas de preparação da bolsa da bochecha do hamster: a bolsa é evertida (A), fixada na placa de silicone (B) e dissecada, resultando em uma preparação de camada única, mantida sob perfusão constante com solução tamponada aquecida, e a microcirculação vista em microscópio ótico (objetiva de 5x de aumento) (C).....	59
Figura 13–	Sistema de microscopia intravital: reservatório com a solução HEPES (buffer reservoir) conectado ao cilindro de gás, ao sistema de aquecimento (water bath e serpentinas) e a uma bomba de perfusão (peristaltic pump)...	59
Figura 14–	Imagens com a preparação da bolsa de bochecha do hamster montada na placa de acrílico fixada com pinos metálicos no anel de silicone (A) e o torniquete inflável posicionado ao redor do pescoço da bolsa da bochecha preparado para iniciar a isquemia (B).....	60
Figura 15–	As fotos exibem a microcirculação da bolsa da bochecha do hamster (A) vista ao microscópio ótico com FITC-dextrana sob luz UV (objetiva de 10x); com destaque para os leaks ou pontos de extravasamento microvascular (B), visualizados e contados durante o período de reperfusão.....	61
Figura 16–	Consumo de calorias no período de intervenção (8 semanas), apresentado por semana para cada grupo.....	62
Figura 17–	Massa de tecido adiposo total (g) e relativa (%)......	65
Figura 18–	Massa magra total (g) e relativa (%)......	67
Figura 19–	Permeabilidade macromolecular em vênulas pós-capilares após 30 minutos de isquemia seguida de reperfusão na bolsa da bochecha do hamster.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Composição da ração hiperlipídica e da ração padrão.....	52
Tabela 2–	Nutrientes da ração hiperlipídica e da ração padrão.....	52
Tabela 3–	Massa corporal, níveis de glicose e perfil lipídico.....	63
Tabela 4–	Expressão protéica de eNOS e iNOS no tecido cardíaco.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
IMC	Índice de massa corporal
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
VIGITEL	Pesquisa de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
sGC	Guanilato ciclase solúvel
GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
AMPC	Adenosina 3'-5'- monofosfato cíclico
Ca <sup>2+</sup>	Íons de cálcio
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
ET-1	Endotelina-1
UCP-1	Termogenina ou proteína desacopladora-1
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RONS	Espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio
MCP-1	Fator quimiotático de monócitos 1
MIF	Fator inibitório da migração de macrófagos
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
apoB	Apolipoproteína B
DEXA	Densitometria por dupla emissão de raios-X
SNC	Sistema nervoso central
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
MLCK	Cinase de cadeia leve da miosina
I/R	Lesão por isquemia seguida por reperfusão
ATP	Adenosina trifosfato
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
C5 <sub>a</sub>	Fragmento de proteína da clivagem do componente C5 do complemento
CCK	Colecistocinina
GLP-1	Peptídeo glucagon símile-1
βOHB	Corpo cetônico beta-hidroxibutirato
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
PKG	Proteína cinase dependente de GMPC
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
PKC	Proteína cinase C
CEUA	Comitê de experimentalção animal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
NIH	Instituto Nacional de Saúde
CT	Grupo controle normal (ração padrão ou comercial) sem intervenção
CTEX	Grupo controle normal e exercício físico aeróbico
HL	Grupo ração hiperlipídica sem intervenção
HLRC	Grupo ração hiperlipídica e mudança para ração comum (dieta convencional)
HLJP	Grupo ração hiperlipídica e jejum intermitente periódico (48h consecutivas)
HLJA	Grupo ração hiperlipídica e jejum intermitente alternado (24h alternadas x2)
HLEX	Grupo ração hiperlipídica e exercício físico aeróbico
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Tris-HCl	Tampão tris(hidroximetil)aminometano com cloreto de sódio
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ânion bicarbonato
HEPES	Ácido N'-2'-hidroxietilpiperazine-N'-2-etanosulfônico

KCl	Cloreto de potássio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaVO <sub>3</sub>	Metavanadato de sódio
Na <sup>+</sup>	Íons de sódio
UV	Ultravioleta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS-Tween	Solução salina tamponada com tris com polisorbato
PE	Polietileno
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Peso inicial
PE	Peso de engorda
PF	Peso final
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AKT	Proteína cinesse B ou PKB de regulação do ciclo celular
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
IKK	Complexo de subunidade IκB cinase ou cinase I kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
NHA	N-hidroxi-L-arginina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil inibidor da serina protease
ECL	Quimiluminescência aprimorada
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
×	Multiplicação
β	Beta
mL	Mililitro
dL	Decilitro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
g	Gramas
kg	Quilogramas
μm	Micrometro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
m	Metro
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrado
rpm	Rotações por minuto
rcf	Força centrífuga relativa
α	Alfa
m/min	Metros por minuto
mg/dL	Miligrama por decilitro
kg/m <sup>2</sup>	Quilograma por metro quadrado



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	19
1.1	<b>Obesidade e sobrepeso</b> .....	19
1.1.1	<u>Epidemiologia</u> .....	19
1.1.2	<u>Tecido adiposo</u> .....	23
1.1.2.1	Histologia, classificação e funções.....	23
1.1.2.2	Adiposidade, lipotoxicidade e doenças cardiometabólicas.....	25
1.2	<b>Microcirculação e disfunção microvascular</b> .....	30
1.2.1	<u>Microcirculação – estrutura e função</u> .....	30
1.2.2	<u>Papel vasoativo do endotélio e o óxido nítrico</u> .....	32
1.2.3	<u>Permeabilidade microvascular</u> .....	34
1.2.3.1	Métodos para avaliação da microcirculação e a preparação da bolsa da bochecha.....	36
1.2.4	<u>Disfunção microvascular e doenças cardiometabólicas</u> .....	38
1.3	<b>Tratamento da obesidade e os fatores modificáveis associados ao estilo de vida</b> .....	40
1.3.1	<u>Intervenções não-farmacológicas tradicionais e o jejum intermitente</u> .....	40
1.3.1.1	Dieta convencional de restrição calórica contínua.....	41
1.3.1.2	Exercício físico aeróbico crônico.....	43
1.3.1.3	Jejum intermitente ou restrição calórica intermitente.....	45
2	<b>OBJETIVO</b> .....	49
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	49
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	49
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
3.1	<b>Modelo animal e desenho experimental</b> .....	50
3.2	<b>Protocolo de exercício e teste de capacidade física</b> .....	52
3.2.1	<u>Teste de exercício incremental</u> .....	52
3.2.2	<u>Protocolo de treinamento aeróbico</u> .....	53
3.3	<b>Glicemia</b> .....	53
3.4	<b>Massa corporal total e composição corporal</b> .....	53

3.5	<b>Coleta de sangue e tecidos.....</b>	54
3.6	<b>Perfil lipídico.....</b>	55
3.7	<b>Extração de proteínas.....</b>	56
3.8	<b>Imunodeteção para avaliar a expressão protéica tecidual de eNOS e iNOS.....</b>	56
3.9	<b>Permeabilidade microvascular a macromoléculas.....</b>	57
3.9.1	<u>Preparação da bolsa da bochecha do hamster.....</u>	57
3.9.2	<u>Protocolo de isquemia e reperfusão.....</u>	60
3.9.3	<u>Microscopia intravital para avaliar a permeabilidade microvascular à macromoléculas.....</u>	60
3.10	<b>Análise estatística.....</b>	61
4	<b>RESULTADOS .....</b>	62
4.1	<b>Avaliação nutricional.....</b>	62
4.2	<b>Massa corporal total e parâmetros metabólicos.....</b>	63
4.3	<b>Composição corporal.....</b>	64
4.4	<b>Expressão de eNOS e iNOS no músculo cardíaco e aorta torácica.....</b>	68
4.5	<b>Análise da permeabilidade macromolecular induzida por isquemia e reperfusão.....</b>	68
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	70
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	91
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	92

## INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino ativo que produz uma variedade de citocinas, conhecidas como adipocinas (1). O acúmulo anormal ou excessivo do tecido adiposo com potencial prejuízo à saúde é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como obesidade (2). Com o acúmulo da massa gorda, a produção de adipocinas inflamatórias aumenta, resultando em um quadro de inflamação local e sistêmica (3,4).

A obesidade se tornou uma pandemia dos tempos modernos, com previsão de que sua incidência aumente a cada ano. Segundo dados do Ministério da Saúde, a obesidade já acomete 18,9% dos brasileiros, e o sobrepeso atinge mais da metade da população (54%) (5).

A alta incidência de obesidade tem relação direta com mudanças nos ambientes econômico e social que levaram a alterações nos padrões de atividade física e dietética da população, com o aumento do sedentarismo e da oferta de alimentos altamente calóricos, com baixo valor nutricional e baixo custo (5–9). Junto com esta epidemia, e em decorrência do excesso de gordura corporal, ocorre um aumento na incidência de diversas doenças associadas à obesidade, tais como diabetes, câncer, Alzheimer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, que também apresentam alta prevalência na sociedade em geral (10–12).

O risco de doença cardiovascular na obesidade, com elevada morbidade e mortalidade, está associado ao quadro de disfunção microvascular, que ocorre em adultos e crianças obesos. De acordo com a literatura, alterações na microcirculação, cujos vasos têm diâmetro menor que 100µm (arteríolas, capilares, vênulas e microlinfáticos), são preditoras de complicações e lesões em órgãos-alvo (13–16).

É na microcirculação que ocorrem as principais funções do sistema vascular: troca de nutrientes com os tecidos, a remoção de excretas celulares em resposta às variações de demanda e o equilíbrio hidrostático, evitando grandes flutuações de pressão nos capilares (17).

O objetivo deste projeto é investigar os efeitos do jejum intermitente sobre marcadores da saúde cardiometabólica, tais como: função microvascular, glicemia, perfil lipídico e composição corporal, em animais submetidos à alimentação hiperlipídica, em comparação às abordagens tradicionais de modificação dietética (dieta convencional ou de restrição calórica contínua) e exercício físico aeróbico crônico.

A restrição calórica está associada à melhora da saúde, aumento da longevidade e redução da morbidade e mortalidade. Além disso, desencadeia uma série complexa de eventos

intricados, incluindo a ativação de elementos de resposta ao estresse celular e alteração no equilíbrio hormonal, conferindo diversos benefícios a indivíduos obesos. Dentre eles estão manutenção da função cardiovascular normal, redução do tecido adiposo, melhora da sensibilidade à insulina, controle do diabetes, preservação da função cognitiva e prevenção do desenvolvimento de câncer associado à obesidade (18–20).

Apesar dos benefícios apresentados, dietas com restrição calórica crônica são difíceis de serem postas em prática e de serem mantidas à longo prazo. Nesse contexto, o jejum intermitente vem ganhando popularidade e a atenção de especialistas em saúde em todo o mundo como uma prática alternativa, que tem demonstrado ser tão eficaz quanto a tradicional restrição calórica contínua para a perda de peso, sensibilidade à insulina e biomarcadores cardiometabólicos (21–28).

Portanto, para permitir uma maior compreensão sobre o tema investigado, serão descritos a seguir os mais recentes estudos e dados da literatura que discutem os principais temas mencionados anteriormente. Abordaremos os efeitos destas diferentes intervenções sobre os indicadores em questão, além de delinear os objetivos e as respectivas hipóteses da presente tese.

## 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Obesidade e sobrepeso

#### 1.1.1 Epidemiologia

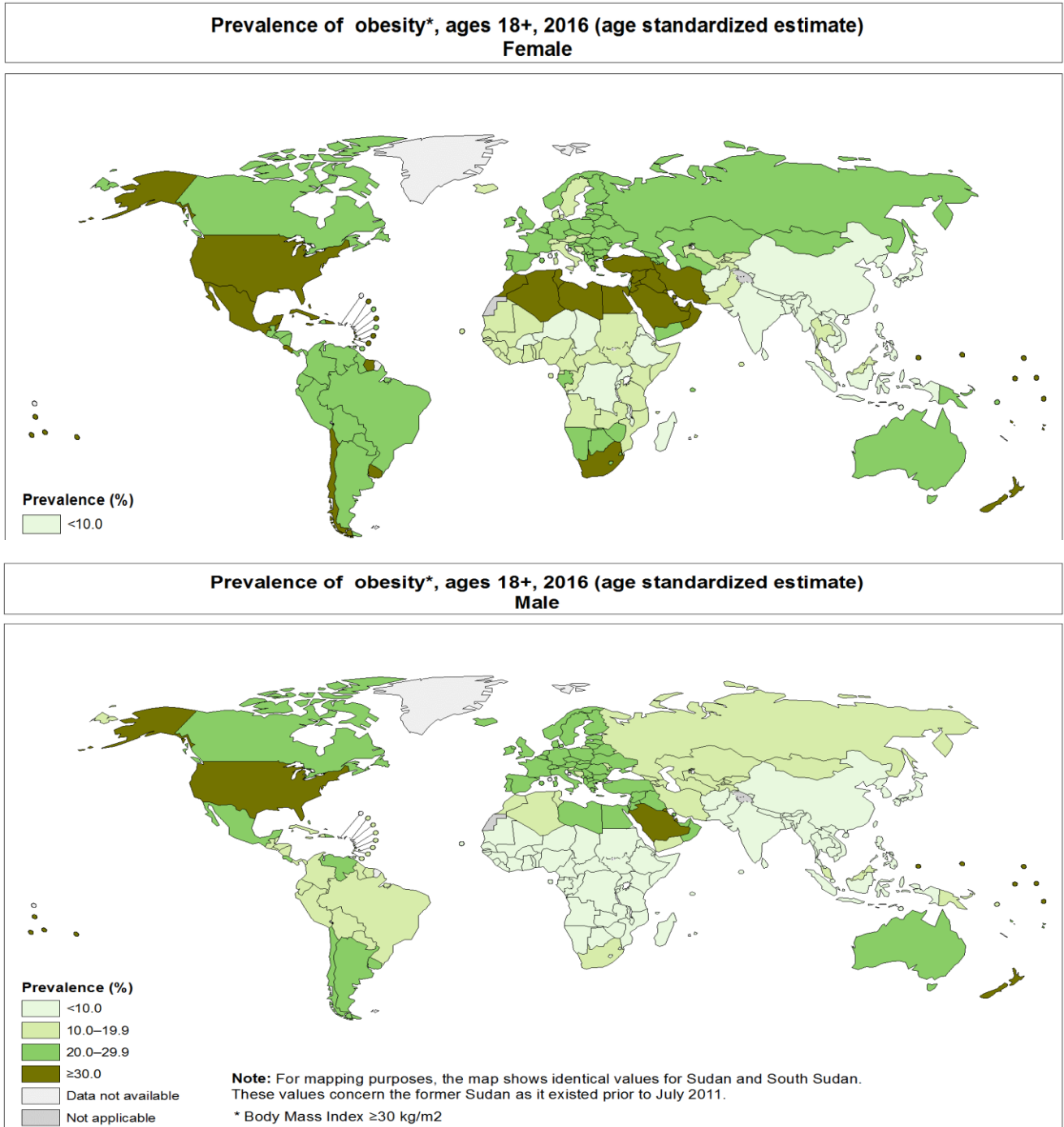
Estima-se que 1,1 bilhão de pessoas em todo o mundo sejam obesas (29). A obesidade é uma doença multifatorial complexa, que envolve aspectos biológicos, históricos, ecológicos, políticos, socioeconômicos, psicossociais e culturais, sendo caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (tecido adiposo branco) em um nível que compromete a saúde do indivíduo (30).

Em estudos epidemiológicos para o diagnóstico da obesidade em adultos o parâmetro mais utilizado é o índice de massa corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso do paciente, medido em quilogramas, pela sua altura elevada ao quadrado, medida em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Este padrão, utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considera o peso normal quando o resultado do cálculo do IMC está entre 18,5 e 24,9, o sobrepeso quando o IMC alcança valor igual ou superior a 25, e obesidade quando o IMC for igual ou superior a 30 (2).

A OMS descreve a obesidade como um dos problemas de saúde pública mais evidentes porém mais negligenciados, que ameaça sobrecarregar tanto os países mais desenvolvidos quanto os menos desenvolvidos. Os problemas de sobrepeso e obesidade só alcançaram reconhecimento global nas três últimas décadas, caracterizando-se como uma epidemia mundial crescente, em contraste com o baixo peso, desnutrição e doenças infecciosas que sempre dominaram as atenções (29,31).

Em 2016, 39% da população mundial de mulheres e homens com 18 anos ou mais tinham excesso de peso (2). A prevalência de obesidade entre crianças e adolescentes em todo o mundo aumentou significativamente nas últimas décadas, e uma análise do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) informou que 16,5% das crianças e adolescentes estão acima do peso, e 21,4% são obesos (Figuras 1 e 2) (32).

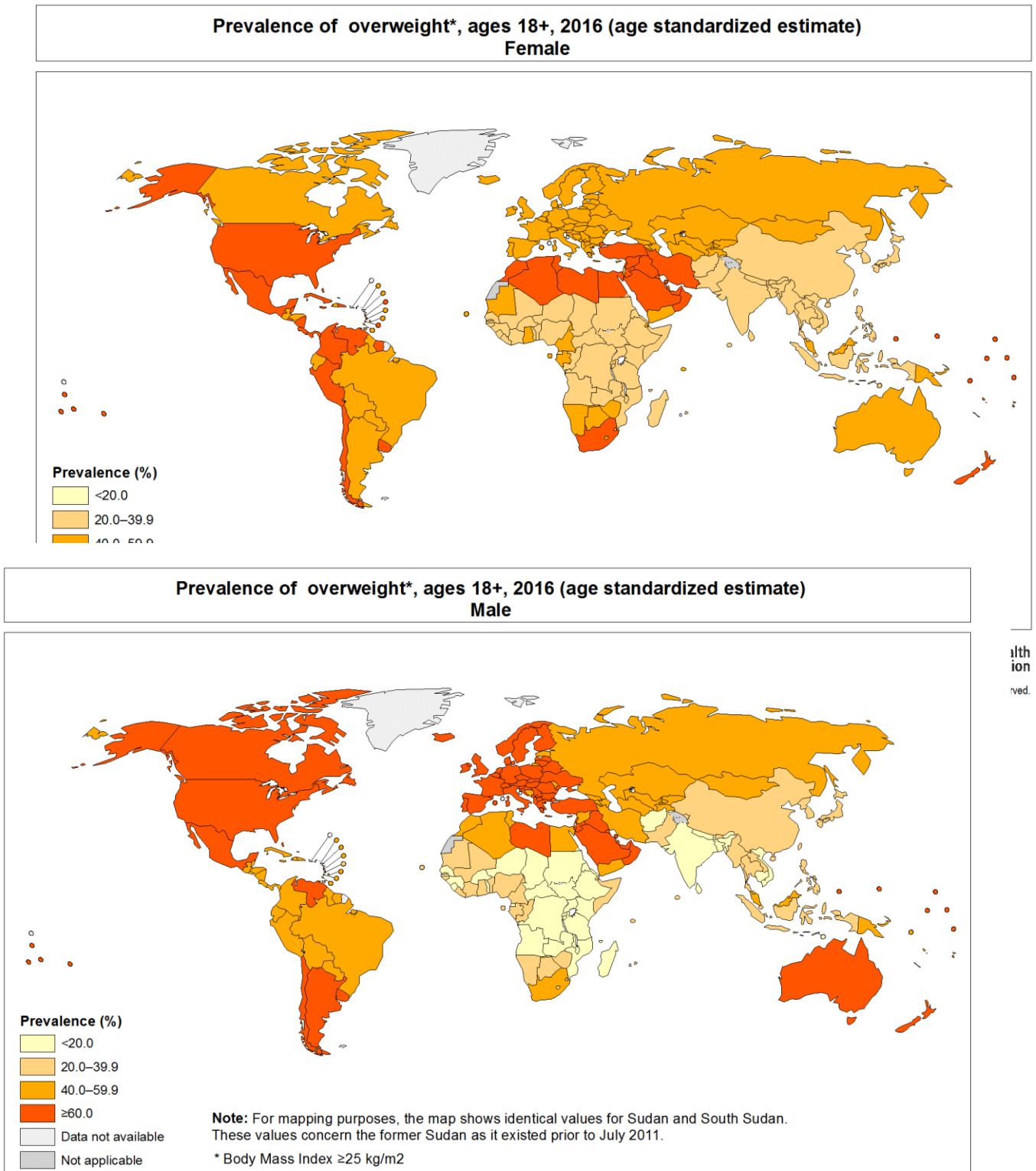
Figura 1 - Mapa da prevalência de indivíduos obesos acima de 18 anos no mundo em 2016 entre mulheres (A) e homens (B). Fonte: Publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Information Evidence and Research (IER)  
World Health Organization

Figura 2 - Mapa da prevalência de indivíduos com sobrepeso acima de 18 anos no mundo em 2016 entre mulheres (A) e homens (B)



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

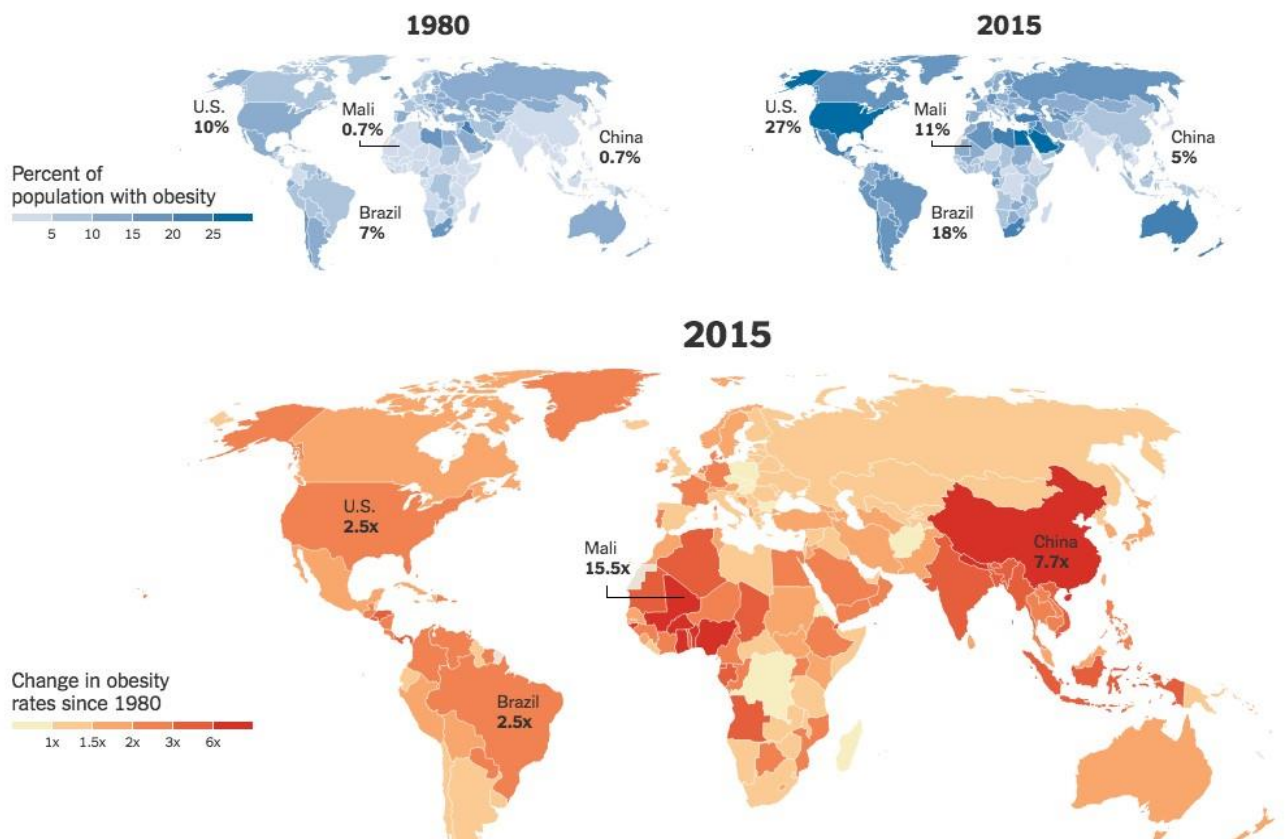
Data Source: World Health Organization  
Map Production: Information Evidence and Research (IER)  
World Health Organization



© WHO 2017. All rights reserved.

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade vêm aumentando em todas as faixas etárias e em ambos os sexos, em todos os níveis de renda, sendo a velocidade de crescimento mais expressiva na população com menor rendimento familiar (31). Segundo dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), a proporção de pessoas acima do peso avançou de 42,6%, em 2006, para 54%, em 2017, o que significa que cerca de 5 a cada 10 pessoas apresentavam sobrepeso. No mesmo período, o percentual de indivíduos considerados obesos subiu de 11,8% para 18,9%, totalizando cerca de 40 milhões de pessoas. Embora o ritmo de crescimento da ocorrência de obesidade no Brasil tenha se estabilizado desde 2015, ainda é um índice preocupante pois, somando o total de indivíduos acima do peso, o montante chega a mais de 100 milhões de indivíduos, mais que o dobro de há três décadas (Figura 3) (5).

Figura 3 - Mapa da prevalência de indivíduos obesos no Brasil e no mundo em 1980 e em 2015 (Azul); e mapa com a proporção do aumento da obesidade no Brasil e no



mundo desde 1980 a 2015 (Laranja)

Fonte: Institute for Health Metrics and Evaluation. Publicado por Audrey Carlsen no *The New York Times* em 2017.



A epidemia mundial de obesidade reflete reduções progressivas da atividade física ao longo dos séculos e relacionadas à idade, juntamente com substanciais mudanças na dieta com o excesso do consumo de energia, apesar dos processos neurobiológicos que controlam a ingestão de alimentos (29).

A obesidade tem relação direta com o sedentarismo e com o aumento da oferta de alimentos altamente calóricos, com baixo valor nutricional e de baixo custo (33). A redução da ingestão de alimentos preparados em casa, substituídos por alimentos industrializados e *fast-foods*, o aumento do consumo de refrigerantes, da grande proporção de calorias derivadas de gordura, somados à redução da atividade física, são fatores etiológicos responsáveis pelo crescimento da prevalência da obesidade e do sobrepeso nas populações urbanas do ocidente (34–36).

No Brasil, os inquéritos nacionais das últimas décadas demonstram um declínio do consumo de alimentos regionais, ricos em nutrientes e fibras, e um aumento de até 400% no consumo de alimentos processados, ricos em açúcar e sódio (37), paralelamente ao incremento da obesidade (5).

### 1.1.2 Tecido adiposo

Estudos das últimas duas décadas estabeleceram o tecido adiposo como um órgão dinâmico que realiza vários processos fisiológicos importantes (38). Como em outros órgãos do corpo, a anatomia e a funcionalidade do tecido adiposo estão inter-relacionadas, e sua composição histológica depende de características individuais, tais como: idade, raça, sexo, genética, ambiente, balanço calórico, conteúdo alimentar ingerido e atividade física, além da origem ou localização do tecido adiposo em questão (3).

#### 1.1.2.1 Histologia, classificação e funções

A estrutura do tecido adiposo compreende uma variedade de tipos celulares, incluindo: células mesenquimais, fibroblastos, pré-adipócitos, células precursoras endoteliais, células

musculares lisas, células sanguíneas, pericitos, macrófagos e outras células imunes. Entretanto, os adipócitos maduros são seus principais componentes celulares (3,38,39).

Os adipócitos são circundados por tecido conjuntivo fibroso (estroma), que possui fibras colágenas e reticulares, formando estruturas de suporte e ligação, que fornecem sustentação mecânica ao próprio tecido adiposo e para outros órgãos. Além disso, o tecido adiposo é inervado pelo sistema nervoso simpático e altamente vascularizado por vasos sanguíneos e linfáticos (40).

Existem três tipos de tecido adiposo descritos em mamíferos, com propriedades funcionais bem distintas: o unilocular branco, o multilocular marrom e o tecido adiposo bege. Todos estão envolvidos na regulação do balanço energético, porém, enquanto o tecido adiposo branco tem como principal função armazenar energia na forma de triglicerídeos, os tecidos adiposos marrom e bege são especializados na dissipação de energia através da produção de calor durante a termogênese induzida pelo frio (41). As principais diferenças morfológicas entre as classes de adipócitos podem ser facilmente observadas via microscopia óptica ou eletrônica (38).

O tecido adiposo branco é responsável pela maioria dos depósitos de gordura presentes em humanos adultos, podendo apresentar localização subcutânea (formando o panículo adiposo na hipoderme), visceral, retroperitoneal, omental, pericárdica e retro-orbitária. É um órgão crítico para a homeostase energética, além de apresentar importante ação autócrina, Parácrina e endócrina, atuando em diversos processos fisiológicos, patológicos e desempenhando múltiplas funções, tais como: controle do metabolismo da glicose e apetite, respostas imunológicas e inflamatórias, angiogênese, regulação da pressão arterial, função reprodutiva, reparo tecidual, proteção (térmica e mecânica) e sustentação de órgãos, como os rins (39,42). Em adultos, os adipócitos contendo gordura correspondem à maior parte do volume do tecido adiposo branco (38,39,43).

O tecido adiposo marrom é abundante em pequenos mamíferos, sendo conhecido como “glândula hibernante”, e é um importante reservatório de gordura em bebês recém-nascidos (41). Em adultos, é encontrado principalmente nas regiões do pescoço, supraclavicular, para-aórtico, interescapular, paravertebral e suprarrenal (44).

Os adipócitos marrons maduros são células metabolicamente muito ativas e têm essa cor devido a alta concentração de mitocôndrias e citocromo. Possuem gotículas lipídicas multiloculares que não se fundem e seu núcleo é esférico e bem centralizado dentro do citoplasma (38). Suas mitocôndrias expressam uma proteína especializada transportadora de prótons chamada termogenina (UCP1, do inglês *uncoupling protein 1*), que permite a

dissipação de energia sob a forma de calor através do “vazamento” de prótons através da membrana interna da mitocôndria. O tecido adiposo marrom possui função antiobesogênica e antidiabética, e protege a maioria dos mamíferos contra a hipotermia (45).

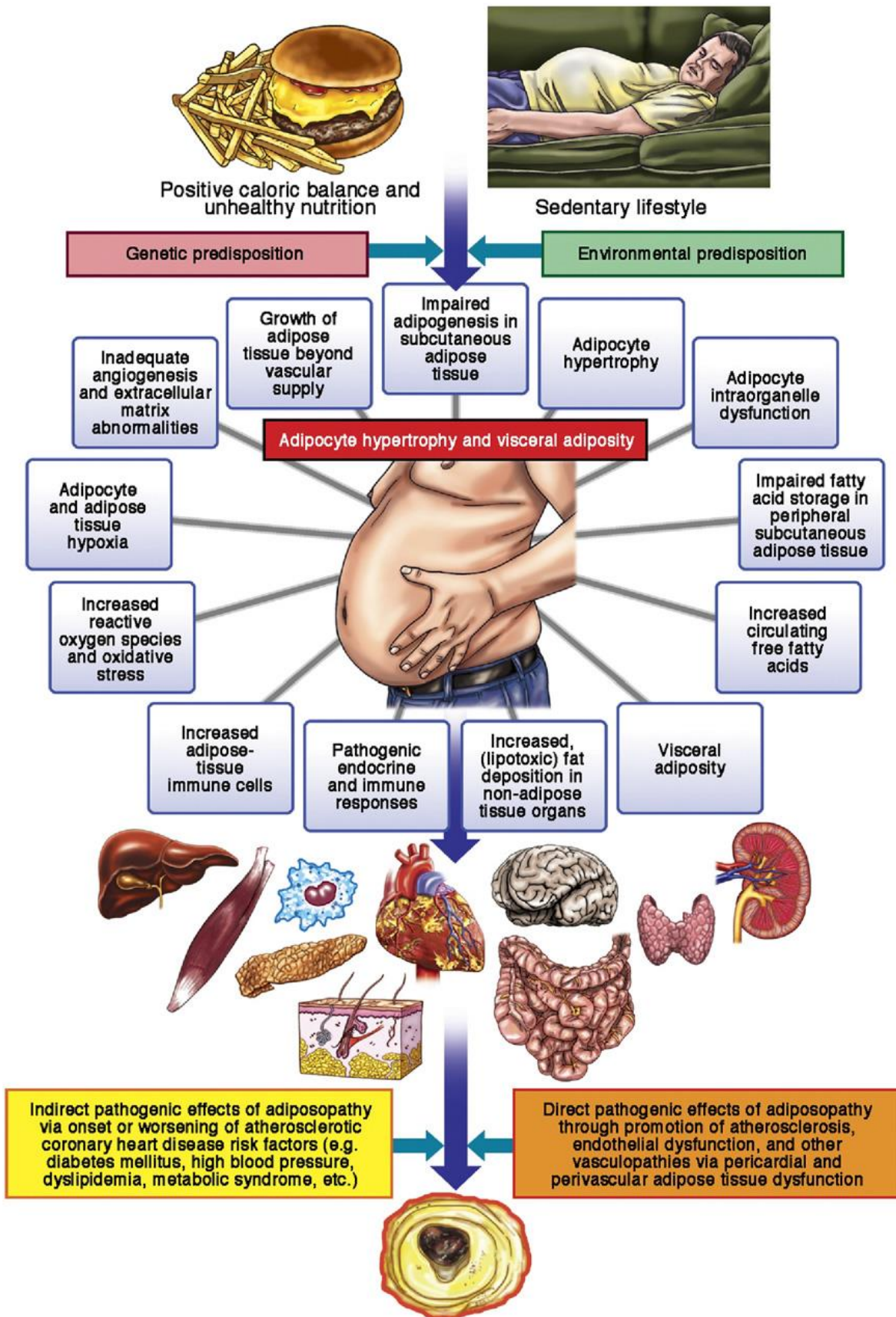
O tecido adiposo bege, por sua vez, é composto por células adiposas que possuem a mesma origem embrionária que os adipócitos brancos mas que, sob estímulos específicos, expressam um fenótipo similar ao dos adipócitos marrons. Por isso, os adipócitos beges possuem uma classificação distinta dos adipócitos brancos e marrons clássicos (44,46). Dentre estes estímulos estão frio extremo, sinalização beta-adrenérgica, exercício físico e irisina, que geram alterações em vias metabólicas que levam ao *browning* (ou escurecimento) do tecido adiposo branco subcutâneo, dando origem às células adiposas beges. O aumento na quantidade destes adipócitos parece melhorar a homeostase metabólica dos animais (45–48).

#### 1.1.2.2 Adiposidade, lipotoxicidade e doenças cardiometabólicas

Hipócrates escreveu: “A corpulência não é apenas uma doença em si, mas o prenúncio de outras”, reconhecendo que a obesidade é um distúrbio médico que também resulta em muitas comorbidades (29). Em decorrência do excesso de tecido adiposo branco, ocorre um aumento da incidência de diversas doenças, tais como: diabetes mellitus do tipo 2, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, fenômenos trombóticos, câncer e doença de Alzheimer (12,49,50).

A adiposopatia (do inglês, *adiposopathy*) é definida como um conjunto de distúrbios anatômicos e funcionais do tecido adiposo patológico, ou seja, que sofreu um aumento exacerbado para armazenar um consumo excessivo de calorias, que ocorre em indivíduos geneticamente e ambientalmente suscetíveis, sendo eles classificados com sobrepeso ou obesidade (3). Tais distúrbios resultam em respostas endócrinas e imunológicas adversas, causando ou agravando doenças metabólicas, e podem promover direta ou indiretamente doenças cardiovasculares (Figura 4) (43).

Figura 4 – Adiposopatia: causas, respostas fisiológicas e consequências patológicas



Fonte: Craig Skaggs (3).

No tecido adiposo branco, durante o balanço calórico positivo, ou seja, quando a ingestão de calorias excede o gasto de energia, a maior parte deste excesso é armazenada sob a forma de triglicerídeos nos adipócitos. As células do tecido adiposo apresentam uma variação natural no seu tamanho, refletindo principalmente a quantidade de triglicerídeos armazenados (51).

A formação de células de gordura é um processo de desenvolvimento dinâmico, com o número de adipócitos dependendo do equilíbrio entre a formação de novos adipócitos (adipogênese) e a apoptose, sendo que aproximadamente 10% das células de gordura são renovadas anualmente em adultos de todas as idades, independentemente do índice de massa corporal (3,39,43,52).

No início do balanço energético positivo, um aumento no número de células do tecido adiposo subcutâneo costuma predominar e este se desenvolve no chamado fenótipo hiperplásico, caracterizado por muitas células gordurosas pequenas. Por outro lado, conforme a ingesta energética excessiva se torna crônica, ocorre também um aumento no tamanho dos adipócitos e desenvolve-se um quadro de hipertrofia adiposa, caracterizado pela presença de grandes células de gordura (43,53,54). Logo, a obesidade leve ou inicial, que acomete principalmente o tecido subcutâneo, recebe o nome de obesidade hiperplásica, visto que reflete um estímulo da adipogênese e a presença de muitas células adiposas novas. Por outro lado, a obesidade mais severa ou visceral, apresenta também um aumento no tamanho dos adipócitos, denominada obesidade hipertrófica (51).

Sendo assim, a importância clínica da adiposidade não está baseada apenas na forma como a gordura é armazenada (isto é, proliferação vs. tamanho dos adipócitos), mas também onde essa gordura será armazenada no corpo do indivíduo, o que está diretamente relacionado às funções desempenhadas pelo tecido adiposo (3).

A visão tradicional do tecido adiposo como reservatório passivo para armazenamento de energia não é mais válida (1,55). Embora sua principal função seja, de fato, controlar o equilíbrio energético por meio do armazenamento e mobilização do triacilglicerol, o tecido adiposo também atua mediando processos fisiológicos e patológicos através da síntese e secreção de uma variedade de hormônios e peptídeos bioativos (adipocinas), que atuam tanto localmente (efeitos autócrino e parácrino) quanto sistemicamente (efeito endócrino) (1,55,56).

Além das adipocinas, tais como  $TNF\alpha$ , IL-6, MCP-1, PAI 1, leptina e adiponectina, o tecido adiposo expressa numerosos receptores que lhe permitem responder aos sinais que recebe de órgãos endócrinos e do sistema nervoso central (SNC). Portanto, através desta rede interativa, o tecido adiposo está integralmente envolvido na coordenação de diversos

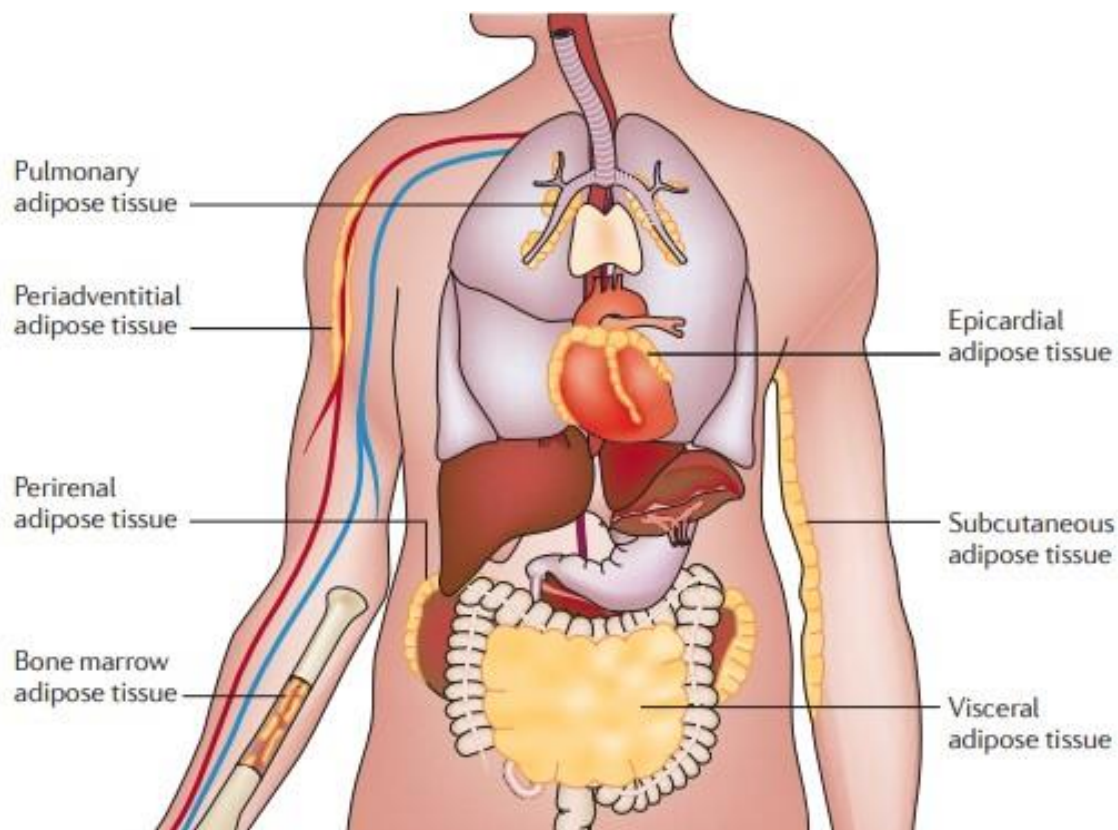
processos biológicos, desempenhando importantes funções na regulação do metabolismo energético corporal (controle do metabolismo da glicose e apetite), assim como nas respostas imunológicas e inflamatórias, angiogênese, regulação da pressão arterial e função reprodutiva (1,56).

A função neuroimunoendócrina do tecido adiposo se torna evidente pelas consequências metabólicas adversas do seu excesso e de sua deficiência, e a expressão de adipocinas também pode variar dependendo do local de depósito do tecido adiposo. A adiposidade, particularmente no compartimento visceral, que resulta em sobrepeso ou obesidade, leva ao desenvolvimento simultâneo de alterações funcionais que, coletivamente, compõem a chamada síndrome metabólica, sendo elas: resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial e um estado pró-trombótico/ pró-inflamatório, sendo todas fatores de risco para as doenças cardiovasculares (1,10,56,57).

O tecido adiposo visceral é geralmente mais metabolicamente ativo que o tecido adiposo subcutâneo, e esses dois depósitos de gordura diferem em relação a processos envolvendo lipólise e lipogênese, expressão de receptores nos adipócitos e na secreção de adipocinas, enzimas, hormônios, moléculas imunes, proteínas e outros fatores (3,58).

Além do tecido adiposo visceral, outros depósitos de gordura apresentam potencial patogênico, tais como pericárdico, abdominal subcutâneo, perimuscular e perivascular, apresentando atividades lipolítica e inflamatória. As adiposopatias pericárdicas e perivasculares merecem destaque especial, visto que podem ter efeitos patogênicos diretos no miocárdio, artérias coronárias e vasos periféricos, por meio da secreção local desregulada de fatores vasoativos e inflamatórios, que podem contribuir para o surgimento ou agravamento de fisiopatologias cardiovasculares (Figura 5) (3,59–63).

Figura 5 – Principais depósitos de tecido adiposo branco em pacientes obesos ou com sobrepesos: visceral, subcutâneo, epicárdico, medula óssea, perirrenal, periadventicial e pulmonar



Fonte: Ouchi et al (4).

Com o acúmulo do tecido adiposo, ocorre um desequilíbrio na produção e secreção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, resultando em um quadro de inflamação local e sistêmica, diretamente ligado ao desenvolvimento de alterações metabólicas e também da aterosclerose (1,10).

A aterosclerose é uma doença vascular crônica, subclínica e progressiva, que se inicia na infância, e se caracteriza pela inflamação crônica da túnica íntima das artérias, a camada mais interna que está em contato direto com o sangue. O quadro se inicia com penetração, depósito e oxidação de lipoproteínas na parede arterial (especialmente moléculas de LDL colesterol), que estimulam a migração e ativação de macrófagos, que fagocitam tais partículas gordurosas, resultando na formação de células espumosas (ou *foam cells*). A doença evolui com a formação da placa de ateroma, pelo acúmulo de cálcio e outros elementos, como fibras colágenas e células musculares lisas, que formam uma capa fibrosa que estreita e enrijece as

artérias, restringindo o fluxo sanguíneo local (64–66). Quando ocorre a ruptura da placa aterosclerótica, novamente há o envolvimento de macrófagos e citocinas, que estimulam a liberação de enzimas proteolíticas, tendo como consequências vasoconstrição, trombose e disfunção microvascular (66–68).

Durante a obesidade, o tecido adiposo é infiltrado por um grande número de macrófagos do subtipo M1 (ou pró-inflamatórios), sendo esse recrutamento ligado à inflamação sistêmica e resistência à insulina. Além disso, o acúmulo de macrófagos M1 no tecido adiposo é proporcional à adiposidade em humanos e camundongos, e a perda de peso sustentada resulta em uma redução no número deles, acompanhada por uma diminuição no perfil pró-inflamatório (4,69–71).

Dessa forma, a adiposidade e a consequente disfunção celular e orgânica do tecido adiposo desencadeiam respostas endócrinas e imunes (pró-inflamatórias) com efeitos patogênicos diretos sobre o sistema cardiovascular, tais como aterosclerose e disfunção microvascular.

## **1.2 Microcirculação e disfunção microvascular na obesidade e sobrepeso**

### **1.2.1 Microcirculação - estrutura e função**

O fluxo sanguíneo através dos microvasos, cujo diâmetro é da ordem de 100  $\mu\text{m}$  ou menos, é chamado de microcirculação. Do ponto de vista anatômico, a microcirculação envolve os menores vasos sanguíneos do corpo – arteríolas, capilares e vênulas (14,15,17,72).

As arteríolas (5 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro) têm camada de músculo liso relativamente espessa, camada adventícia delgada e revestimento endotelial. Das arteríolas se originam diretamente os capilares (5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro) ou, em alguns tecidos, as metarteríolas (10 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro) que, então, dão origem aos capilares. Dependendo do leito microvascular, podem ocorrer desvios arterio-venosos em que as metarteríolas se conectam diretamente às vênulas. As arteríolas pré-capilares distribuem sangue diretamente para capilares e regulam o fluxo por vasoconstrição ou vasodilatação (14,15,17,72).

Os capilares possuem paredes constituídas por uma camada única de células endoteliais e uma membrana basal externa, e apresentam interconexões que formam uma rede

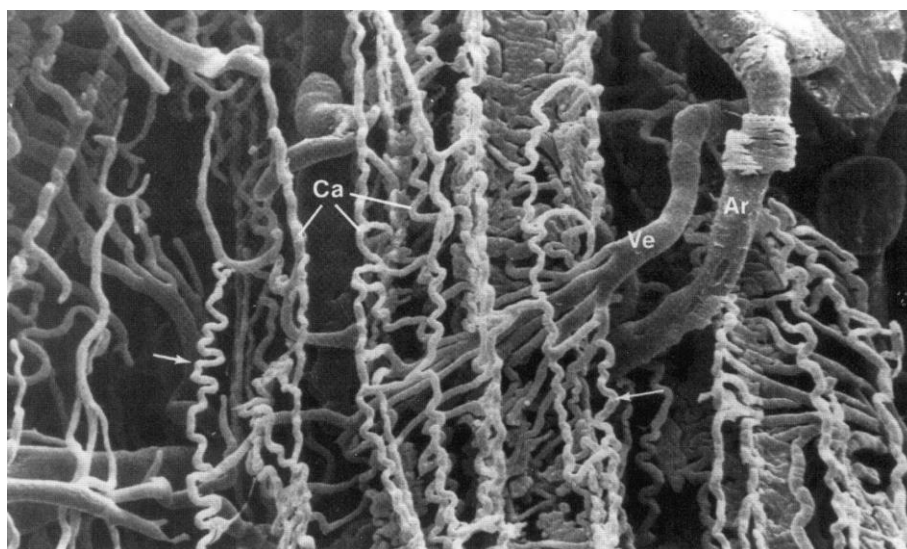


de microvasos nos tecidos, com comprimento médio de 0,5 a 1 mm (14,15,17,72). Dos capilares emergem vasos maiores que também são desprovidos de uma camada muscular lisa - as vênulas pós-capilares - que representam o segmento da microvasculatura que é mais reativo à inflamação (72,73).

As vênulas contêm junções endoteliais intercelulares (junções aderentes) que podem sofrer modificações e assim permitir que as proteínas plasmáticas e as células imunes (leucócitos) migrem da corrente sanguínea para os tecidos. Portanto, as vênulas representam o principal local de permeabilidade vascular às proteínas plasmáticas e de movimentação de leucócitos, ou seja, de interação leucócito-endotélio. As vênulas maiores, que coletam o sangue das vênulas pós-capilares, possuem músculo liso, embora esse seja menos abundante que nas arteríolas (72,73).

Atualmente, uma definição alternativa baseada na fisiologia dos vasos arteriais, e não no diâmetro ou estrutura, foi proposta. Nesta definição, todos os vasos arteriais que respondem ao aumento da pressão interna com constrição (reação miogênica) seriam considerados parte da microcirculação, incluindo assim as menores artérias e arteríolas, além de capilares e vênulas (14,74,75).

Figura 6 - Imagem por microscopia eletrônica da microcirculação do músculo esquelético, onde os capilares (Ca) são orientados na mesma direção das fibras musculares e esta rede é suprida por uma arteríola (Ar) e drenada por uma vênula (Ve)



Fonte: Kessel e Karden (73,76).

Considerando que a função do sistema cardiovascular é fornecer um meio apropriado para a manutenção de tecidos e órgãos, a microcirculação é a porção deste sistema onde as trocas entre o sangue e os tecidos efetivamente ocorrem. A principal função do sistema vascular ocorre na microcirculação, que realiza a entrega de oxigênio e nutrientes para os tecidos adjacentes e a remoção de excretas celulares, em resposta às variações de demanda metabólica (15,72). Além disso, a microcirculação atua no equilíbrio hidrostático e desempenha a principal resistência ao fluxo sanguíneo, evitando grandes flutuações de pressão nos capilares e controlando a resistência vascular periférica total, uma vez que as artérias e veias de grande e médio calibre oferecem pouca resistência ao fluxo (14,15,74). Portanto, a mecânica do fluxo sanguíneo na microcirculação controla a distribuição de sangue para os tecidos e influencia amplamente a troca de metabólitos no sistema vascular (17,72).

A partir das arteríolas, o sangue flui para os capilares, onde ocorre a nutrição tecidual e a remoção de metabólitos e, em seguida, ele flui para as vênulas pós-capilares, vênulas e veias (na maioria dos órgãos), alcançando a macrocirculação e o coração (72).

### 1.2.2 Papel vasoativo do endotélio e o óxido nítrico

O endotélio é uma camada única e contínua de células que separa o sangue das estruturas vizinhas e regula a função vascular (77). O endotélio foi reconhecido há relativamente pouco tempo como um órgão fisiologicamente relevante, com significativa importância clínica, apesar desta camada de células ter sido identificada pela primeira vez há mais de um século (78).

A célula endotelial era vista como uma estrutura tão fina que poucos detalhes poderiam ser revelados em seu citoplasma. Entretanto, nos anos 1950 e 1960, o uso da microscopia eletrônica forneceu um novo olhar bem mais detalhado sobre o endotélio e estudos iniciais revelaram a presença de organelas nestas células (78,79).

Atualmente, sabe-se que as células endoteliais são nucleadas, longas e achatadas, orientadas no comprimento do vaso, medindo cerca de 20-40 $\mu$ m de comprimento por 10-15 $\mu$ m de largura e apenas 0,1-0,5  $\mu$ m de espessura (67,79).

Avaliações do endotélio arterial por microscopia eletrônica revelaram que as células são do tipo contínuas, caracterizadas por junções bem justas ou próximas nas bordas laterais de cada célula, que restringem o movimento de macromoléculas. A atuação do endotélio

como uma barreira semipermeável é uma de suas funções mais básicas, regulando o transporte de macromoléculas entre o lúmen vascular e a musculatura lisa vascular (67).

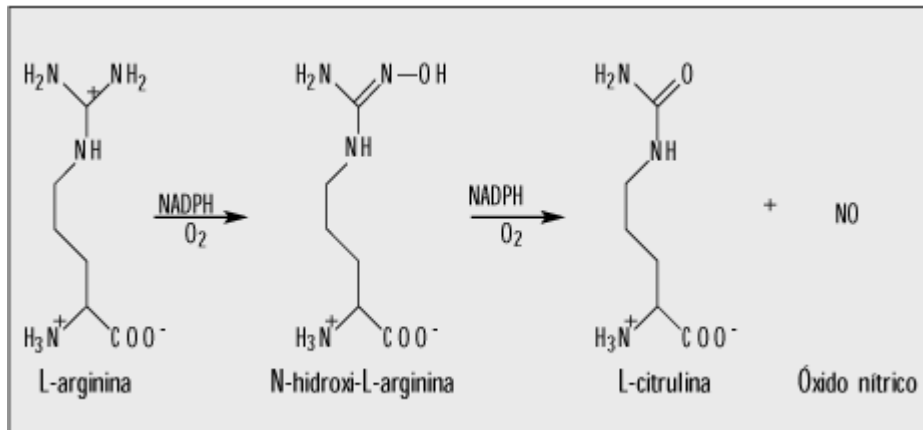
Originalmente tido como uma simples barreira passiva semi-permeável, capaz de permitir a passagem de água e de pequenas moléculas através da parede do vaso sanguíneo, e de reter as células do sangue e moléculas grandes (proteínas) no compartimento vascular, o endotélio hoje é visto como um órgão cujo funcionamento normal é crucial para manter a saúde vascular (67,77). O endotélio responde a estímulos humoral, neural e, especialmente, hemodinâmico, e regula a função plaquetária, respostas inflamatórias, crescimento e migração de células musculares lisas vasculares, além de modular o tônus vascular através da síntese e liberação de substâncias vasoativas (67,77,80).

Nesse sentido, merece destaque o óxido nítrico (NO). Em 1980, Furchgott e Zawadzki propuseram pela primeira vez que as células endoteliais produziam e liberavam um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) que regulava diretamente o tônus vascular. Nos anos seguintes, o EDRF foi identificado em vários vasos de diferentes espécies, e teve sua via intracelular caracterizada. Em 1987, dois grupos descreveram a identidade do EDRF como sendo o óxido nítrico (81–83).

Sabe-se, atualmente, que o NO é uma potente molécula vasodilatadora, conhecida por sua importante função na regulação do tônus vascular através da dilatação mediada pelo endotélio - o NO liberado pelas células endoteliais ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) que sintetiza monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o qual ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que diminui a concentração de cálcio intracelular e provoca o relaxamento da musculatura lisa do vaso - tanto em condições de repouso quanto em situações que demandam aumento do fluxo sanguíneo, como durante o exercício físico, por exemplo (67,84–86). Na microcirculação, além da vasodilatação, há consenso entre os pesquisadores de que na maioria dos órgãos e sistemas, se não em todos, o NO previne a adesão de plaquetas e neutrófilos ao endotélio (81).

O NO é produzido no processo de conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pelas óxido nítrico sintases (NOS – *nitric oxide synthases*) (Figura 7) (87–89).

Figura 7 - Síntese de óxido nítrico (NO) pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS): inicialmente ocorre a hidroxilação da L-arginina, gerando N-hidroxi-L-arginina (NHA) e, numa segunda etapa, ocorre a conversão de NHA em NO e citrulina



Fonte: Dusse *et al.* (90).

As enzimas NOS podem ser classificadas em três isoformas: duas constitutivas e dependentes de cálcio - neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS); e uma induzível (iNOS). No coração, a nNOS tem sido encontrada no retículo sarcoplasmático e nas fibras vasodilatadoras autonômicas não-adrenérgicas, enquanto a eNOS está presente nas células endoteliais, tanto da vasculatura coronariana e como do endocárdio, e nos cardiomiócitos. A forma induzível iNOS também pode ser encontrada nos cardiomiócitos (ventriculares) e nas células endoteliais, e ainda em fibroblastos e no músculo liso vascular (91,92).

A ativação das enzimas NOS constitutivas é Ca<sup>2+</sup>-calmodulina dependente, ou seja, dependem de um aumento do cálcio intracelular; enquanto a expressão da forma iNOS é induzida pelo fator nuclear kappa-B (NF-kB), lipopolissacarídeo, citocinas e outros agentes relacionados à resposta inflamatória. As formas constitutivas possuem uma relação antagônica com a forma induzível: em condições normais, o aumento na biodisponibilidade de NO, produzido pela nNOS e eNOS, regula negativamente a expressão da iNOS, através da inibição do NF-kB; por outro lado, geralmente em condições patológicas, relacionadas à inibição das formas constitutivas ou na falta de NO disponível, ocorre uma grande produção de NO pela iNOS (91,92).

### 1.2.3 Permeabilidade microvascular

Visto que o sistema vascular de organismos superiores é frequentemente descrito como "fechado", ele precisa ser suficientemente "aberto", ou seja, permeável, para permitir a troca rápida de pequenas moléculas (tais como gases, nutrientes e resíduos) com os tecidos (93). A troca microvascular ocorre, em grande parte, de forma passiva e, portanto, os coeficientes de permeabilidade relacionam os fluxos de fluido e soluto com as diferenças de pressão e concentração que os conduzem através das paredes microvasculares (94).

Existem vários mecanismos pelos quais as macromoléculas atravessam a barreira endotelial e, dentre eles, podemos destacar: 1) através das próprias células endoteliais, difundindo-se lateralmente dentro da membrana celular endotelial e, assim, ao redor da célula; 2) através de junções célula-célula endotelial, que envolvem *gaps* ou “espaços” endoteliais; ou ainda 3) via transporte vesicular. Visto que a maioria das moléculas biológicas são moléculas grandes, hidrofílicas e aniônicas, que são incapazes de se difundir através da bicamada da membrana celular, acredita-se que a maioria delas se desloquem através de junções intercelulares (ou seja, entre as células), pelo transporte vesicular ou através da formação de canais transitórios, resultantes da fusão de vesículas (67,95).

Em condições normais, as proteínas plasmáticas também precisam atravessar a barreira vascular, pelo menos em pequenas quantidades, e as células endoteliais possuem um sistema complexo de microvesículas envolvido no transporte macromolecular. Dentre as proteínas plasmáticas, merece destaque a albumina, responsável por transportar ácidos graxos e vitaminas, e os anticorpos (imunoglobulinas), necessários para a resposta imunológica do hospedeiro (67,93). Por outro lado, a reorganização das junções intercelulares - envolvendo actina e miosina ou ainda a dissolução direta de contatos juncionais - parece ser o principal mecanismo através do qual ocorre o aumento da permeabilidade endotelial à água e aos solutos (pequenos ou grandes) (67,94,96).

A permeabilidade vascular está aumentada na inflamação aguda e crônica, no câncer e durante a cicatrização de feridas (93). O aumento na permeabilidade microvascular na inflamação foi descrito pela primeira vez a partir de evidências baseadas no “vazamento” para os tecidos de proteínas plasmáticas marcadas com corantes (97–99). Logo, em outras palavras, o termo ‘extravasamento de plasma’ (do inglês *plasma leakage*) se refere ao processo no qual o componente líquido do sangue, rico em proteínas, passa de dentro dos vasos sanguíneos para o tecido ao redor (93).

A sinalização envolvida na mediação dessas respostas inclui a fosforilação das proteínas de ligação presentes nestas junções, sendo induzida pela ação da proteína-quinase C (PKC), que leva à reorganização da actina, ao arredondamento das células e aumento do transporte paracelular. A cinase de cadeia leve da miosina (MLCK) também pode ser ativada por mediadores inflamatórios e resultar em retração das células endoteliais. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um regulador chave da permeabilidade vascular via regulação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), através de múltiplos mecanismos incluindo, por exemplo, a formação de gaps (100–104).

Dentre outros fatores que também podem influenciar a permeabilidade e função microvascular, merecem destaque o *shear stress* - ou tensão de cisalhamento do fluido - e o glicocálix endotelial, que atua como um importante coadjuvante na manutenção da integridade da parede vascular (67,105). O *shear stress* é a força de fricção tangencial exercida pelo fluxo de sangue, ou seja, o atrito do sangue contra as paredes dos vasos, que atua predominantemente na superfície da célula endotelial. Estudos sobre a relação entre a permeabilidade à albumina e a magnitude da tensão de cisalhamento *in vivo* revelaram que o endotélio exposto a baixo *shear stress* tem maior probabilidade de ter elevada permeabilidade macromolecular (67). Já o glicocálix é definido como uma camada organizada de glicoproteínas, proteoglicanas negativamente carregadas e proteínas plasmáticas associadas, que apresenta efeitos protetores, tais como: 1) fortalecer a função de barreira do endotélio; 2) inibir a coagulação e a adesão de leucócitos; e 3) mediar a liberação de NO induzida por *shear stress* (67,105–108). Portanto, a deterioração ou destruição do glicocálix está associada a alterações patológicas, incluindo aumento da permeabilidade endotelial, agregação plaquetária e perda da responsividade vascular (67).

#### 1.2.3.1 Métodos para avaliação da microcirculação e a preparação da bolsa da bochecha

A microcirculação pode ser estudada em humanos por videocapilaroscopia intravital direta em áreas como a pele e leito periungueal, videomicroscopia da pele ou mucosa oral, ou avaliada por medidas de fluxo feitas com laser Doppler. Em estudos com animais, essas técnicas podem ser usadas em diferentes leitos microvasculares, como músculo esquelético, bolsa da bochecha do hamster ou mesentério (15). A permeabilidade microvascular pode ser analisada a partir de medições em diferentes preparações experimentais: *in vivo*, ou seja, em

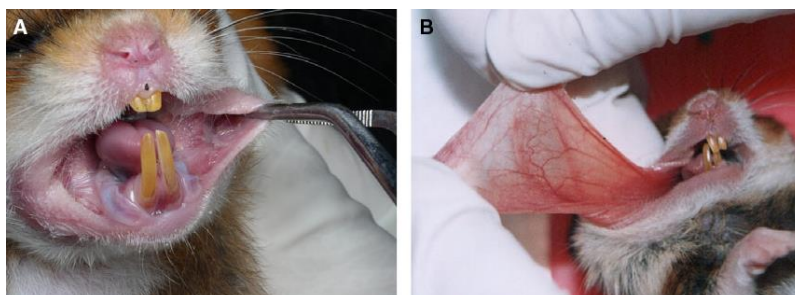
organismos intactos e inteiros (incluindo seres humanos), em tecidos ou órgãos específicos, em microvasos isolados, e em monocamadas de culturas de células endoteliais microvasculares, com cada uma delas apresentando suas vantagens e desvantagens (94).

Em modelo animal, as alterações na permeabilidade vascular podem ser observadas por microscopia intravital, que permite avaliar essa variável *in vivo*. No nosso projeto, escolhemos como modelo experimental a bolsa da bochecha do hamster para analisar a permeabilidade desta microvasculatura em resposta ao estímulo conhecido como lesão por isquemia-reperfusão (I/R), que será explicado posteriormente.

A bolsa da bochecha do hamster foi descrita como modelo para observação da microcirculação no final da década de 1940 e início de 1950 por Fulton, Lutz e Jackson. Desde então, a técnica para uso desta preparação tem sido aprimorada, com este tecido sendo utilizado em uma ampla variedade de estudos experimentais envolvendo a fisiopatologia da microcirculação e a resposta microvascular a diferentes estímulos (97,109–112).

Descrevendo anatomicamente, as bolsas da bochecha do hamster são sacos epiteliais bilaterais ou “invaginações” de tecido cutâneo (compostos por tecido conjuntivo fibroso denso, epitélio escamoso estratificado e tecido conjuntivo frouxo), que se estendem dorso caudalmente do canto da boca do animal até aproximadamente a região do seu ombro, apresentando entre 4 a 5 cm de comprimento e espessura média de 0,4 mm (Figura 8). As bolsas da bochecha são usadas pelos hamsters para guardar alimentos ou resíduos e, portanto, podem apresentar volume e posição variáveis, visto que são controlados por fibras musculares esqueléticas que circundam suas porções proximais e por um fino músculo retrator. A inervação é derivada dos nervos faciais e acessórios espinais (109,113).

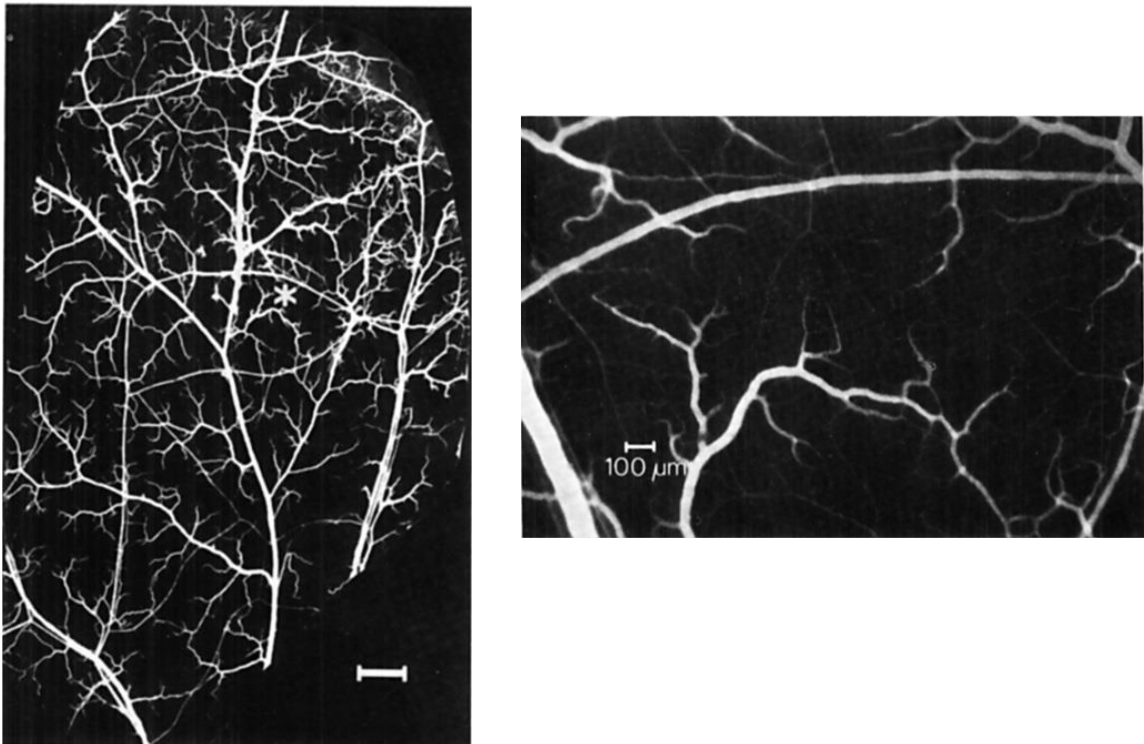
Figura 8 - Fotos mostrando a localização anatômica (A) e o tecido vascularizado em forma de saco (B) da bolsa da bochecha do hamster



Fonte: Monti-Hughes *et al.* (114).

Do ponto de vista microcirculatório, o suprimento de sangue se origina principalmente de ramos da artéria carótida externa, e quatro artérias fornecem a maior parte do suprimento sanguíneo, enquanto que o músculo retrator é suprido independentemente por um quinto vaso, que se origina como um ramo da carótida comum. À medida que as pequenas artérias saculares (inferior e superior) se aproximam da ponta da bolsa da bochecha, elas terminam em várias arteríolas de primeira ordem, com diâmetros de  $50\ \mu\text{m}$ , que são interconectadas por vasos menores com tamanhos distintos - as arteríolas de segunda e terceira ordem com aproximadamente  $30\ \mu\text{m}$  e  $13\ \mu\text{m}$  de diâmetro, respectivamente. Estas últimas se ramificam e terminam em capilares, cujos diâmetros podem variar de cerca de  $6$  a  $7,3\ \mu\text{m}$ . Os capilares são drenados por vênulas de 5ª e 4ª ordens, que se unem para formar vênulas maiores. A arquitetura da microcirculação venosa na “ponta” da bolsa da bochecha é paralela à da microcirculação arterial (Figura 9) (109,113,115).

Figura 9 – Imagens da microcirculação da bolsa da bochecha do hamster (A) feita através de 70 fotografias montadas e reproduzidas em escala reduzida; a proporção de  $1\ \text{mm}$  é indicada na figura; e detalhe da microcirculação observada na figura A, com ampliação de  $35\times$  (B); a proporção de  $100\ \mu\text{m}$  é indicada na figura



Fonte: Svensjö (97).



Em um estudo clássico de microscopia eletrônica de Majno e Palade (1961), foi demonstrado que das vênulas pós-capilares, de 20 a 30  $\mu$ m de diâmetro, vazaram partículas de carbono através de aberturas formadas entre as células endoteliais, como resultado da contração das células endoteliais pela estimulação com histamina, e essas “áreas de passagem” foram também observadas na preparação da bolsa da bochecha do hamster após a estimulação por bradicinina (96,112,116).

#### 1.2.4 Disfunção microvascular e doenças cardiometabólicas

Em condições normais, mecanismos autorregulatórios, sistêmicos e locais, especialmente miogênicos e metabólicos, permitem o funcionamento normal do endotélio e da microcirculação (67). Entretanto, em condições patológicas, como na obesidade e sobrepeso, a perda de tais mecanismos resulta no desenvolvimento de disfunção microvascular, caracterizada por alterações patológicas em todos os segmentos da microcirculação: 1) nas arteríolas - dilatação dependente do endotélio prejudicada; 2) nos capilares - rarefação e obstrução causada pela adesão de leucócitos; e 3) nas vênulas pós-capilares - transmigração de leucócitos e extravasamento de proteínas plasmáticas (14,75).

O endotélio tem emergido como um regulador chave da homeostase vascular e, logo, do bom funcionamento do aparelho cardiovascular, por controlar o tônus vascular, equilibrar a produção de vasodilatadores (principalmente do NO) e vasoconstritores (como a endotelina), e por sua ação direta na fluidez do sangue e da coagulação, através da produção de fatores que modulam a atividade plaquetária, a cascata de coagulação e a fibrinólise (117). Além disso, o NO produzido pelas células endoteliais também regula a interação leucócito-endotélio. Portanto, o endotélio age como um transdutor ativo de sinais das alterações circulatórias que levam à modificação do fenótipo da parede do vaso (80,117).

A disfunção endotelial, definida como a perda da função homeostática normal do endotélio, parcialmente secundária a uma redução da biodisponibilidade do NO, resulta em um defeito na interação endotélio-sangue, atividade vasomotora anormal, desenvolvimento de uma superfície endotelial pró-coagulante, crescimento da camada íntima arterial e inflamação. Em outras palavras, tal disfunção é caracterizada pelo desequilíbrio de qualquer um dos fatores de manutenção da homeostase vascular, como: 1) capacidade de vasodilatação; 2)

resposta ao óxido nítrico, 3) proliferação de células musculares lisas e espumosas; 4) coagulação e fibrinólise; e 5) oxidação de lipoproteínas (80,118).

O termo disfunção endotelial poderia ser apropriadamente substituído por “ativação endotelial”, visto que representa a ativação de vias que resultam na mudança de um fenótipo quiescente para um fenótipo inflamatório nos vasos, que envolve a expressão de citocinas e moléculas de adesão designadas para interagir com leucócitos e plaquetas (67,80).

A maioria, se não todos, os fatores de risco relacionados à aterosclerose, à morbidade e mortalidade cardiovascular, ou associados à síndrome metabólica, como o acúmulo excessivo de tecido adiposo branco (obesidade e sobrepeso), hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes mellitus, também estão associados à disfunção endotelial, visto que levam à ativação da maquinaria molecular do endotélio, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados a tecidos específicos (14,15,119,120).

A inflamação crônica de baixo-grau, relacionada à obesidade, resulta na regulação negativa de adipocinas anti-inflamatórias, como por exemplo IL-10 e adiponectina, e na regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que ativam as células endoteliais e promovem um fenótipo disfuncional. Portanto, podemos dizer que a obesidade favorece um ciclo vicioso pelo qual a disfunção endotelial no tecido adiposo leva à disfunção metabólica, refletida pela desregulação das adipocinas, rarefação microvascular, necrose adipocitária e inflamação; e, por outro lado, a disfunção metabólica promove disfunção das células endoteliais, tanto no tecido adiposo, como na circulação local (tecidial) e sistêmica (4,121,122).

Na obesidade, uma grande variedade de estímulos prejudiciais, por ex: dieta rica em gorduras (ou hiperlipídica) e regulação positiva dos mediadores inflamatórios, podem contribuir para a disfunção endotelial e, conseqüentemente, favorecerem o acúmulo de lipídios nas artérias, no espaço subendotelial, iniciando assim o desenvolvimento da placa aterosclerótica. (67,123).

A obesidade e o sobrepeso fazem parte da chamada síndrome metabólica, geralmente associados aos seguintes fatores: a) uma distribuição central de gordura corporal (tecido adiposo visceral); b) hipertensão; c) hiperglicemia associada à resistência à insulina; d) intolerância à glicose; e) dislipidemia aterogênica; e f) fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos. Em consequência da inflamação e da resistência à insulina, a disfunção endotelial aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e está implicada na patogênese e no curso clínico da maioria destas doenças, com elevada morbidade e mortalidade (75,124).

Portanto, o desenvolvimento e validação de métodos de avaliação não invasivos, assim como os de detecção precoce de complicações, passam a ter um grande valor no combate à epidemia de obesidade e de suas complicações. Atualmente, está claro que a disfunção microvascular afeta a pressão e os padrões de fluxo sanguíneo, e é responsável pelo aumento da resistência vascular periférica. Além disso, problemas microcirculatórios em obesos sugerem que isso poderia ser um fator causal em patologias associadas com o diabetes, como resistência à insulina e hipertensão (10–12,14,16).

### **1.3 Obesidade, sobrepeso e os fatores modificáveis associados ao estilo de vida**

#### **1.3.1. Intervenções não-farmacológicas tradicionais e o jejum intermitente**

##### **1.3.1.1 Dieta convencional ou restrição calórica contínua**

A nutrição é um componente fundamental da nossa vida. A qualidade e a quantidade de alimentos consumidos por cada indivíduo são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção de sua estrutura física geral (125).

O padrão alimentar atual consiste em se alimentar a cada 3 ou 4 horas. Entretanto, nas sociedades modernas, tal padrão resulta em cerca de três refeições e três lanches por dia que, nos últimos 50 anos, tiveram a adição de alimentos com alto teor calórico. Concomitantemente a isto está o aumento do sedentarismo, cenário que contribuiu para o surgimento da obesidade e doenças relacionadas (126,127).

Existem diversos relatos na literatura dos benefícios da dieta convencional de restrição calórica contínua, que é definida como uma redução na ingestão energética com manutenção da nutrição, ou ainda, como uma redução crônica de 20 a 40% na ingestão calórica diária com manutenção da frequência alimentar (18,128). Esta redução pode levar a uma extensão da vida média ou máxima em uma ampla gama de organismos. Em roedores, por exemplo, tanto a restrição calórica moderada (20-40%) quanto a elevada (55-65%) são capazes de gerar tais resultados (129–131).

Os efeitos da restrição calórica contínua no aumento da longevidade são frequentemente acompanhados pela atenuação de doenças relacionadas ao envelhecimento e mortalidade em camundongos, ratos e primatas não humanos - tais como: miocardiopatia relacionada à idade, diabetes, hipertensão e processos neoplásicos (18,19,132–135).

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos efeitos protetores da restrição calórica contínua provavelmente evoluíram a partir de procariotos que, há bilhões de anos atrás, tentavam sobreviver em um ambiente quase que completamente desprovido de fontes de energia, e precisavam evitar danos dependentes da idade, que poderiam comprometer sua sobrevivência (18,136).

Como consequência da menor ingesta energética promovida pela restrição calórica contínua, observa-se a redução do peso (massa corporal total) e a diminuição da adiposidade (percentual de gordura ou massa de tecido adiposo branco). Em humanos, enquanto os riscos de diabetes, hipertensão e dislipidemia aumentam a partir de um IMC em torno de  $21\text{kg/m}^2$ , reduzindo assim a expectativa de vida (29), a perda de peso moderada (menos de 10% da massa corporal total) é capaz de reduzir em 30% a 40% a mortalidade relacionada ao diabetes, com sobrevida de 4 anos para os indivíduos que perderam 10 kg em seu primeiro ano de doença (29,137–139).

A implementação da restrição calórica contínua no cotidiano da população, no entanto, é limitada pela dificuldade dos indivíduos em aderir às dietas convencionais de emagrecimento. Isso ocorre por conta das alterações neurobiológicas que favorecem o ganho de peso, tais como aumentos abruptos nos níveis de dopamina no sistema de recompensa do cérebro desencadeados pela comida, e também porque as dietas exigem um controle contínuo e restritivo da alimentação diária (140).

Os neuropeptídeos que atuam no hipotálamo regulando o balanço energético também modulam a atividade dos neurônios dopaminérgicos e de suas projeções em regiões envolvidas com os mecanismos de recompensa desencadeados pela comida. Assim, o acesso repetido a alimentos altamente palatáveis favorece a associação entre consumo alimentar e prazer, e parece desencadear respostas em alguns indivíduos (humanos e animais experimentais) relacionadas principalmente à ativação de vias dopaminérgicas envolvidas com motivação, condicionamento, auto-controle e reatividade ao stress. Os estímulos tendem a ser tão intensos que podem diminuir a população de receptores dopaminérgicos, resultando em padrões de consumo alimentar cada vez maiores, semelhante ao observado em casos de adicção (dependência) por drogas. Logo, a busca por recompensa supera os processos inibitórios que sinalizam a saciedade, resultando em perda de controle e em um padrão

compulsivo de ingestão de alimentos, caracterizando assim a obesidade como uma doença relacionada, em muitos casos, à adicção alimentar (do inglês “*food addiction*”) (141–144).

Conforme dito anteriormente, além da restrição na quantidade, a qualidade dos alimentos consumidos também desempenha um papel muito importante na manutenção da saúde dos indivíduos. A ingestão de ácidos graxos saturados, por exemplo, induz inflamação no hipotálamo em um processo mediado pelas células da glia, que pode levar a alterações na função neuronal e resultar em distúrbios na resposta à leptina (145–150).

Assim, a obesidade é o resultado de um comportamento inadequado na escolha e na ingestão dos alimentos, combinado com um desequilíbrio entre o consumo e o gasto de calorias (balanço energético positivo). Além da restrição calórica contínua (ou dieta convencional), as intervenções tradicionais de combate à obesidade e ao sobrepeso também se baseiam no aumento da atividade física regular para a correção deste desbalanço energético característicos dos indivíduos com obesidade e sobrepeso.

#### 1.3.1.2 Exercício físico aeróbico crônico

O exercício físico é qualquer movimento corporal de caráter planejado, estruturado e repetitivo produzido pela contração dos músculos esqueléticos e que resulta em gasto de energia. No dia a dia, pode ser categorizado por atividades ocupacionais, esportivas, condicionantes e domésticas, cuja quantidade pode variar consideravelmente entre os indivíduos, assim como em uma mesma pessoa ao longo do tempo (151).

O exercício físico atua especialmente no aumento da capacidade aeróbia, diminuição da massa corporal total (peso) e do percentual de gordura (tecido adiposo branco) em animais e humanos, visto que é capaz de promover adaptações estruturais e funcionais no coração e na rede de vasos sanguíneos, favorecendo: 1) aumento nas dimensões finais de diástole; 2) bradicardia de repouso; 3) utilização de substratos energéticos; e 4) aumento da capacidade antioxidante. Portanto, age na prevenção e tratamento de doenças coronarianas e aterosclerose (152).

Dados da literatura trazem evidências de uma relação direta entre exercício e saúde vascular, como na manutenção da função da barreira endotelial relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo, resultando em aumento da expressão de eNOS e maior liberação de NO e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), potentes vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária

(67,153,154). A longo prazo, o exercício físico promove a diminuição da produção de ROS, evitando danos celulares promovidos pelo estresse oxidativo (67,153,154).

Além disso, indivíduos que permanecem sentados por longos períodos têm reduzida sua exposição contínua ao *shear stress* vascular, o que favorece a disfunção endotelial nos membros inferiores (155,156), enquanto o aumento do número e do calibre dos vasos sanguíneos promovidos pelo exercício, especialmente na microcirculação do músculo esquelético, favorecem uma maior perfusão sanguínea e a difusão de oxigênio para os tecidos. Tais alterações têm sido associadas à hipóxia ou fatores mecânicos, como aumento do fluxo sanguíneo e *shear stress*, que levam a produção de NO e VEGF – este, em especial, causa uma maior permeabilidade vascular, fazendo com que as proteínas plasmáticas, a fibrina e o plasma extravasem, o que aumenta a migração das células endoteliais para o local de formação dos novos capilares (152,157)

O exercício também provoca alterações fisiológicas e bioquímicas na musculatura estriada esquelética, como aumento do número e tamanho das mitocôndrias, com consequente aumento da capacidade respiratória mitocondrial, assim como aumento no calibre e no número de vasos sanguíneos da musculatura esquelética (152,158,159) e melhora no balanço redox que pode, pelo menos em parte, ser atribuído à elevada biodisponibilidade de NO (160,161).

As adaptações bioquímicas induzidas pelo exercício crônico ou contínuo promovem um aumento na capacidade oxidativa muscular, pelo aumento na atividade de enzimas-chave da beta-oxidação, via metabólica específica de oxidação dos ácidos graxos, além de também sinalizar e aumentar a velocidade de outras vias metabólicas oxidativas de ressíntese de ATP, tais como o ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial (162). Desta forma, promovem a prevenção e redução do acúmulo de tecido adiposo branco, modificações benéficas nos componentes da síndrome metabólica e redução da gordura visceral, do colesterol total e dos triglicerídeos sanguíneos (160,163,164).

A prática regular de exercício físico diminui o risco de desenvolver diabetes do tipo 2 e pode reduzir, direta ou indiretamente, o risco de eventos vasculares, uma vez que o músculo esquelético constitui aproximadamente 40% do peso corporal total, sendo responsável por 30% do gasto energético e considerado o mais importante determinante da sensibilidade vascular periférica à insulina, visto que também é um local importante para a captação, armazenamento e liberação de glicose (153,165).

Todas as adaptações supracitadas dependem principalmente das características do exercício adotado, tais como sua intensidade e tempo de duração (152,158). Estudos

observacionais relataram diminuição do número de eventos coronarianos em indivíduos que realizavam exercício físico regular, sendo que até 1 hora de caminhada por semana está associada a menor risco de doença cardíaca coronariana (166–169).

Diversos órgãos de saúde, como o *American College of Sports Medicine*, *American Heart Association*, *American Diabete Association* e a Sociedade Brasileira de Cardiologia, emitiram recomendações para exercício físico aeróbio e treinamento de resistência para adultos saudáveis entre 18 e 65 anos de idade. Estas são importantes estratégias para aumentar o gasto energético, assim como para o tratamento não-farmacológico do sobrepeso e da obesidade e suas comorbidades, com a vantagem de serem bastante acessíveis a várias populações de indivíduos (153,166,170,171).

Apesar de promover efeitos benéficos para a saúde e sua prática regular preservar a massa magra, atenuar expressivamente diversos fatores de risco cardiovascular e evitar o reganho de peso, o exercício isoladamente não é capaz de provocar uma perda de massa corporal (tecido adiposo branco) tão intensa quando comparado à dieta hipocalórica (172).

Vale destacar que, apesar dos efeitos positivos relatados, existe uma preocupação em relação ao risco de eventos cardíacos induzidos pelo próprio exercício, sendo este maior entre pacientes sedentários, que decidam realizar exercícios vigorosos abruptamente, e naqueles com histórico de doença cardiovascular. Porém, os riscos associados ao exercício são superados pelos seus potenciais benéficos, ao menos na maioria dos pacientes, e podem ser reduzidos por uma devida atenção aos sintomas, durante ou após a execução dos treinos, e através de um treinamento onde seja aumentada gradualmente a intensidade da atividade física (166).

### 1.3.2.3 Jejum intermitente ou restrição calórica intermitente

Um dos principais desafios no manejo da obesidade é a perda de peso, que, geralmente, não é sustentada a longo prazo, e a maioria dos pacientes recupera o peso inicial ao longo do tempo. Apesar do controle do balanço energético e da massa corporal serem reconhecidamente benéficos e capazes de melhorar os marcadores cardiometabólicos associados à obesidade e sobrepeso, a dieta convencional e o exercício físico regular tradicionalmente aplicados para perda de peso apresentam baixa adesão. Mesmo quando a redução de massa consegue ser mantida por um tempo prolongado, alguns dos benefícios

alcançados com o exercício físico, como a melhora na sensibilidade à insulina, podem ser atenuados pela não conformidade às recomendações profissionais (29,145,173–177).

Embora a motivação reduzida e a baixa adesão à dieta convencional de restrição calórica contínua estejam envolvidas na recuperação do peso, sabe-se que a perda de peso em si é responsável por diversas adaptações metabólicas que aumentam o risco de insucesso da dieta e favorecem recaídas, tais como: 1) redução no gasto energético total, favorecida por uma redução na taxa metabólica; 2) redução na oxidação de gordura; e 3) aumento no impulso de comer. Vale lembrar que, além do envolvimento das vias dopaminérgicas de recompensa, a perda de peso também gera alterações nos hormônios reguladores do apetite, incluindo aumento nas concentrações dos hormônios orexígenos (ex. grelina) e uma redução dos anorexígenos, como a colecistocinina (CCK) e o peptídeo glucagon símile-1 (GLP-1), cenário que favorece o aumento da fome e diminui a sensação de plenitude (173,176,178–185).

Portanto, novas estratégias sustentáveis e eficazes de restrição de energia são necessárias. Neste âmbito, a restrição calórica intermitente ou restrição intermitente de energia, mais conhecida como jejum intermitente, tem se destacado na literatura como uma estratégia tão efetiva quanto a dieta convencional na perda de peso, redução da gordura corporal (140,186,187), com menor perda de massa magra (173,188,189). O jejum intermitente resulta em perda de massa corporal, acompanhada por redução do tecido adiposo branco (190–192).

O jejum intermitente promove melhora da sensibilidade à insulina através da ativação de vias biológicas similares às alteradas pela dieta convencional (22,23,129), sendo mais eficiente que esta última (126,193).

Em roedores, o jejum intermitente pode prevenir ou melhorar todos os aspectos da síndrome metabólica, através de alterações como: 1) redução da gordura visceral, inflamação e pressão arterial; 2) maior sensibilidade à insulina, mesmo sem uma redução importante no peso corporal; 3) melhora nas capacidades funcionais dos sistemas nervoso, neuromuscular e cardiovascular (18,126,193,194).

O jejum intermitente também atua suprimindo a inflamação em seres humanos e modelos animais de doenças (19,126). O jejum resulta na redução dos níveis de insulina e leptina, e na elevação dos níveis de adiponectina e grelina. Ao aumentar a sensibilidade à insulina e à leptina, o jejum atua suprimindo a inflamação e estimulando a autofagia, e atenua as principais anormalidades associadas a síndrome metabólica em roedores. Em humanos, o jejum intermitente pode provocar alterações na microbiota intestinal, que também protege contra a síndrome metabólica (18,195–197). Mulheres com obesidade que mudaram sua dieta



de múltiplas refeições diárias para a restrição de energia em dias alternados apresentaram reduções significativas nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (126).

Em comparação com condições habituais de alimentação (livre ou *ad libitum*), os animais de laboratório mantidos sob protocolos de jejum intermitente exibem respostas melhoradas ao stress adaptativo - processo no qual a exposição de células e organismos a um estresse leve resulta em respostas adaptativas que protegem contra um estresse mais severo - aos níveis molecular, celular e dos órgãos (19). O jejum em dias alternados previne o estresse oxidativo, em neurônios de modelos animais de doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson, e também pode proteger o coração contra danos isquêmicos em modelo animal de infarto do miocárdio (126). Em ratos, o jejum intermitente parece aumentar a resistência neuronal à lesão, independente de alteração no peso corporal (190,193).

O jejum intermitente pode ser uma alternativa interessante para pacientes que não se adequaram à tradicional restrição calórica contínua visto que o jejum não exige do indivíduo um controle alimentar diário, propondo restrições apenas durante períodos específicos, podendo gerar adaptações positivas durante o estágio de redução de peso por repetidas melhorias rápidas no controle metabólico a cada restrição de energia (18,19,128,198). O jejum intermitente pressupõe alterações na frequência alimentar, com períodos de ingestão calórica muito restrita (ou de jejum absoluto) intercalados à alimentação livre (140,199) sendo, portanto, distinto da dieta convencional, na qual a ingestão calórica diária é reduzida cronicamente em 20 a 40%, mas a frequência das refeições é mantida (18).

Os protocolos atuais de jejum intermitente apresentam muitas variações em relação aos períodos de restrição calórica adotados (número de horas ou de dias), a frequência destes períodos (quantas vezes por semana ou por mês) e a duração total da intervenção (semanas ou meses). Porém, a premissa básica envolve fazer pausas periódicas na ingestão de calorias (190).

Alguns protocolos conhecidos de jejum intermitente incluem: 1) jejum de até 24 horas, uma ou duas vezes por semana, com ingestão livre de alimentos nos dias restantes; 2) a chamada “alimentação com horário restrito”, que compreende comer por apenas 8 horas/dia e, em seguida, jejuar durante as outras 16 horas restantes; 3) “jejum em dias alternados”, onde um “dia de jejum” total ou com ingestão restrita de alimentos (redução de cerca de 25% das necessidades energéticas) é alternado com um “dia de alimentação”, onde o consumo é livre durante 24 horas; e a 4) “Dieta 5:2”, ou jejum prolongado periódico, que consiste em um

período de dois dias consecutivos (48 horas contínuas) de restrição de energia por semana, durante o qual os indivíduos têm um consumo energético muito reduzido (aproximadamente 500/dia calorias para mulheres e 600/dia calorias para homens), que são combinados com 5 dias de alimentação habitual livre. Resumidamente, os dias de jejum podem variar entre 2 a 4 dias por semana, assim como o grau de restrição alimentar nesses dias, de acordo com os protocolos de cada estudo (19,23,140,173).

A capacidade de sobreviver à privação de alimentos é considerada uma adaptação vantajosa primitiva, um componente de resposta homeodinâmica dos sistemas vivos às mudanças ambientais. A capacidade de funcionar em alto nível, tanto física quanto mentalmente, durante períodos de jejum pode ter sido de fundamental importância para nossa evolução ao longo da história e, conseqüentemente, muitas adaptações para um suprimento alimentar intermitente estão conservadas entre os mamíferos, incluindo órgãos para a captação e armazenamento de glicose rapidamente mobilizável (reservas de glicogênio hepático) e substratos energéticos de maior duração, como os ácidos graxos no tecido adiposo (126).

Portanto, quando mudamos de uma alimentação de três refeições completas por dia para um regime de jejum intermitente são observadas diversas mudanças no metabolismo energético, caracterizadas pelo aumento da sensibilidade à insulina e leptina, mobilização de ácidos graxos e elevação dos níveis de corpos cetônicos – em especial o beta-hidroxibutirato ( $\beta$ OHB) – que tem efeitos benéficos nas células com alta demanda de energia, como os neurônios (126,200,201). Logo, podemos dizer que o jejum resulta em cetogênese e por isso promove mudanças nas vias metabólicas e processos celulares relacionados com resistência ao estresse, lipólise e autofagia (18).

Portanto, são necessários mais estudos para elucidar como mecanismos celulares e moleculares envolvidos na manutenção da frequência alimentar, na restrição calórica intermitente e na alimentação com restrição de tempo podem afetar a saúde e a suscetibilidade a doenças.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo central deste trabalho é avaliar os efeitos do jejum intermitente (restrição calórica intermitente) na microcirculação e nos marcadores de risco cardiometabólico de animais (hamsters) submetidos ou não a uma dieta hiperlipídica, e compará-los com os tratamentos não farmacológicos tradicionais contra a obesidade - dieta convencional de restrição calórica contínua e treinamento com exercício físico aeróbico crônico.

### 2.2 Objetivos específicos

Especificamente, no presente estudo avaliamos os seguintes parâmetros:

- a) biométricos: medida final e variação da massa corporal total por pesagem em balança, e avaliação da composição corporal por densitometria com emissão de raios-X de dupla energia (DEXA);
- b) nutricionais: controle da ingesta de ração;
- c) metabólicos: medida da glicemia e avaliação do perfil lipídico em amostras de soro;
- d) microvascular: avaliação da permeabilidade a macromoléculas em resposta à isquemia/reperfusão através de experimentos de microscopia intravital usando a preparação da bolsa da bochecha do hamster;
- e) moleculares: determinação da expressão protéica das enzimas envolvidas na síntese de óxido nítrico (formas constitutiva endotelial – eNOS e induzível - iNOS) nos tecidos do coração e aorta por imunodeteção;
- f) capacidade física: avaliação do condicionamento cardiorespiratório dos animais em resposta ao treinamento com exercício físico aeróbico crônico realizado por corrida em esteira rolante motorizada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo animal e desenho experimental

Os experimentos foram realizados em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*). Todos os animais eram machos e provenientes de colônias de criação da ANILAB (Paulínia, SP, Brasil), chegando ao laboratório logo após o período de desmame (aproximadamente 21 dias após o nascimento), com massa corporal inicial em torno de 60 - 70g.

Durante o período experimental de 20 semanas, os animais foram alojados variando entre 5 a 8 indivíduos por gaiola e mantidos em um ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sob um ciclo diurno/ noturno (12:12h) regulado por temporizador. Os animais tiveram acesso livre à água e comida - com exceção de dois grupos (listados a seguir) que, durante o período de intervenção, realizaram períodos de jejum intermitente, ou seja, sofreram privação total de ração, mas com acesso livre à água.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Protocolo: CEUA/039/2015. Todos os procedimentos invasivos foram realizados sob anestesia com uma mistura de cloridrato de ketamina e xilazina (dose de 17 mg/100g e 0,8mg/100g, respectivamente, de peso corporal do animal) de acordo com o Manual de Manipulação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ e com o Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (Publicação NIH nº 85-23, revisado em 1996).

Um total de cento e oitenta e sete hamsters machos entraram neste estudo. O desenho experimental e os grupos estão descritos abaixo e detalhados na Figura 10. Ao chegarem ao laboratório, no 21º dia após o nascimento, os hamsters foram distribuídos uniformemente em dois grupos principais de acordo com sua massa corporal inicial e foram alimentados com ração padrão ou hiperlipídica por doze semanas (período de engorda). As características nutricionais das rações padrão e hiperlipídica podem ser vistas em detalhes nas Tabelas 1 e 2.

Da décima segunda à vigésima semana (período de intervenção), os animais foram divididos de acordo com o tipo de ração e sua massa corporal em sete grupos experimentais: 1) CT (controle alimentado com ração padrão; n = 20), 2) CTEX (controle alimentado com ração padrão associada a uma rotina de exercícios; n = 16), 3) HL (ração hiperlipídica; n = 17), 4) HLRC (ração hiperlipídica durante a engorda, mas retorno à ração padrão, que

corresponde à dieta convencional ou de restrição calórica contínua, no período de intervenção; n = 17), 5) HLJP (ração hiperlipídica associada a 48 horas de jejum por semana, no padrão de 5 dias de alimentação *ad libitum* e 2 dias consecutivos de jejum por semana -“dieta 5: 2”; n = 17), 6) HLJA (ração hiperlipídica associada a dois períodos de jejum de 24 horas em dias alternados por semana, no padrão de 5 dias de alimentação *ad libitum* e 2 dias de jejum não consecutivos por semana; n = 17), 7) HLEX (ração hiperlipídica associada a um rotina de exercícios; n = 16). Todos os animais tiveram acesso irrestrito à água.

Figura 10 - Desenho experimental e grupos de tratamento

Período de Engorda 1 <sup>a</sup> -----→ 12 <sup>a</sup> (12 semanas)	Período de Intervenção 12 <sup>a</sup> -----→ 20 <sup>a</sup> (8 semanas)	<b>EXPERIMENTOS</b>
CT = Ração padrão	Ração padrão/ Sem intervenção	
CTEX = Ração padrão	Ração padrão + EX	
HL = Ração hiperlipídica	Ração hiperlipídica/ Sem intervenção	
HLRC = Ração hiperlipídica	Ração padrão = RC	
HLJP = Ração hiperlipídica	Ração hiperlipídica + JP	
HLJA = Ração hiperlipídica	Ração hiperlipídica + JA	
HLEX = Ração hiperlipídica	Ração hiperlipídica + EX	

Legenda: EX = exercício aeróbio crônico (1 hora de treinamento por dia, 5 dias por semana); RC = Restrição calórica contínua; JP = Jejum intermitente periódico (48h consecutivas de jejum por semana); JA = Jejum intermitente alternado (24 h de jejum em 2 dias alternados por semana).

A ração hiperlipídica tem como base o farelo da ração padrão (Nuvital, Nuvilab – Colombo, PR, Brasil) com aumento significativo no teor de gordura através da adição de gordura vegetal hidrogenada, previamente derretida, e leite condensado (Tabelas 1 e 2) (202). A composição desta dieta tem como base protocolo previamente publicado, sendo comprovadamente eficaz para gerar ganho significativo de massa corporal nos animais, assim como alterações típicas da obesidade nos resultados de experimentos para avaliação da função microvascular (202).

Tabela 1 - Composição da ração hiperlipídica e da ração padrão

<b>Componentes</b>	<b>Ração Hiperlipídica (%)</b>	<b>Ração padrão (%)</b>
Ração para hamster <sup>1</sup>	60	100
Gordura hidrogenada <sup>2</sup>	25	-
Leite condensado <sup>3</sup>	15	-

<sup>1</sup> Ração para hamster padrão: Nuvital, Nuvilab - Colombo, PR, Brasil;

<sup>2</sup> Gordura hidrogenada: Primor - SC, Brasil;

<sup>3</sup> Leite condensado: Nestlé - SP, Brasil.

Tabela 2. Nutrientes da ração hiperlipídica e da ração padrão.

<b>Nutrientes</b>	<b>Ração Hiperlipídica (%)</b>	<b>Ração padrão (%)</b>
Proteína	15	23
Gordura	30	6
Carboidrato	55	71
<b>Energia (Kcal/g)</b>	<b>5,5</b>	<b>4,28</b>

Um conjunto (n) diferente de animais foi utilizado exclusivamente para avaliação da permeabilidade microvascular, pois o protocolo deste experimento é longo (aproximadamente 3 horas) e requer a aplicação de anestésicos e corante, além de procedimentos cirúrgicos invasivos. Vale ressaltar que foram utilizadas as mesmas condições experimentais e grupos listados anteriormente: CT (n = 11), CTEX (n = 9), HL (n = 7), HLRC (n = 11), HLJP (n = 7), HLJA (n = 10), HLEX (n = 12).

O consumo de ração durante o período de tratamento foi registrado semanalmente para cada gaiola para estimar a ingestão de ração por animal e para cada grupo de tratamento. Para HLJA e HLJP, grupos submetidos a protocolos de jejum intermitente, a ração foi colocada e retirada das gaiolas no mesmo horário todas as vezes, respeitando os intervalos específicos de cada restrição (24 ou 48 horas).

### 3.2 Protocolo de exercício e teste de capacidade física

#### 3.2.1 Teste de Exercício Incremental

Os animais dos grupos CTEX e HFEX foram adaptados durante 4 dias, a velocidade de 5 a 10 m/min por 10 minutos, em esteira rolante motorizada (AVS Projetos, São Carlos, SP). Após esse período, ambos os grupos realizaram um teste de esforço máximo em uma esteira rolante individual (Panlab, Havard Apparatus, Barcelona, Espanha) para avaliar a capacidade física máxima e calcular a carga de trabalho a ser utilizada nas sessões de

exercício. O protocolo de teste adotado foi escalonado, no qual ocorreu incremento de velocidade de 3 m/min, a cada 3 minutos, até a exaustão do animal. O critério adotado para interrupção do teste máximo foi a observação de fadiga no animal, identificada quando este permanecia por mais de 10 segundos na grade de choque (2,0 mA) e não dava continuidade à corrida.

### 3.2.2 Protocolo de treinamento aeróbio

Após o teste máximo, os animais realizaram treinos de corrida em esteira rolante motorizada (AVS Projetos, São Carlos, SP) durante 5 dias por semana, por 60 minutos. A sessão de treinamento consistiu em 5 minutos de aquecimento a uma velocidade de 5 m/min, seguido de corrida contínua a 65-70% da velocidade máxima de teste. Tanto a duração quanto a intensidade do treinamento foram prescritas com base nas diretrizes correntes para programas de emagrecimento e melhora da aptidão física geral (203).

### 3.3 **Glicemia**

Ao final do período experimental, uma gota de sangue foi coletada por punção venosa na pata dos animais e colocada no monitor de glicose (Accu-Chek Active, Roche Diabetes Care Brasil, São Paulo – SP, Brasil ) para quantificar a glicemia.

Não foi possível realizar jejum prévio nos animais por dificuldades metodológicas. Evitamos submeter os animais ao jejum para que estivessem menos estressados possível, para facilitar a manipulação destes durante a medida da glicemia e também prevenir reações adversas durante aplicação de anestesia, realizada em seguida para os experimentos de avaliação da composição corporal.

### 3.4 **Massa corporal total e composição corporal**

A massa corporal total de cada animal foi monitorada semanalmente, durante todo o período experimental, através de pesagem em balança convencional.

Merecem destaque três importantes registros de peso corporal, são eles: 1) PI ou peso inicial, medido logo após a chegada dos animais ao laboratório; 2) PE ou peso de engorda, que corresponde à massa corporal alcançada após 12 semanas de alimentação com ração

padrão ou hiperlipídica; e 3) PF ou peso final, determinado ao final do período experimental, após 8 semanas de intervenção.

Para fins de comparação entre ganho e perda de peso entre os grupos de estudo, foi calculada a razão da massa corporal (razão MC) dos animais dividindo-se o peso final (PF) pelo peso de engorda (PE), segundo a fórmula:

$$PF / PE \quad (1)$$

A composição corporal dos animais foi avaliada ao final do período experimental. O método utilizado para a aferição da composição corporal foi a densitometria com emissão de raios-X de dupla energia – DEXA (Lunar iDXA, G.E. HealthCare®, Madison, WI, EUA) e os exames foram realizados no Laboratório de Avaliação Nutricional, do Instituto de Nutrição da UERJ (LAN-INU, UERJ).

O método DEXA divide o peso corporal em componentes de tecido magro, adiposo e ósseo, sendo considerado referência para avaliação da composição corporal, além de ser preciso e de baixa exposição à radiação.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de ketamina (Venco, Londrina PR, Brasil) e xilazina (Syntec, Santa de Parnaíba SP, Brasil), com a dose mínima necessária para um sono leve (17 mg/ 100g de peso corporal e 0,8 mg/ 100g de peso corporal, respectivamente, ou menos). Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral com a cauda alinhada à coluna vertebral na superfície do equipamento em que foi realizado o scanner. O equipamento foi devidamente calibrado e as equações para estimativa da composição corporal de pequenos animais foram utilizadas pelo software do equipamento, seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.5 Coleta de sangue e tecidos

Um dia após a análise da composição corporal, foram coletadas amostras de sangue e tecido. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia induzida por injeção intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de ketamina (17 mg/ 100g peso corporal) e xilazina (0,8 mg/ 100g peso corporal). A amostra de sangue foi coletada da veia cava inferior e, após 30 min de repouso na bancada, foi centrifugada a 3000 rpm (1620 rcf) por 10 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf modelo 5804R, Hamburg, Alemanha) O soro foi



coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  em ultra-freezer (Thermo Scientific Revco ULT 390-3D, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA para posteriores análises. O coração do animal foi, então, excisado, a aorta torácica dissecada e uma amostra do ventrículo esquerdo foi retirada. Os animais foram sacrificados com exsanguinação e as amostras de tecido foram congeladas com nitrogênio e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6 Perfil lipídico

As determinações de triglicerídeos totais e colesterol total foram realizadas por ensaio enzimático colorimétrico usando kits comerciais Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil) de Colesterol Monoreagente (K083-3) e Triglicerídeos Monoreagentes (K117-3) com sensibilidade de 1.472 mg/dL e 2,58 mg/dL, respectivamente.

Para a realização dos ensaios, as amostras de soro estocadas foram descongeladas sob refrigeração e as amostras lipêmicas foram previamente diluídas com NaCl a 0,9% na proporção de 1:2. Os reagentes do kit e amostras foram homogeneizados em vortex e, em uma placa de 96 poços, com fundo reto e transparente, foi adicionada a solução reagente e soro (em triplicata), ou solução padrão do kit, conforme instruções do fabricante. Após homogeneização, as placas foram incubadas em banho seco à  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação, por 10 minutos. A seguir, foi realizada a leitura a 500 nm (490 a 540 nm) em um leitor universal de microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA) acertando o zero como branco e utilizando o software KC Junior (Bio Tek, Winooski, VT, EUA) para determinação das absorvâncias de cada amostra.

A concentração de lipídeos nas amostras de soro foi calculada de acordo com as fórmulas abaixo, fornecidas pelo fabricante:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times 200}{\text{absorbância do padrão}} \quad (2)$$

$$\text{Triglicerídeos (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times 100}{\text{absorbância do padrão}} \quad (3)$$

### 3.7 Extração de proteínas

Fragmentos de tecido cardíaco e aorta (aproximadamente 0,06g) foram lisados mecanicamente por homogeneização com Potter-Elvehjem em 500  $\mu$ L e 300  $\mu$ L de tampão RIPA, respectivamente [Tris-HCl 1M (pH 7,4); NaCl 1M;  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,5M;  $\text{NaVO}_3$  0,5M; PMSF 200mM; SDS 1%; inibidor de protease (PI 11836170001; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]. Para a aorta, foram feitas etapas adicionais de rotação do homogenato por 30 minutos e pulsos de ultrassom de 30 segundos a 90% da frequência. Para ambos os tecidos foi feita centrifugação a 3000 g, por 10 minutos a 4°C, seguida de homogeneização. A concentração de proteína total foi determinada pelo kit comercial BCA Protein Assay Kit (PIERCE, ThermoScientific, Rockford, IL, EUA).

### 3.8 Imunodeteção para avaliar a expressão protéica tecidual de eNOS e iNOS

Para a imunodeteção, 50  $\mu$ g de proteínas das amostras teciduais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5% SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF e coradas com vermelho de Ponceau para calcular o conteúdo relativo de proteína de cada faixa e essa quantificação foi usada como controle interno (204). O vermelho de Ponceau foi usado como controle interno já que a beta-actina e a tubulina foram moduladas pela dieta hiperlipídica e pelo exercício físico.

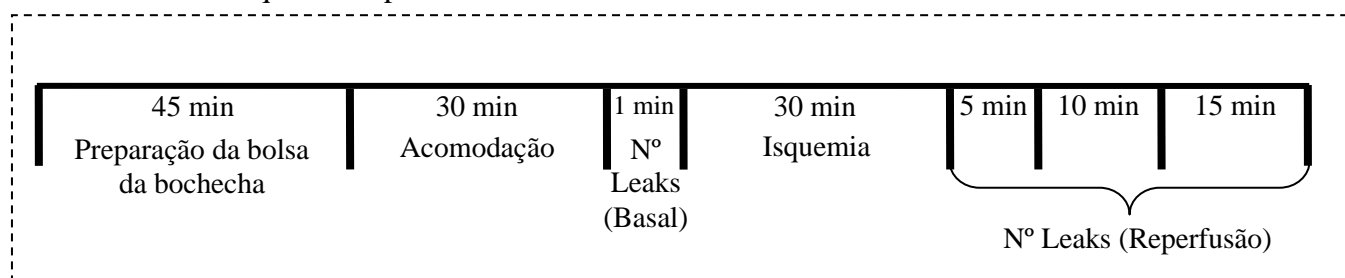
As membranas foram então lavadas, bloqueadas com 5% de leite desnatado e incubadas com anticorpos anti-eNOS monoclonal de camundongo (1:250; 610600, R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, EUA) ou anti-eNOS monoclonal de camundongo (1:1.000; 610297, R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, EUA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após extensas lavagens em TBS-Tween, as membranas de PVDF foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (GE Healthcare-NA931) na concentração 1:10.000 e a revelação feita com o sistema *enhanced chemiluminescence* (ECL). Proteínas imunorreativas foram visualizadas usando o sistema ECL (BIO-RAD, Califórnia, EUA) no sistema de aquisição de imagens ChemiDoc XRS (BIO-RAD, Califórnia, EUA).

### 3.9 Permeabilidade microvascular a macromoléculas

Para avaliar a permeabilidade microvascular a macromoléculas, escolhemos como modelo experimental a bolsa da bochecha do hamster, que compreende uma estrutura distensível e semelhante a um saco, localizada dentro da cavidade bucal.

Segue, abaixo, esquema ilustrativo com as etapas do experimento, que serão detalhadas a seguir.

Figura 11 - Esquema com etapas do experimento de permeabilidade a macromoléculas por isquemia-reperfusão na bolsa da bochecha



#### 3.9.1 Preparação da bolsa da bochecha do hamster

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia conforme descrito anteriormente, e os animais foram mantidos com  $\alpha$ -cloralose (7,5mg/ 100g de peso corporal) (Sigma Chemicals, St. Louis MO, EUA).

A veia femoral direita foi canulada com o uso de um tubo de polietileno (PE 10 com diâmetro 0,28 mm interno/ 0,61 mm externo) para injeção do anestésico de manutenção e do marcador fluorescente FITC-dextrana (0,3mL/ 100g de massa corporal) usado para visualizar os pontos de extravasamento microvasculares (*leaks*).

Para facilitar a respiração, uma traqueostomia foi realizada e um tubo (PE 190) foi inserido para facilitar a respiração espontânea (ar ambiente) e a temperatura corporal do animal foi mantida constante, em torno de 36,5°C, durante todo o experimento com o uso de uma manta aquecedora controlada por um termistor retal (Thermostat System, Uppsala Processdata AB, Suécia).

Os animais foram colocados em um estereomicroscópio (Nikon SMZ-1, Japão) e a bolsa da bochecha foi suavemente evertida e montada em uma câmara experimental (Figura 12, A e B), conforme previamente descrito por Duling (109) e Svensjö et al. (97) e modificado por Persson et al. (205) e por Bouskela e Grampp (206). Resumidamente, a porção distal não muscular da bolsa da bochecha foi fixada com o auxílio de pinos metálicos em um anel de silicone, localizado na borda de uma placa de acrílico, onde uma preparação de camada única foi montada (Figura 12, B). A superfície inferior da bolsa foi dissecada no estereomicroscópio (magnificação de dez a dezesseis vezes) e o tecido conjuntivo frouxo que cobria os microvasos foi removido, com o auxílio de instrumentos cirúrgicos, para permitir a observação da microcirculação (Figura 12, C). A área final da preparação visualizada foi de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>.

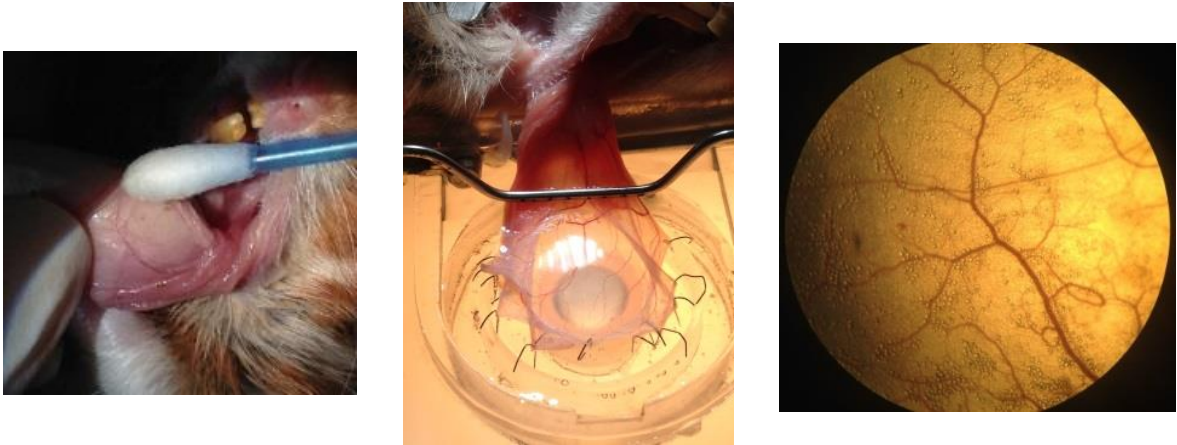
Após os procedimentos cirúrgicos e término da retirada do tecido conjuntivo, o marcador fluorescente FITC-dextrana 150 kDa (TdBConsultancy, Uppsala, Suécia) foi injetado por via endovenosa (25mg/ 100g de peso corporal, solução a 5%). A preparação, então, permaneceu em repouso por 30 minutos (período de acomodação) para a estabilização da microcirculação. Após esse período, foi observada a microcirculação em um microscópio óptico intravital Ortholux II (Leica DMLFS, Wetzlar, Germany, ampliação x600).

Para que a preparação da bolsa da bochecha fosse mantida durante todo o experimento nas condições mais próximas possíveis do seu ambiente fisiológico, ela foi perfundida com uma solução tamponada aquecida e uma mistura de gases borbulhou constantemente, afim de manter a temperatura, o pH e a pressão de oxigênio estáveis e dentro dos valores ideais (Figura 13). Portanto, durante todo o experimento, a bolsa da bochecha permaneceu totalmente submersa em uma solução tampão com HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e HEPES, com fluxo e velocidade de perfusão constantes (4ml/min) através de uma bomba de perfusão (PeristalticPumb P-3, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia).

Composição da solução tamponada: NaCl 110,0 mM; KCl 4,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 18,0 mM; ácido N'-2'-hidroxieltipiperazine-N'-2-etanosulfônico (HEPES) 15,39 mM; e, HEPES 14,61 mM.

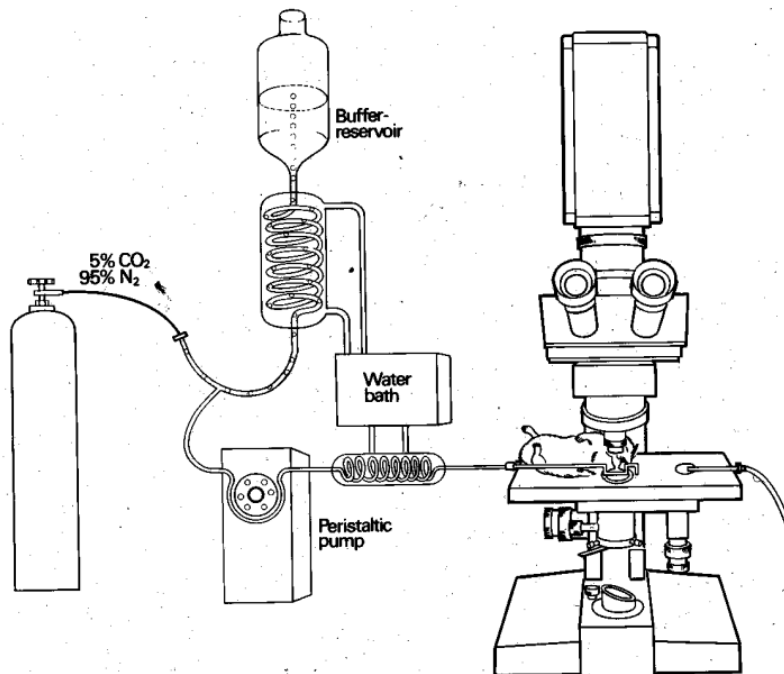
A temperatura foi mantida a 36,5°C através do uso de um banho de aquecimento (WWR Scientific modelo 1130 A, USA). Para manter o pH em 7,4 e a pressão de oxigênio na preparação em torno de 12 a 15 mmHg, foi utilizada uma mistura de 95% de nitrogênio e 5% de CO<sub>2</sub> (White Martins Gases Especiais, Brasil).

Figura 12 - Fotos das etapas de preparação da bolsa da bochecha do hamster



Legenda: a bolsa é evertida (A), fixada na placa de silicone (B) e dissecada, resultando em uma preparação de camada única, mantida sob perfusão constante com solução tamponada aquecida, e a microcirculação vista em microscópio ótico (objetiva de 5x de aumento) (C).

Figura 13 - Sistema de microscopia intravital: reservatório com a solução HEPES (*buffer reservoir*) conectado ao cilindro de gás, ao sistema de aquecimento (*water bath* e serpentinas) e a uma bomba de perfusão (*peristaltic pump*)

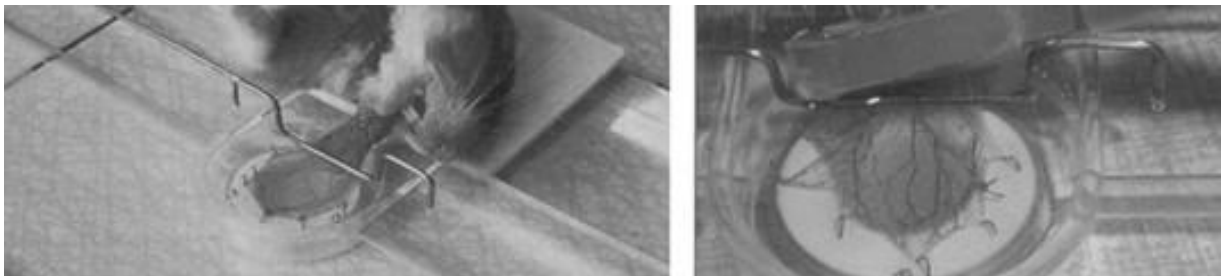


Fonte: Esquema adaptado de Svensjö, 2005 (112)

### 3.9.2 Protocolo de isquemia e reperfusão

A lesão por isquemia e reperfusão foi o método escolhido como estímulo experimental para ativação das células do leito vascular da bolsa da bochecha. Em nossos experimentos, a isquemia foi realizada durante 30 minutos através de um torniquete de ar inflável, colocado ao redor da região do “pescoço” do pedículo vascular da bolsa da bochecha, próximo à região da boca do hamster, com pressão suficiente para inibir totalmente o fluxo sanguíneo local, conforme descrito anteriormente por Duling (109), Persson *et al.* (205), Svensjö (97) e por Bouskela e Grampp (206) (Figura 14). A seguir, realizamos a liberação do torniquete, o tecido foi reperfundido e pela visualização do extravasamento do corante injetado foi possível realizar as medições de alterações da permeabilidade macromolecular.

Figura 14 – Imagens com a preparação da bolsa de bochecha do hamster montada na placa de acrílico fixada com pinos metálicos no anel de silicone (A) e o torniquete inflável posicionado ao redor do pescoço da bolsa da bochecha preparado para iniciar a isquemia (B)



Fonte: Imagens extraídas de Conceição *et al.*, 2012 (207).

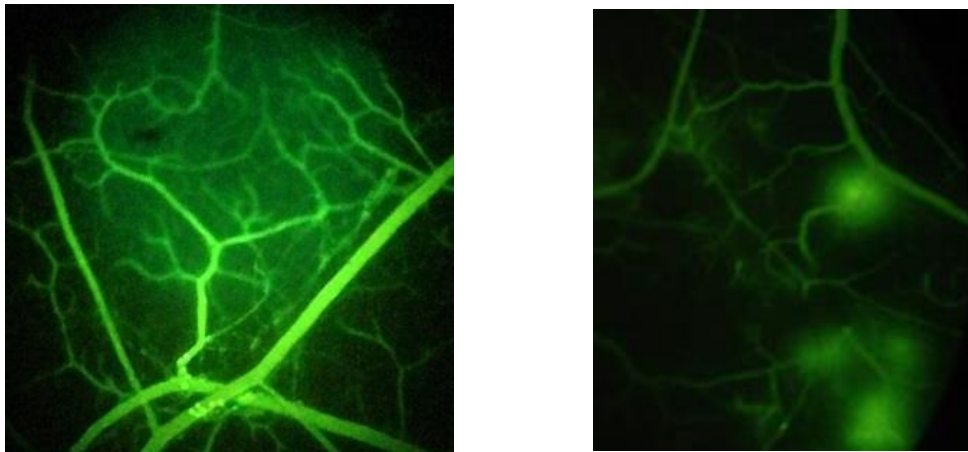
### 3.9.3 Microscopia intravital para avaliar a permeabilidade microvascular a macromoléculas

A permeabilidade a macromoléculas foi quantificada manualmente pela contagem do número de pontos visíveis de extravasamento de corante (*leaks*) na área preparada (1cm<sup>2</sup>) usando um microscópio de luz ultravioleta (aumento de 40x). *Leaks* são definidos como pontos extravasculares visíveis (diâmetro de 100 μm) de FITC-dextrana em vênulas pós-capilares vistas sob luz fluorescente (Figura 15). O número de *leaks* foi contado no início e durante a reperfusão após 30 min de isquemia nos tempos 0, 5 e 10 min (T0, imediatamente após; T5, 5 min após; e T10, 10 min após a liberação do torniquete). As preparações que

apresentavam mais de 10 *leaks* espontâneos ou petéquias no início do experimento foram excluídas devido a danos anteriores ao tecido.

Finalizados os experimentos microvasculares, estes animais foram eutanasiados por meio de injeção de cloreto de potássio (KCl 3M) e todos os esforços foram feitos para minimizar seu sofrimento durante todo o processo.

Figura 15 – As fotos exibem a microcirculação da bolsa da bochecha do hamster



Legenda: (A) vista ao microscópio óptico com FITC-dextrana sob luz UV (objetiva de 10x); com destaque para os *leaks* ou pontos de extravasamento microvascular (B), visualizados e contados durante o período de reperfusão.

### 3.10 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade, curtose e assimetria, e então submetidos a métodos não paramétricos para todas as comparações e correlações. As comparações pareadas foram feitas pelo teste U de Mann-Whitney (teste M-W U), e as comparações entre três ou mais grupos foram feitas com teste Kruskal-Wallis ANOVA (K-W ANOVA). Resultados significativos em K-W ANOVA foram analisados com o pós teste de Dunn para determinar quais grupos eram significativamente diferentes uns dos outros. A correlação entre pares de variáveis foi avaliada por meio da correlação de pontos de Spearman. Em qualquer caso, o nível de significância foi conservadoramente definido como 0,01. Os pacotes estatísticos usados foram Statistica 8 [Stat Soft, Inc. (2007) e R versão 3.6.1 (2019)] em execução no R Studio versão 1.2.5001 (2019).

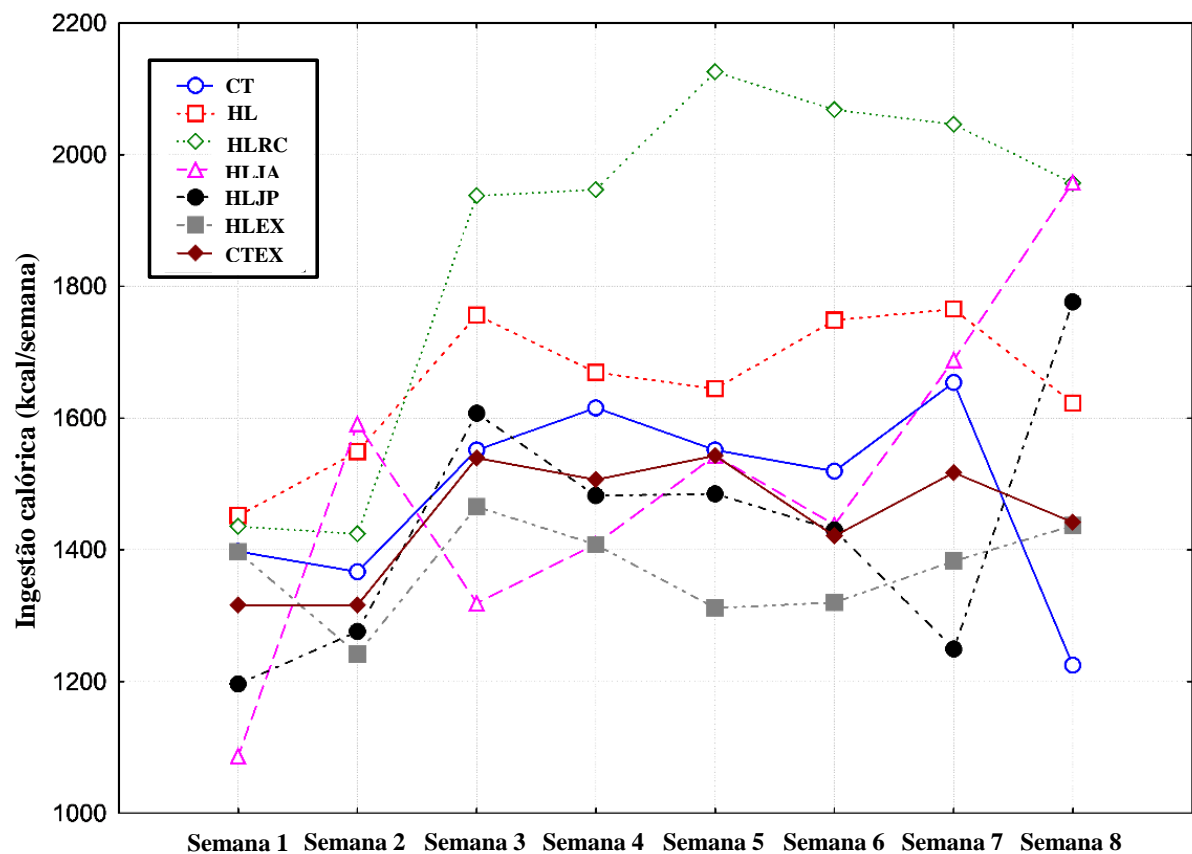
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação nutricional

Os dados do consumo alimentar durante o período de tratamento são exibidos em calorias, por semana para cada grupo, na Figura 16. Não houve diferença estatística na quantidade total de calorias ingeridas entre os grupos.

No entanto, o grupo HLRC apresentou um consumo calórico cerca de 50% maior que o controle, e superior aos demais grupos também.

Figura 16 - Consumo de calorias no período de intervenção (8 semanas), apresentado por semana para cada grupo



Legenda: Todos os valores são apresentados como média. CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua). HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. HLEX = Ração hiperlipídica + Exercício. CTEX = Controle + Exercício. (n = 11-12 por grupo).



#### 4.2 Massa corporal total e parâmetros metabólicos

O grupo HL apresentou aumento significativo de 16,1% na massa corporal total (MC) quando comparado ao grupo CT (Tabela 3).

Animais HLRC e HLJP mostraram uma diminuição significativa da massa corporal e da razão da massa corporal (razão MC), ou seja, razão do peso corporal antes e após a intervenção, quando comparados ao grupo HL (15,2% MC e 18,2% razão MB; e 13,6% MC e 9,1% razão MC, respectivamente). O grupo HLJA apresentou queda significativa apenas na razão da massa corporal (9,1%) quando comparado ao grupo HL.

Além disso, HLJP e HLJA mostraram uma diminuição significativa na massa corporal e na razão da massa corporal quando comparados com o grupo HLEX.

Não houve diferença significativa nos níveis sanguíneos de glicose (GL) e colesterol total (CT) entre os grupos. No entanto, o grupo HLJP apresentou níveis significativamente menores de triglicerídeos (TGL) quando comparado ao grupo HLEX.

Tabela 4 - Massa corporal, níveis de glicose e perfil lipídico

	CT	HL	HLRC	HLJA	HLJP	HLEX	CTEX
<b>MC (g)</b>	170,5 [156,5-183,5]	198,0*** [190,0-205,0]	168,0## [163,0-186,0]	183,0++ [165,0-193,0]	171,0##+++ [161,0-189,0]	203,0 [194,5-212,5]	166,5 [158,0-183,0]
<b>Razão MC</b>	1,1	1,1	0,9###	1,0##+	1,0###+++	1,1	1,1
<b>GL (mg/dL)</b>	66,5 [64,0-71,0]	71,0 [64,5-77,0]	71,5 [60,5-74,5]	76,0 [63,5-90,5]	74,5 [66,5-84,5]	77,0 [65,5-85,5]	72,5 [65,0-79,0]
<b>CT (mg/dL)</b>	39,9 [34,7-49,1]	43,4 [36,5-48,6]	45,0 [36,5-57,5]	44,5 [37,6-47,0]	46,2 [27,6-55,4]	40,7 [34,7-57,8]	41,5 [32,4-48,0]
<b>TGL (mg/dL)</b>	69,4 [55,5-90,4]	70,7 [51,1-89,8]	73,8 [54,9-82,5]	80,2 [57,6-119,2]	46,6+ [35,7-73,1]	96,4 [64,5-134,7]	78,3 [56,5-119,5]

Legenda: Todos os valores são apresentados como mediana [quartil inferior-superior]. CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua). HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. HLEX = Ração hiperlipídica + Exercício. CTEX = Controle + Exercício. (n = 24-31 por grupo). MC = Massa corporal total; Razão MC = Relação da massa corporal (peso final/peso de engorda); GL = Glicemia; CT = Colesterol total; TGL = Triglicerídeos.

\*\*\* Significativamente diferente do grupo CT (p <0,001).

## Significativamente diferente do grupo HL (p <0,01).

### Significativamente diferente do grupo HL (p <0,001).

+ Significativamente diferente do grupo HLEX (p <0,05).

++ Significativamente diferente do grupo HLEX (p <0,01).

+++ Significativamente diferente do grupo HLEX (p <0,001).

### 4.3 Composição corporal

A sobrecarga de gordura provocou um aumento significativo no tecido adiposo corporal que foi alterado apenas pela dieta convencional (HLRC) e jejum intermitente periódico (HLJP). Os animais HL aumentaram significativamente sua massa total de tecido adiposo branco (TA) e também a massa relativa de tecido adiposo branco (TAR), ou seja, a porcentagem de gordura em relação à massa corporal total, quando comparados ao grupo CT (75% TA e 42,3% TAR, respectivamente) (Figura 17, A e B;  $p < 0,001$ ).

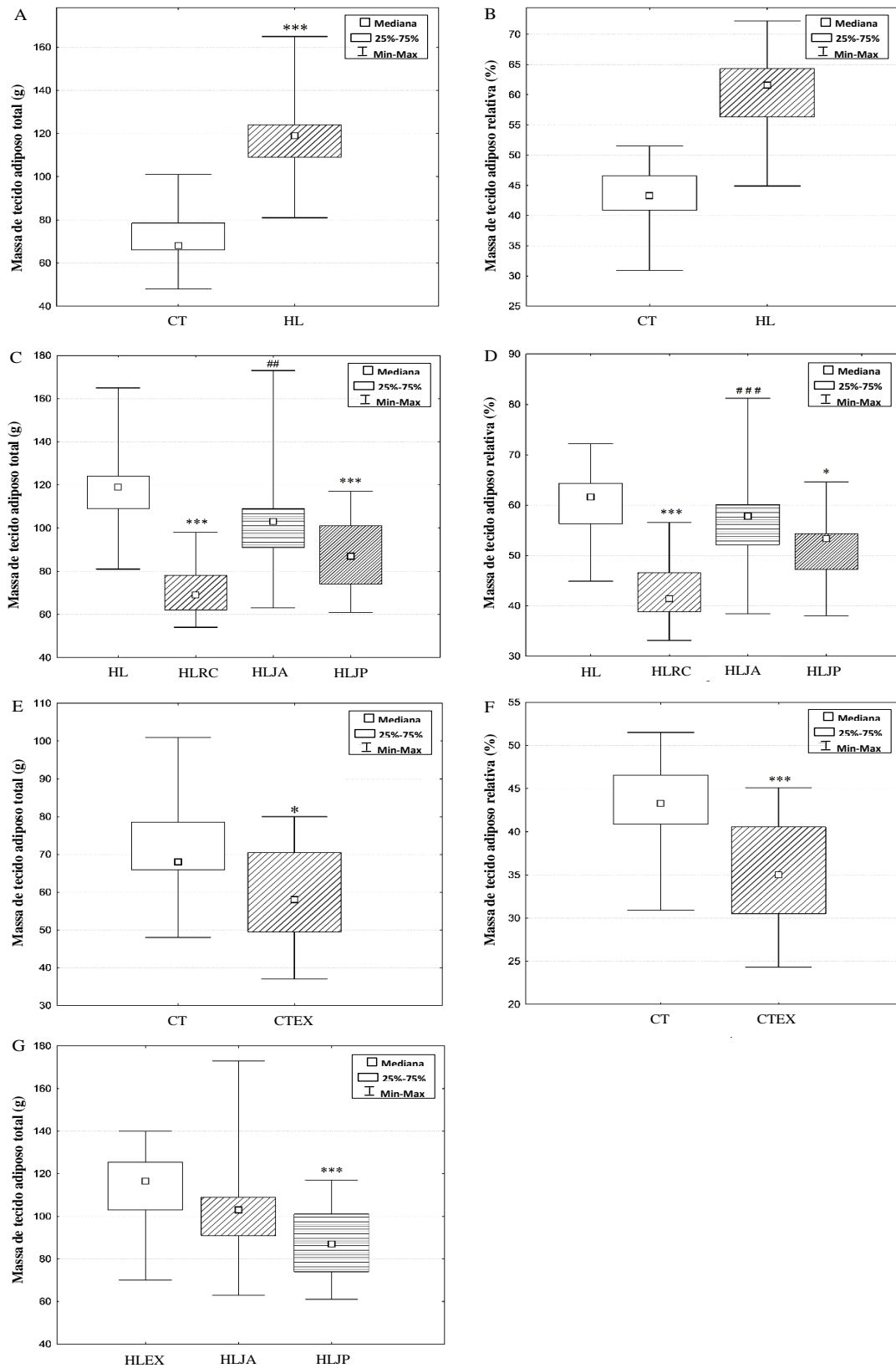
HLRC e HLJP mostraram uma diminuição significativa no tecido adiposo total (TA) e na massa relativa de tecido adiposo (TAR) quando comparados ao grupo HL (redução de 42% TA e 32,8% TAR; e 26,9% TA e 13,5% TAR, respectivamente; Figura 17, C e D).

Em relação às intervenções dietéticas, os animais do grupo HLRC apresentaram redução de 33% no tecido adiposo total ( $p < 0,01$ ) e 28,4% na massa relativa de tecido adiposo ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo HLJA (Figura 17, C e D).

O grupo CTEX apresentou diminuição de 14,7% do tecido adiposo total ( $p < 0,05$ ) e 19,2% da massa relativa de tecido adiposo ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo CT (Figura 17, E e F).

Além disso, o grupo HLJP apresentou diminuição significativa de 25,3% do tecido adiposo total ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo HLEX (Figura 17, G).

Figura 17 - Massa de tecido adiposo total (g) e relativa (%). Todos os valores são apresentados como mediana com quartil mínimo-máximo e inferior-superior



Legenda: CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua).

HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. HLEX = Ração hiperlipídica + Exercício. CTEX = Controle + Exercício. (n = 16-20 por grupo).

\* Significativamente diferente do grupo CT (p <0,05).

\*\*\* Significativamente diferente do grupo CT (p <0,001).

\* Significativamente diferente do grupo HL (p <0,05).

\*\*\* Significativamente diferente do grupo HL (p <0,001).

## Significativamente diferente do grupo HLRC (p <0,01).

### Significativamente diferente do grupo HLRC (p <0,001).

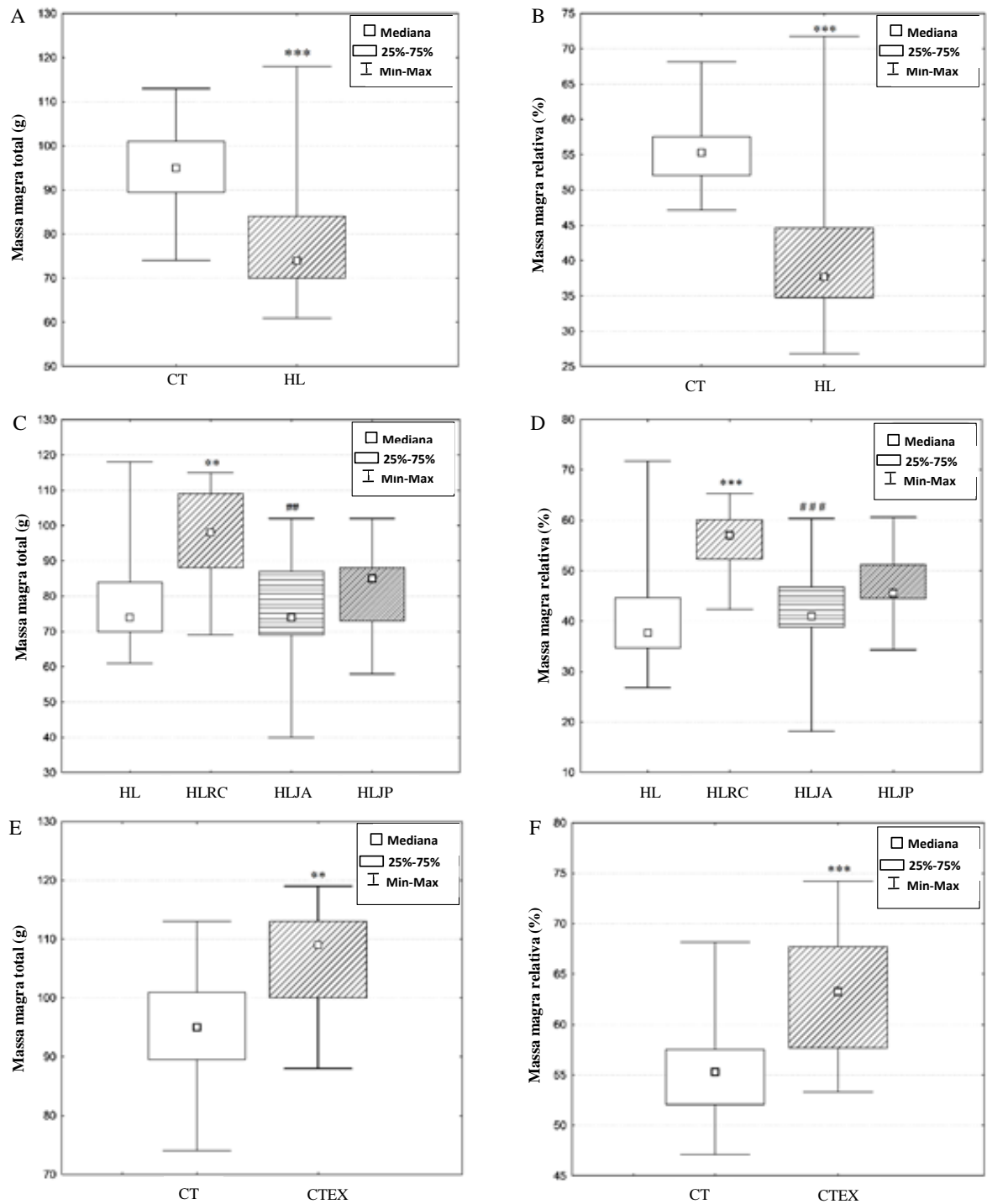
+++ Significativamente diferente do grupo HLEX (p <0,001).

Em relação à massa magra, a dieta hiperlipídica provocou uma diminuição significativa da massa muscular. Os animais HL apresentaram uma redução de 22% da massa magra total e 31,8% da massa magra relativa, ou seja, porcentagem de tecido magro em relação à massa corporal total, quando comparados ao grupo controle (CT) (Figura 18, A e B, p <0,001). Esta alteração pareceu ser revertida e a massa magra recuperada quando os animais retornam para a alimentação com ração padrão (HL vs. HLRC aumento de 32,4% da massa magra total, p <0,01 e 51,5% da massa magra relativa, p <0,001; Figura 18, C e D).

Em comparação com os grupos submetidos ao jejum intermitente, o grupo HLRC apresentou aumento significativo da massa magra quando comparado ao grupo submetido ao jejum intermitente alternado (HLJA vs. HLRC aumento de 32,4% da massa magra total, p <0,01 e 39,3% da massa magra relativa, p <0,001; Figura 18, C e D).

O treinamento físico promoveu um aumento significativo na massa magra, mas apenas quando foi associado com alimentação com ração padrão (CT vs. CTEX aumento de 14,7% da massa magra total, p <0,01 e 14,5% de massa magra relativa, p <0,001; Figura 18, E e F).

Figura 18 - Massa magra total (g) e relativa (%)



Legenda: Todos os valores são apresentados como mediana com quartil mínimo-máximo e inferior-superior. CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua). HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. CTEX = Controle + Exercício. (n = 16-20 por grupo).

\*\* Significativamente diferente do grupo CT ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Significativamente diferente do grupo CT ( $p < 0,001$ ).

\*\* Significativamente diferente do grupo HL ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Significativamente diferente do grupo HL ( $p < 0,001$ ).

## Significativamente diferente do grupo HLRC ( $p < 0,01$ ).

### Significativamente diferente do grupo HLRC ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4 Expressão de eNOS e iNOS no músculo cardíaco e na aorta torácica

Não foram encontradas diferenças significativas nas avaliações de eNOS e iNOS no coração e na aorta comparando todos os grupos tratados.

No entanto, podemos observar pela Tabela 4 um aumento de aproximadamente 40% e 55% da expressão de eNOS nos cardiomiócitos do grupo HLJA, em relação aos grupos CT e HL, respectivamente, assim como um aumento da expressão de eNOS em aproximadamente 50% e 66% no grupo HLJP em relação aos grupos CT e HL, respectivamente.

O grupo HLRC apresentou uma elevação menos expressiva de eNOS, de aproximadamente 20% e 33% em relação aos grupos CT e HL, respectivamente.

Por fim, o grupo HLEX não apresentou alteração na expressão de eNOS em relação ao grupo HL e mostrou uma redução de 10% em relação ao grupo CT.

Tabela 4 - Expressão protéica de eNOS e iNOS no tecido cardíaco

	CT	HL	HLRC	HLJA	HLJP	HLEX	CTEX
eNOS/CT	1,0 [1,0-1,0]	0,9 [0,8-1,4]	1,2 [1,0-1,8]	1,4 [0,8-2,2]	1,5 [1,2-2,3]	0,9 [0,8-1,4]	1,1 [0,6-2,1]
iNOS/CT	1,0 [1,0-1,0]	0,9 [0,6-1,3]	0,9 [0,6-1,8]	1,0 [0,9-1,3]	0,9 [0,7-1,6]	1,1 [0,5-1,5]	1,0 [0,6-2,0]

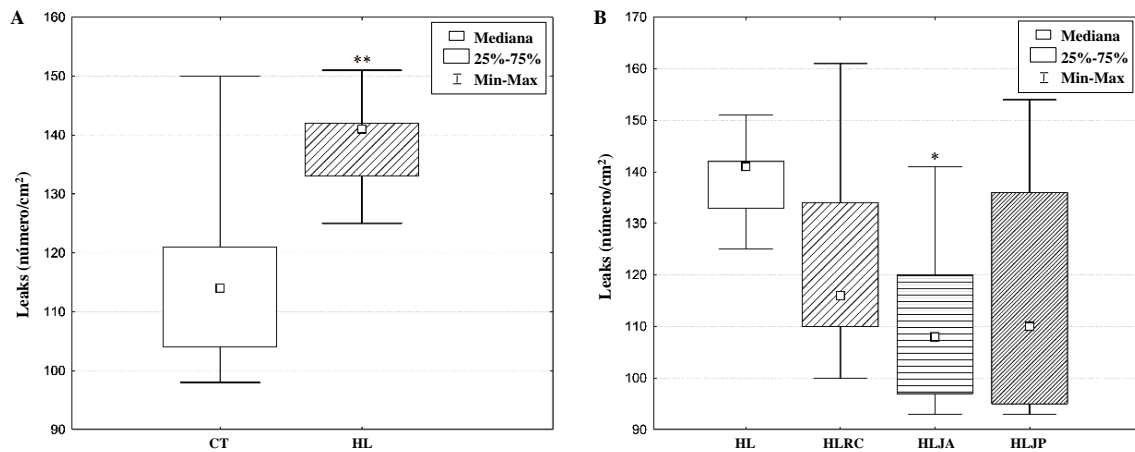
Todos os valores são apresentados como mediana [quartil inferior-superior] e foram normalizados pelos valores do grupo C. CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua). HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. HLEX = Ração hiperlipídica + Exercício. CTEX = Controle + Exercício. (n = 24-31 por grupo).

#### 4.5 Análise da permeabilidade macromolecular induzida por isquemia e reperfusão

A permeabilidade macromolecular após procedimento de isquemia seguida por reperfusão, medida 10 minutos após o início da reperfusão, foi significativamente maior nos animais alimentados com ração hiperlipídica (HL) em comparação com o grupo controle (CT) alimentado com ração padrão (CT vs. HL com aumento de 23,7% n° leaks/cm<sup>2</sup>, p <0,01; Figura 19, A).

Em relação aos protocolos de jejum intermitente, o grupo de jejum alternado (HLJA) apresentou um menor número de leaks, significativamente diferente do grupo HL (HLJA vs. HL com diminuição de 23,4% n° leaks/cm<sup>2</sup>, p <0,05; Figura 19, B). Não foram encontradas diferenças significativas entre os outros grupos analisados.

Figura 20 - Permeabilidade macromolecular em vênulas pós-capilares após 30 minutos de isquemia seguida de reperfusão na bolsa da bochecha do hamster



Legenda: Número de leaks aos 10 min de reperfusão. Todos os valores são apresentados como mediana com quartil mínimo-máximo e inferior-superior. CT = Controle. HL = Ração hiperlipídica. HLRC = HL + Ração padrão (restrição calórica contínua). HLJA = HL + Jejum Intermitente Alternado. HLJP = HL + Jejum Periódico Intermitente. (n = 7-11 por grupo).

\*\* Significativamente diferente do grupo CT (p <0,01).

\* Significativamente diferente do grupo HF (p <0,05).

## 5 DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, mais de 1,9 bilhão de pessoas no mundo apresentavam sobrepeso e mais de 650 milhões de pessoas eram obesas, número que representa o triplo de indivíduos desde 1975 (2,208).

Em indivíduos obesos e com sobrepeso, as doenças cardiometabólicas se desenvolvem como consequência da adiposidade, que resulta em um quadro de inflamação crônica de baixo grau e disfunção microvascular (3,209). As doenças das sociedades modernas associadas à obesidade, tais como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cânceres e doença de Alzheimer, estão sobrecarregando os sistemas de saúde em todo o mundo (10).

Atualmente, os tratamentos não farmacológicos para o controle da obesidade envolvem a modificação de fatores associados ao estilo de vida, relacionados à qualidade e quantidade da alimentação e combate ao sedentarismo, através da implementação da dieta convencional de restrição calórica contínua e do exercício físico aeróbico crônico na rotina destes pacientes. Um estudo que avaliou os fatores de risco associados com infarto agudo do miocárdio em 52 países revelou que nove fatores modificáveis, sendo seis deles intimamente relacionados à alimentação, são responsáveis por 90% e 94% do risco atribuível na população em homens e mulheres, respectivamente (210).

Infelizmente, o conhecimento comum de que a redução da ingestão total de calorias e os exercícios físicos regulares podem ajudar a melhorar o peso corporal e reduzir o risco de doenças, em muitos casos, não vem sendo aplicado com sucesso (2,126,211,212). Tais estratégias comumente recomendadas apresentam baixa adesão entre a população em geral e dificilmente são mantidas a longo prazo. Por esse motivo, se torna necessário o estudo de novas alternativas para a redução da adiposidade e melhora das disfunções patológicas associadas à obesidade e ao sobrepeso.

Embora o conhecimento científico ressalte os benefícios do consumo de vegetais, frutas, fibras, castanhas e peixes (34), o padrão alimentar no mundo atual, especialmente no Ocidente, compreende predominantemente alimentos que contém altos níveis de gordura e carboidratos, tais como frutose e sacarose, e esta dieta parece resultar em efeitos semelhantes aos desencadeados pela ração hiperlipídica em roedores, como aumento do peso corporal e gordura abdominal, além de hiperinsulinemia e hiperglicemia (211). Portanto, os roedores são



utilizados como uma importante ferramenta nos estudos translacionais que abordam o assunto.

Atualmente, existem diversas opções de modelo animal para o estudo da obesidade, que devem ser escolhidas de acordo com a proposta do estudo em questão. Tais modelos podem apresentar mutações genéticas que resultam em obesidade ou podem ainda desenvolver a doença por conta de modificações em fatores ambientais. Dentre os roedores, podemos citar como exemplo dois modelos experimentais bastante utilizados: os ratos *Zucker* que possuem alterações genéticas (mutação no gene *fa/fa*), e os ratos *Wistar* usados em estudos de obesidade induzida por dieta (213,214).

Os *Zucker* são animais espontaneamente hiperfágicos e por isso desenvolvem obesidade precocemente, desde os primeiros meses de vida, por deficiências relacionadas à sinalização (defeito no receptor) da leptina e resistência à insulina com glicemia normal. Por conta destas características, esses animais são um bom modelo experimental para estudos translacionais visto que representariam uma parcela da nossa população que também apresenta obesidade e resistência à insulina, mas sem desenvolver diabetes (213,214).

Os ratos *Wistar* respondem às modificações dietéticas, apresentando significativo aumento de peso, adiposidade e algumas alterações metabólicas (213,214). Modelos animais de obesidade induzida por dieta são os que apresentam características que mais se aproximam dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica em humanos, permitindo muitas vezes avaliar o papel da alimentação, assim como a fisiopatologia e a etiologia destas duas doenças, além da realização de testes farmacológicos. Por outro lado, tais modelos são aplicados associados a diferentes protocolos de tratamento e composições dietéticas diversas, levando a achados discrepantes entre os estudos, dificultando a comparação dos resultados mesmo quando utilizam o mesmo modelo animal (214).

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados hamsters sírios machos como modelo de obesidade ou sobrepeso induzido por dieta hiperlipídica. O modelo em hamster já se mostrou eficaz na indução de disfunção microvascular e resistência a insulina por dieta hiperlipídica (202).

Além disso, estes roedores apresentam duas estruturas saculares de tecido distensível, usadas para armazenar alimentos, denominadas bolsas da bochecha do hamster e a preparação da bolsa é um método amplamente utilizado para avaliar a microcirculação (97,109,112,206,207). Esta foi a técnica de avaliação microcirculatória escolhida para estudar e comparar os efeitos do jejum intermitente, restrição calórica contínua e exercício aeróbico crônico.

O tecido da bolsa da bochecha do hamster e a metodologia aplicada apresentam diversas vantagens para a análise da microcirculação *in vivo*, tais como: 1) facilidade e acesso relativamente não traumático ao tecido; 2) fluxo de sangue forte e estável; 3) clareza na visualização do tecido; 4) presença de leitos microcirculatórios cutâneos e musculares esqueléticos (97,109).

Decidimos trabalhar com roedores machos em nosso estudo devido aos efeitos benéficos do estrogênio sobre o sistema cardiovascular já descritos em mulheres e fêmeas, tais como: 1) aumento da síntese de lipoproteína de alta densidade (HDL) e degradação de lipoproteína de baixa densidade (LDL); 2) propriedade antioxidante, sequestrando radicais livres e atenuando seus efeitos deletérios no metabolismo celular; 3) ação direta sobre a parede dos vasos sanguíneos, inibindo a proliferação de células do músculo liso vascular, atenuando a agregação plaquetária e promovendo o relaxamento de artérias; 4) age diretamente sobre os miócitos cardíacos, modulando canais de cálcio (negativamente) e de potássio (positivamente), levando ao relaxamento do músculo liso vascular; 5) modula a síntese de colágeno e elastina, levando à redução dessas proteínas na matriz extracelular, aumentando a formação vascular e perfusão tecidual; 6) atua direta ou indiretamente em diferentes etapas do controle da pressão via sistema renina-angiotensina-aldosterona (215).

Para induzir um aumento significativo da adiposidade em nosso modelo experimental, os animais foram submetidos a uma alimentação hiperlipídica (HL). A ração hiperlipídica apresenta um aumento de 24% no teor de gordura em relação à ração padrão (comercial), sendo comprovadamente eficaz em provocar distúrbios metabólicos e microcirculatórios nestes animais, tais como aumento na deposição de gordura visceral, resistência à insulina, disfunção microvascular e aumento da permeabilidade macromolecular induzida por isquemia e reperfusão (I/R), semelhantes aos apresentados por humanos obesos ou com sobrepeso (153,202).

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos do jejum intermitente em hamsters submetidos a alimentação hiperlipídica e comparar os resultados obtidos com as abordagens não farmacológicas tradicionais de controle da obesidade – dieta convencional de restrição calórica contínua e exercício físico aeróbico crônico.

Recentemente, estudos em roedores e humanos têm destacado a importância da frequência alimentar e os efeitos de períodos de jejum na redução da obesidade e hipertensão, assim como seu potencial para retardar ou atenuar processos envolvidos no envelhecimento. Além disso, evidências demonstram que o jejum intermitente é capaz de ajudar na prevenção

e tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, através da reprogramação de vias metabólicas (18,19,126).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos benéficos na saúde metabólica desencadeados pelos padrões de alimentação alterados não são totalmente compreendidos, mas estudos apontam para mudanças compensatórias nas vias de detecção de energia, como AMPK, AKT/ mTOR e proteína de ligação do elemento de resposta de AMP cíclico (CREB), todas implicadas na homeostase celular e oscilações rítmicas do relógio circadiano (18).

O jejum intermitente se tornou popularmente conhecido nos últimos anos e os protocolos adotados por cada indivíduo, ou grupos de estudo, podem variar bastante (216). No nosso trabalho, optamos por avaliar dois protocolos de jejum, sendo eles: 1) jejum em dias alternados (HLJA), no qual durante 24 horas, em 2 dias alternados por semana, o indivíduo realiza privação total de alimentos ou, em humanos, uma ingestão muito restrita (com redução para menos de 25% das necessidades energéticas), com ingestão livre ou *ad libitum* de alimentos nos demais dias da semana; 2) jejum periódico (HLJP), que consiste em um período de 48 horas contínuas de jejum ou restrição alimentar por semana, durante o qual os indivíduos têm um consumo energético muito reduzido (cerca de 25% das necessidades diárias de energia ou, aproximadamente, 500 calorias/dia para mulheres e 600/dia calorias para homens), com alimentação livre nos demais dias da semana (186,190,216,217).

Os dois protocolos de jejum adotados em nosso trabalho se baseiam na premissa “5:2”, ou seja, no período de uma semana o paciente é submetido à restrição calórica somente por 2 dias (alternados ou consecutivos) e, nos demais, encontra-se livre para se alimentar conforme preferir. Neste trabalho, optamos por utilizar tais opções de jejum intermitente para podermos avaliar qual a influência da frequência (quantas vezes por semana) e da duração total (número de horas consecutivas) do jejum nos marcadores cardiometabólicos avaliados.

Em relação às abordagens tradicionais de controle da obesidade, optamos por utilizar a dieta convencional de restrição calórica ou o exercício físico aeróbico crônico. Submetemos os animais a cada tipo de intervenção (jejum, dieta ou exercício) separadamente para que pudessemos analisar e comparar os efeitos de cada uma delas nestes indivíduos.

Diferentemente de outro estudo anterior em ratos (218), não observamos um padrão de hiperfagia entre os animais submetidos ao jejum intermitente ou nos demais grupos, uma vez que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na ingesta calórica dentre todos os grupos analisados.

Em nosso estudo, observamos que, nos primeiros dias em que foram submetidos ao jejum absoluto, os animais de ambos os grupos de jejum intermitente apresentaram um

comportamento mais ativo e de busca por alimento quando suas gaiolas eram manipuladas. Além disso, em um primeiro momento, aumentaram discretamente o consumo médio de ração, como se estivessem desenvolvendo um quadro de hiperfagia. No entanto, isto não foi observado ao longo do restante do período experimental e nem foi confirmado posteriormente pela análise estatística da ingesta calórica.

Curiosamente, apesar de não apresentar diferença significativa, os animais do grupo HLRC (dieta convencional) consumiram cerca de 50% a mais de calorias que os demais. Durante o período de intervenção, estes animais mudaram da ração hiperlipídica para ração comum (controle), o que não acontece durante as intervenções com jejum, já que estes animais passam todo o período experimental recebendo apenas ração hiperlipídica.

Os roedores, diferentemente dos humanos, são bastante sensíveis ao conteúdo energético dos alimentos e parecem controlar bem a ingestão calórica pelo mecanismo de saciedade, que envolve o eixo neuroendócrino controlado por hormônios e peptídeos, como por exemplo insulina, leptina e grelina (219). Os animais do grupo HLRC parecem compensar as mudanças no conteúdo calórico e na composição nutricional das dietas alterando seus padrões alimentares e aumentando o consumo. A reprogramação metabólica que desencadeia tal comportamento poderia ser uma possível explicação para a dificuldade que muitos indivíduos apresentam em manter, a longo prazo, dietas restritivas. Nesse sentido, os protocolos de jejum parecem ser uma boa opção para evitar esse efeito e, conseqüentemente, o ganho de peso.

Em humanos, um estudo com indivíduos saudáveis ou eutróficos (sem obesidade e sobrepeso), mostrou que o peso corporal foi reduzido após três semanas de jejum em dias alternados, indicando que os indivíduos foram incapazes de consumir alimentos em quantidade suficiente nos “dias de alimentação” para compensar e recuperar o peso perdido durante os dias de jejum. Entretanto, os animais, especialmente os roedores, não parecem seguir sempre tal padrão de resposta ao jejum. Um estudo com camundongos se contrapõe ao observado em humanos, demonstrando que animais alimentados em dias alternados mantiveram seu peso corporal e consumiram aproximadamente a mesma quantidade de comida em um dia que os animais alimentados *ad libitum* consumiram por mais de 2 dias (220).

Animais em restrição alimentar são uma ferramenta útil para o estudo das alterações neuroquímicas que podem ocorrer em humanos quando uma dieta é abandonada, assim como para elucidar os mecanismos que levam ao ganho de peso e os sistemas contrarregulatórios que regulam a perda de peso após períodos de déficit de calorias. Por exemplo, experimentos

que avaliarem as oscilações na expressão de diferentes sinalizadores, tais como o neuropeptídeo Y (NPY) - que atua em regiões hipotalâmicas, estimulando a ingestão de alimentos e o armazenamento de energia no tecido adiposo branco - poderiam ajudar a esclarecer se períodos prolongados de jejum podem desencadear hiperfagia (221,222).

Embora as diferenças na ingesta calórica, descritas acima, não tenham se refletido estatisticamente, observamos que os animais do grupo HL (ração hiperlipídica) ganharam significativamente mais peso (aumento de mais de 16% na massa corporal total) que os animais do grupo controle (ração padrão). Portanto, a qualidade da dieta parece ser o fator determinante para o surgimento das alterações patológicas encontradas em nosso estudo.

A composição com alto teor de ácidos graxos da dieta hiperlipídica parece ter sido a principal contribuição para o significativo ganho de peso e acúmulo de gordura nos animais do grupo HL. Alguns estudos têm destacado que o tipo de gordura utilizada nas dietas obesogênicas parece ser uma variável mais importante para a indução da obesidade do que a quantidade de gordura em si (223). A dieta rica em gordura apresenta efeitos deletérios, tais como: a) prejudica a capacidade de oxidação de gorduras pelo organismo; b) aumenta a atividade da lipase no tecido adiposo; c) reduz a supressão da transcrição de genes lipogênicos; d) potencializa a deposição de gordura corporal (219,223).

Observamos que o grupo submetido exclusivamente à dieta hiperlipídica apresentou, além de maior peso, uma piora na composição corporal. Em concordância com o que foi anteriormente publicado pelo nosso grupo (153,202), nosso estudo também demonstrou que a alimentação hiperlipídica é capaz de promover um incremento significativo na massa corporal em decorrência de uma expansão do tecido adiposo (+75%) e aumento no percentual de gordura corporal (+42,3%) em comparação com uma dieta padrão (ração comercial). Dietas contendo mais gordura saturada parecem ser mais obesogênicas e propensas a induzir resistência à insulina e a resposta dos principais neuropeptídeos hipotalâmicos que regulam o balanço energético varia dependendo do tipo de gordura ingerida (213).

Observamos também que a dieta hiperlipídica resulta em diminuição da massa magra, com uma redução de 22% na massa magra total e de 31,8% no percentual de massa magra dos animais do grupo HL, provavelmente devido a 2 fatores: 1) menor teor de proteína dessa ração; e/ou 2) alterações metabólicas geradas pela sobrecarga de gordura.

A ração hiperlipídica (HL) apresenta uma menor quantidade de proteínas quando comparada à ração padrão (RC) ou comercial (23% e 15%, respectivamente, o que corresponde à uma redução de 8% no teor protéico na ração HL). Essa mudança na composição da ração é geralmente observada em diversas dietas com alto teor de gordura, já

que uma porcentagem de outros macronutrientes, dentre eles as proteínas, costuma ser reduzida para aumentar proporcionalmente a quantidade de lipídios como principal fonte de energia (213). Nesse caso, o déficit protéico pode ter favorecido também o ganho de peso encontrado em nosso estudo, por estimular o consumo de uma quantidade ‘extra’ de energia, na tentativa de compensar as necessidades protéicas (214,223).

A manutenção a longo prazo do perfil alimentar pouco nutritivo e rico em calóricas, associado ainda a um estilo de vida cada vez mais sedentário, pode levar à uma condição denominada “obesidade sarcopênica”, na qual observa-se uma diminuição na massa muscular proporcional ao acúmulo de adiposidade visceral (224).

Algumas alterações patológicas, características da obesidade e do sobrepeso, parecem ser os principais responsáveis por essa diminuição do tecido magro nestes pacientes e também em modelos experimentais de obesidade. Dentre elas, merecem destaque: 1) maior síntese e liberação de adipocinas pró-inflamatórias e macrófagos ativados - causam danos em proteínas e DNA, resultando em disfunção celular, e prejudicando processos de crescimento e regeneração do tecido muscular (225,226); 2) aumento nos níveis de glicocorticóides - agindo na via sinalização da insulina, aumentam a proteólise, inibem a síntese protéica e induzem miostatina, um fator que regula negativamente a massa muscular (227,228); 3) acúmulo ectópico de gordura - o aumento de triglicerídeos no tecido muscular interfere na ativação de proteínas-chave da via da insulina, prejudicando as ações anabólicas do hormônio sobre o tecido muscular (225).

Em estudos com primatas não humanos, observou-se que a restrição dietética iniciada em macacos Rhesus jovens e adultos melhora a saúde metabólica, previne a obesidade, retarda o início da sarcopenia e reduz o risco de desenvolver ou morrer por diabetes tipo 2, câncer e doenças cardiovasculares (19).

Em humanos, quase todos os estudos envolvendo protocolos de jejum intermitente resultam em algum grau de perda de peso, variando de 2,5 a 9,9%, acompanhada por uma redução na massa de tecido adiposo branco (191,192). Estudos em animais e com pacientes obesos demonstraram que o jejum intermitente é uma abordagem segura e aparentemente tolerável para perda de peso, que produz resultados semelhantes na massa corporal total e na composição corporal em comparação com os resultados obtidos com a restrição calórica contínua, e que a restrição intermitente parece ser mais eficaz em minimizar a perda de massa magra (18,140,222).

Em concordância com esses dados, observamos no nosso estudo que um dos protocolos de jejum intermitente (HLJP) foi tão eficiente quanto a restrição calórica contínua

(HLRC) em melhorar a composição corporal e em reduzir a massa corporal total dos animais submetidos a uma alimentação hiperlipídica.

Os animais do grupo submetido ao jejum periódico de 48 horas (HLJP) apresentaram uma redução de 13,6% na massa corporal total, resultado bem semelhante ao encontrado no grupo dieta convencional (HLRC), que teve uma redução de 15,2% na massa corporal total, quando ambas intervenções foram comparadas aos animais submetidos somente à dieta hiperlipídica (grupo HL). Vale ressaltar que, mesmo apresentando um aumento de cerca de 50% na ingestão de calorias, o grupo HLRC apresentou uma redução significativa no peso corporal, bem semelhante a observada com o protocolo de jejum periódico (HLJP). Este achado reafirma nossa hipótese de que a qualidade da dieta, ou seja, a fonte energética usada em sua composição, parece influenciar mais no ganho ou perda de massa corporal do que a ingesta calórica em si. O grupo de jejum alternado (HLJA), por outro lado, apresentou uma redução significativa somente na razão da massa corporal (-9,1%) em comparação ao grupo HL.

Em relação à massa de tecido adiposo e ao percentual de gordura corporal, o protocolo de jejum intermitente periódico de 48 horas (grupo HLJP) e a restrição calórica contínua (grupo HLRC) foram eficazes em reduzir a adiposidade nestes animais. No entanto, observamos que os animais submetidos à dieta convencional (HLRC) apresentaram uma maior redução do tecido adiposo (-42%) e no percentual de gordura (-32,8%) do que a diminuição obtida através do jejum periódico (HLJP), que exibiu uma redução de 26,9% no tecido adiposo (diferença de mais de 15% entre os grupos HLRC vs. HLJP) e de 13,5% no percentual de gordura (diferença de 19,3% entre os grupos HLRC vs. HLJP) quando ambas intervenções foram comparadas aos animais submetidos somente à dieta hiperlipídica (grupo HL).

Vale destacar ainda que, quando comparamos as três intervenções dietéticas entre si – dois protocolos de jejum intermitente e a restrição contínua, vimos que a dieta convencional (HLRC) apresentou uma resposta mais eficaz na redução da massa gorda total, com redução de 33% no tecido adiposo e de 28,4% no percentual de gordura, em relação ao jejum intermitente alternado (HLJA).

Em relação à constituição muscular, nossos protocolos de jejum intermitente não foram capazes de restaurar a massa magra dos nossos animais aos mesmos níveis do controle, conforme observado com a dieta de restrição calórica convencional (HLRC). Este grupo, que retornou para a alimentação padrão (ração comercial) durante o período de intervenção - caracterizando uma restrição calórica diária em relação à alimentação hiperlipídica adotada

durante o período de engorda - apresentou um aumento de 32,4% na massa magra total e de 51,5% no seu percentual de massa magra quando comparado ao grupo submetido somente à alimentação com ração hiperlipídica durante todo o período experimental (HL). Além disso, quando comparado ao grupo de jejum alternado (HLJA), o grupo HLRC também apresentou maior massa magra (32,4% total e 39,3% relativa).

Como os dois grupos submetidos ao jejum intermitente receberam somente dieta hiperlipídica durante todo o período experimental, a qualidade nutricional desta ração, que é reduzida em proteínas (-8%) em relação à ração padrão (comercial), parece ter influenciado negativamente na manutenção do tecido magro dos animais destes grupos, conforme discutido anteriormente. Um estudo com camundongos corrobora nossos achados ao demonstrar que a massa magra destes roedores sofreu aumento (~12% -13%) somente quando o protocolo de jejum intermitente em dias alternados foi associado à dieta com baixo teor de gordura, em comparação com os animais alimentados com ração hiperlipídica *ad libitum* ou com acesso a esta em dias alternados (222).

Em humanos, um estudo de restrição dietética com indivíduos eutróficos (homens e mulheres), também demonstrou perda de massa magra após 22 dias de jejum alternado. A capacidade ou tendência para aumentar o consumo alimentar, ou comer além da saciedade, durante os “dias de alimentação”, parecem ser formas importantes de compensar as perdas calóricas durante o período de jejum e de manter o peso corporal desses indivíduos (191).

Já foi descrito que a atividade física e os exercícios regulares promovem a prevenção e redução do acúmulo de tecido adiposo branco, evitando a deposição visceral de gordura (34,35,229). O modelo de exercício tradicionalmente prescrito possui como características principais uma intensidade de baixa a moderada associada à longos períodos de tempo de execução, com predominância aeróbica. O termo exercício físico aeróbio é utilizado para denominar atividades físicas de natureza rítmica, que são praticadas de modo regular e envolvem o recrutamento de grandes grupos musculares por período prolongado (igual ou superior a 10 min). A liberação de energia para a atividade física aeróbica é decorrente da oxidação de carboidratos e ácidos graxos, via fosforilação oxidativa, principalmente (229,230).

O músculo esquelético é responsável por 30 a 40% da taxa metabólica de repouso do adulto e por 80% da captação de glicose estimulada pela insulina (231). A resistência à insulina no músculo esquelético é um resultado do aumento do acúmulo de gordura e, por causa das propriedades metabólicas do órgão, é o principal contribuinte para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (232). O tecido magro possui uma notável flexibilidade



no uso de diferentes fontes de energia (ácidos graxos ou glicose) e tanto o jejum como o exercício físico funcionam como estímulos, capazes de desencadear essa flexibilidade, resultando em mudanças metabólicas, tais como aumento na oxidação de ácidos graxos e no metabolismo oxidativo (231,233).

No presente estudo, observamos que o grupo CTEX, que compreende os animais alimentados com ração padrão submetidos à corrida em esteira rolante por uma hora diariamente (exercício aeróbico crônico), apresentaram redução do tecido adiposo (-14,7%) e do percentual de gordura corporal (-19,2%), apesar de não terem apresentado redução no peso corporal. O mesmo não foi observado nos animais do grupo HLEX, igualmente treinados, porém alimentados com ração hiperlipídica, que não apresentaram redução na massa corporal total e nem melhora na composição corporal.

Nosso resultado vai de encontro à alguns achados previamente descritos em humanos e roedores (234,235). No entanto, tais estudos diferem do nosso quanto ao modelo experimental adotado (rato) e o tipo de treinamento aeróbico (corrida voluntária em roda). Os ratos são animais comumente utilizados como modelo experimental na maioria dos estudos envolvendo fisiopatologia do exercício, devido à sua conformação física e força, sendo considerados mais adequadas do que o hamster para treinamento, e também pela facilidade que apresentam em se adaptar e aceitar o exercício imposto. Apesar do hamster não ser usado rotineiramente para tais pesquisas, um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que uma rotina de exercícios aeróbicos, associada à modificação dietética, podem diminuir os depósitos viscerais de tecido adiposo, aumentar a expressão de eNOS e atenuar a disfunção microcirculatória de hamsters alimentados com dieta hiperlipídica (153).

Dados da literatura destacam que, mesmo na ausência da perda de massa corporal, podem ocorrer adaptações benéficas sobre o acúmulo de tecido adiposo em animais (236) e também em humanos, visto que o treinamento aeróbio parece ter um efeito mais importante sobre os níveis de adiposidade visceral em indivíduos obesos do que sobre a perda de peso em si (237).

Quando os resultados com jejum intermitente foram comparados aos do grupo HLEX, observamos que ambos os protocolos de jejum (HLJA e HLJP) foram capazes de promover diminuição da massa corporal total, sendo que o jejum periódico por 48 horas (HLJP) resultou também em uma redução de 25,3% do tecido adiposo.

Portanto, em nossos animais, o exercício foi capaz de atenuar a adiposidade e promover um incremento na massa magra apenas quando o treinamento aeróbio crônico foi associado a uma alimentação saudável (CTEX) e, por isso, tais efeitos positivos não foram

observados no grupo HLEX, visto que esse foi alimentado com ração rica em gordura, mesmo que este tenha sido submetido ao mesmo treinamento físico.

De acordo com esses achados, o jejum parece ser uma melhor opção para a redução da adiposidade que o exercício físico. Por outro lado, é sabido que o exercício é um estímulo que inibe a adipogênese, aumenta a biogênese mitocondrial e a capacidade de oxidar ácidos graxos pelas células musculares, efeitos que deveriam ter contribuído para a redução do tecido adiposo nos nossos animais (159,231,238).

Em relação à massa magra, os animais do grupo CTEX apresentaram um aumento tanto na massa magra total (-14,7%) como relativa (-14,5%). Uma hipótese para o que observamos pode residir no fato de que a alimentação hiperlipídica, apesar de rica em energia, não oferece o aporte protéico necessário para a formação de novas fibras musculares, mesmo mediante estímulo pelo exercício físico. Um estudo demonstrou que combinar jejum em dias alternados com exercício de resistência pode ser uma boa alternativa para preservar a massa magra em pacientes obesos (239).

Quanto aos parâmetros metabólicos, em nosso modelo, a alimentação com alto teor de gordura não alterou a glicemia e o colesterol. Na verdade, não encontramos diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea e de colesterol total entre todos os grupos estudados. Porém, o jejum intermitente periódico (HLJP) foi capaz de diminuir significativamente os níveis de triglicerídeos quando foi comparado ao grupo exercitado com dieta hiperlipídica (HLEX).

Nosso resultado parece estar de acordo com a parte da literatura, embora os protocolos de jejum intermitente sejam muito diversos. Um estudo comparativo das diferentes formas de jejum demonstrou que o jejum em dias alternados, além de reduzir o massa e gordura corporal, também reduziu os níveis de colesterol total e de triglicerídeos em indivíduos com eutróficos, com sobrepeso e obesidade (240).

O tecido adiposo branco unilocular é o órgão de armazenamento de triglicerídeos a partir da incorporação de 3 moléculas de ácidos graxos ricos em energia a uma molécula de glicerol. As moléculas de triglicerídeos são constantemente renovadas e, quando há uma maior necessidade de suprimento de energia, como no exercício ou em estados de jejum, os triglicerídeos são hidrolisados, através da lipólise, e os ácidos graxos são liberados para serem utilizados como fonte de energia em outros órgãos (1,43).

Pessoas com obesidade liberam na circulação sanguínea quantidades aumentadas de ácidos graxos livres (AGLs) e, quanto maior a quantidade de gordura acumulada, maior será a quantidade liberada de AGLs. Embora níveis mais elevados de insulina (como observado em

muitos pacientes com obesidade) suprimam a lipólise, isso não é capaz de reduzir a liberação de AGLs na obesidade e sobrepeso. Os AGLs são a principal fonte de energia nutritiva no estado de jejum; entretanto, na obesidade, o fluxo de ácidos graxos livres excede as necessidades do tecido e os mecanismos de defesa entram em ação, contribuindo para os fatores de risco metabólicos (10).

O influxo excessivo de ácidos graxos livres para órgãos como o fígado aumenta o seu conteúdo de triglicerídeos, resultando em esteatose hepática, produzindo resistência à insulina e promovendo o desenvolvimento de dislipidemia aterogênica, caracterizada por elevações séricas de triglicerídeos, apolipoproteína B (apo B), colesterol LDL e diminuição de HDL (10). Os AGLs estão relacionados ao aumento de partículas de LDL, as quais penetram no espaço subendotelial, onde sofrem oxidação formando LDLox, aumentando a ação de macrófagos, culminando em estresse oxidativo, lesão endotelial e aterosclerose (11).

No cenário pró-inflamatório, característico da obesidade e sobrepeso, a interação entre adipócitos e macrófagos leva à disfunção metabólica induzida por lipotoxicidade. Entretanto, na obesidade, a biologia dos adipócitos normais é modificada pela rápida expansão de depósitos adiposos devido à diversos fatores, tais como a superalimentação crônica, levando à hipertrofia e hipóxia destas células. A hipóxia do tecido adiposo é um estímulo potente para ativação de vias inflamatórias, resultando em estresse do retículo endoplasmático e recrutamento de macrófagos (via MCP-1 e MIF) e, eventualmente, a necrose dos adipócitos. Por outro lado, a hipóxia inibe a diferenciação de pré-adipócitos e a apoptose de adipócitos (241–243). A hiperplasia das células adiposas, predominantemente no tecido adiposo subcutâneo periférico, por muitas vezes, supera a capacidade de angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), causando uma diminuição do fluxo sanguíneo local, que pode resultar em hipóxia celular e necrose (3,241,242). Em relação aos hormônios, a hipóxia reduz a adiponectina e aumenta a leptina, promove a ativação da lipólise (mediada por proteína quinase ativada por AMP), inibe a respiração mitocondrial e ativa a via inflamatória IKK/NF- $\kappa$ B (242,243).

Em condições fisiológicas normais, o tecido adiposo é extremamente sensível à insulina e as concentrações deste hormônio regulam o equilíbrio entre o armazenamento pós-prandial de ácidos graxos (triglicerídeos) e sua liberação na circulação durante o estado de jejum (243). Entretanto, na obesidade e no diabetes tipo 2, os adipócitos apresentam resistência ao efeito anti-lipolítico da insulina e as concentrações de ácidos graxos livres no plasma se elevam. O termo lipotoxicidade se refere às consequência deste quadro, que desencadeia um acúmulo ectópico de gordura em diversos tecidos, tais como: músculo, fígado

e células  $\beta$  pancreáticas, bem como no coração e leito vascular, que resultam em danos metabólicos significativos e um aumento no risco de doença cardiovascular (243).

Estudos sobre longevidade em roedores e humanos destacam a redução dos níveis de glicose e insulina em jejum como importantes respostas desencadeadas pelas dietas restritivas e, em modelos animais, uma restrição calórica de 40% a curto e longo prazo melhora significativamente a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (244–248). Estudos em humanos também mostraram que a restrição calórica reduz a glicemia e insulina plasmática em jejum, além de melhorar a sensibilidade à insulina (244,249).

Com relação à função cardiovascular, os níveis ideais de atividade física, exercício e aptidão recomendados - aeróbica de intensidade moderada (mínimo de 30 minutos durante cinco dias por semana) ou vigorosa (mínimo de 20 minutos em três dias da semana) (170) - diminuem a mortalidade cardiovascular em indivíduos obesos ou com sobrepeso, evitando o acúmulo de gordura visceral, reduzindo o colesterol total e os níveis de triglicédeos, prevenindo a disfunção microvascular e melhorando a função vascular, reduzindo a pressão arterial, estresse oxidativo e adipocinas pró-inflamatórias (45-47).

Estudos em animais e humanos demonstram que a disfunção endotelial está presente em indivíduos com obesidade e sobrepeso, mesmo na ausência de outras alterações, tais como hipertensão e hiperglicemia. A disfunção da microvasculatura, tanto nos vasos de resistência como nos leitos capilares nutritivos, se desenvolve progressivamente, juntamente com um aumento na adiposidade, mesmo em crianças. Indivíduos com obesidade demonstram densidade capilar diminuída, que está inversamente associada à adiposidade visceral e ao tecido adiposo subcutâneo (14).

O excesso de gordura, principalmente nos casos de obesidade visceral, pode levar à rarefação capilar no tecido adiposo branco pela redução crônica da biodisponibilidade vascular do óxido nítrico (NO) levando à hipóxia (250). Tais reduções no fluxo sanguíneo local podem limitar a entrega de nutrientes, contribuindo assim para um quadro que envolve: 1) resistência à insulina; 2) estado pró-inflamatório; 3) necrose dos adipócitos induzida pela isquemia; e 4) recrutamento de macrófagos do tipo M1 (15,250–252).

Vários fatores podem estar envolvidos no papel do NO na rarefação capilar, tais como: 1) aumento do estresse oxidativo; 2) aumento da atividade e expressão da proteína quinase C, que reduz a biodisponibilidade de NO em microvasos; e 3) redução na tetrahidrobiopterina (BH4), cofator necessário para a produção de NO. As alterações fisiopatológicas consequentes da rarefação capilar são altamente deletérias ao sistema microcirculatório, à

homeostase vascular e promovem disfunções no endotélio e na microcirculação (15,250,252–255).

Neste sentido, a disfunção ou ativação endotelial é crucial no início, progressão e complicações clínicas da doença vascular, estando associada a um mau prognóstico cardiovascular e funcionando como um marcador precoce de risco cardiovascular (15,16,124).

Estudos recentes demonstraram que protocolos de jejum intermitente e a restrição calórica convencional podem melhorar as funções cardiovasculares e cerebrais, pois atuam em vários fatores de risco para doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral, incluindo redução da pressão arterial e aumento da sensibilidade à insulina (128). Além disso, em comparação com condições convencionais de alimentação, animais de laboratório mantidos sob protocolos de jejum exibiram respostas melhoradas ao estresse adaptativo (126) e cardioproteção contra dano isquêmico em um modelo animal de infarto do miocárdio (196).

O jejum intermitente parece restaurar a função autofágica - um processo catabólico de reciclagem de nutrientes que previne contra o estresse oxidativo – preservando, assim, a qualidade das organelas; por outro lado, tal função restauradora pode ser prejudicada pela resistência à insulina e por diabetes induzida pela obesidade, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (190,256,257).

Em nosso estudo, avaliamos a disfunção microvascular através de experimentos de permeabilidade macromolecular e, apesar da bolsa da bochecha do hamster ser um tecido de baixa demanda metabólica, é concebível considerar que as respostas microvasculares locais representam alterações sistêmicas, visto que microcirculação cutânea e alterações sistêmicas apresentam boa correlação (13–16).

De fato, vários estímulos fisiológicos e fisiopatológicos podem induzir, aguda e cronicamente, alterações na permeabilidade endotelial, tais como histamina, VEGF e outros mediadores inflamatórios, que podem atuar no endotélio e estimular a abertura de suas junções intercelulares (258). A permeabilidade vascular é, portanto, essencial para a saúde dos tecidos e órgãos, sendo também uma característica importante em muitas doenças onde está significativamente aumentada como, por exemplo, na inflamação crônica de baixo grau típica da obesidade e em patologias associadas à angiogênese, como os tumores (93,258). Alterações patológicas na permeabilidade microvascular podem ser observadas na microcirculação de animais alimentados com dieta hiperlipídica, assim como em pacientes com sobrepeso e obesidade, que geralmente apresentam dislipidemia (16,153,202).

A análise da permeabilidade vascular é um processo extremamente complexo que, embora bem definido, pode ser afetado por muitas variáveis diferentes, dentre elas: 1) as propriedades intrínsecas dos diferentes tipos de microvasos envolvidos (por ex. capilares e vênulas); 2) tamanho, forma e carga das moléculas “extravasantes”; 3) as moléculas presentes nas vias anatômicas que também participam na formação da barreira celular endotelial; 4) o tempo de avaliação da permeabilidade; 5) os modelos animais ou leitos vasculares que são usados para investigação (93).

Esta propriedade tem sido avaliada há anos a partir da observação do extravasamento de diversos corantes injetados (via endovenosa), que ligam-se às proteínas plasmáticas circulantes, particularmente a albumina, e funcionam como marcadores para traçar o movimento das macromoléculas ao longo da parede vascular. Estes marcadores devem apresentar duas propriedades biológicas importantes: devem ter seu peso molecular bem definido e apresentar elevada estabilidade química (97,259).

Experimentos para avaliação da permeabilidade vascular utilizam diferentes estímulos, tais como drogas ou patógenos, para “ativação” do endotélio afim de analisar as respostas da microcirculação de determinado tecido ou órgão (112). Dentre os fatores que promovem alterações na permeabilidade vascular, optamos pela lesão por isquemia-reperfusão (I/R) como modelo para o nosso estudo. A lesão por I/R se refere aos danos celulares aos quais um tecido previamente viável é submetido após um período de isquemia - em outras palavras, à privação total e momentânea de seu suprimento sanguíneo - seguido por uma fase de reperfusão, ou seja, de restauração do fluxo sanguíneo deste tecido isquêmico (15,260).

As consequências funcionais da privação de um órgão de seu suprimento sanguíneo têm sido reconhecidas como um fator crítico no desfecho clínico de diversas doenças, como acidente vascular cerebral, choque hemorrágico e infarto do miocárdio, e do transplante de órgãos. As doenças cardiovasculares que são iniciadas por isquemia tecidual, local ou sistêmica, continuam sendo a principal causa de morte nos Estados Unidos e na Europa, e as altas taxas de morbidade e mortalidade dessas doenças chamam a atenção para a importância da reperfusão dos tecidos isquêmicos, sendo esta essencial na prevenção da necrose tecidual e para recuperar a função do órgão. Entretanto, evidências demonstraram que, embora o restabelecimento do fluxo sanguíneo para um órgão isquêmico seja essencial para prevenir lesões teciduais irreversíveis, a própria reperfusão pode ser responsável por aumentar significativamente a lesão tecidual quando comparada àquela produzida apenas pela isquemia, dando origem ao conceito de lesão por reperfusão ou “reperfusão letal” (261).

As alterações causadas pela lesão por I/R, em uma resposta fisiopatológica ou experimental, podem acometer uma variedade de órgãos e tecidos, porém, a principal unidade funcional afetada que determina a sobrevivência das células é a microcirculação, em especial as células endoteliais que revestem estes vasos sanguíneos, que são reconhecidamente muito vulneráveis às consequências deletérias da I/R. Em resposta à I/R, ocorrem diversas modificações estruturais na monocamada endotelial, como o alargamento das junções paracelulares, causado pela dissociação de proteínas juncionais, ou contrações do citoesqueleto. O conseqüente aumento da permeabilidade microvascular resulta em edema, ou seja, acúmulo de líquido no tecido subcutâneo. O extravasamento de albumina nas vênulas após a lesão por I/R é proporcional à taxa de adesão leucocitária às células endoteliais e à infiltração destes leucócitos (principalmente neutrófilos) nos sítios de isquemia (260–264). O aumento no extravasamento macromolecular através de *gaps*, ou “aberturas alargadas”, entre as células endoteliais contraídas de vênulas pós-capilares é um evento importante na inflamação, sendo induzido por uma ação direta no endotélio venular de mediadores liberados por leucócitos ativados (112,264).

Durante a isquemia, as células são privadas de oxigênio, a ressíntese de ATP pela fosforilação oxidativa é comprometida, e ocorre um aumento compensatório da glicólise anaeróbica, que gera uma quantidade muito pequena de ATP e um acúmulo de resíduos metabólicos (92). Sabe-se que a hipóxia prolongada altera o potencial de membrana, perturba a distribuição de íons, aumenta o volume intracelular, diminui a fluidez da membrana e prejudica a organização do citoesqueleto das células endoteliais. Tais alterações podem ser acompanhadas por depleção das reservas de energia, reduzida produção de agentes vasodilatadores, como o NO, e produção exacerbada de fatores vasoconstritores como, por exemplo, a pró-aterogênica endotelina (ET-1) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), um pró-agregante plaquetário, que é estimulado pela própria ET-1. A ET-1 e o TXA<sub>2</sub> são importantes mediadores em eventos que induzem ao aumento da permeabilidade vascular e proliferação celular durante processos inflamatórios crônicos. Vale destacar também que, durante a isquemia, alguns genes são ativados nas células endoteliais hipóxicas, como os relacionados à expressão de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias; enquanto outros, como das NOS constitutivas, são suprimidos (16,260,261).

Entretanto, muitas destas respostas das células endoteliais à hipóxia são exacerbadas pelo início da reperfusão, e o NO produzido é prontamente removido pelos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS – *reactive oxygen species*). ROS são moléculas instáveis e extremamente reativas, que possuem ao menos um elétron desemparelhado, o que

permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas (reações redox), e que têm papéis significativos na sinalização celular e na homeostase corporal. Com o aumento abrupto nas reações de oxidação durante a reperfusão, as células endoteliais da microcirculação passam a produzir proporcionalmente mais ROS e a biodisponibilidade do NO é prejudicada, visto que o NO formado reage com o radical superóxido e é usado para a formação do peroxinitrito, um oxidante altamente tóxico (92,255,265).

O peroxinitrito, por sua vez, é responsável por um aumento adicional de ROS, através do desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), com conseqüente queda na síntese de NO e redução da sua biodisponibilidade. Em situações onde o aumento da produção de ROS se sobrepõe à capacidade de atuação do sistema antioxidante, ocorre um quadro de estresse oxidativo, produção e liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, fator ativador de plaquetas e fator de necrose tumoral, e aumento da biossíntese de moléculas que medeiam a adesão de leucócitos ao endotélio (92,255,265).

Vale ressaltar que algumas moléculas, como histamina ou bradicinina, podem aumentar a permeabilidade microvascular por ativação direta do endotélio, enquanto outros mediadores (tais como LTB<sub>4</sub> e C5a) aumentam a permeabilidade microvascular indiretamente, via ativação de células inflamatórias, tais como neutrófilos, que aderem e transmigram do endotélio, aumentando a permeabilidade microvascular (81).

Resumidamente, a reperfusão de tecidos isquêmicos resulta em uma resposta inflamatória local e sistêmica que, por sua vez, pode resultar em disfunção microvascular generalizada e alteração da função de barreira semipermeável do endotélio vascular (260).

A obesidade exacerba significativamente as disfunções microvasculares, resultando em diversas manifestações, sendo as principais: 1) aumento do estresse oxidativo e maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS); 2) menor biodisponibilidade de NO, seja pela redução na sua produção ou pela sua maior degradação devido à geração de ROS e desacoplamento das NOS constitutivas, resultando em diminuição do relaxamento arteriolar (menor vasodilatação) dependente do endotélio; 4) ativação do sistema complemento; 5) adesão de leucócitos às células endoteliais dos capilares; 6) agregação plaquetária; 7) aumento do recrutamento de células inflamatórias e aumento da permeabilidade microvascular à macromoléculas nas vênulas pós-capilares, formação de edema e infiltração de leucócitos (principalmente neutrófilos) nos tecidos (16,80,118).

A disfunção endotelial na microcirculação é um marcador precoce do risco cardiovascular, precedendo quaisquer placas ateromatosas estruturais visíveis, e está associada a um mau prognóstico cardiovascular, independente de alterações na tolerância à



glicose. Reiterando, a disfunção microvascular parece ser um processo sistêmico e seu estudo em diversos sítios pode ter correlação com a microcirculação de órgãos-alvo (15,266).

Em nosso estudo, a permeabilidade basal não foi diferente entre os grupos controle e alimentado com ração hiperlipídica (HL); entretanto, após 30 min de isquemia, houve um aumento significativo da permeabilidade macromolecular no grupo HL, caracterizando um estado de disfunção microvascular. Nossos dados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo em hamsters (153,202) e um estudo anterior onde suínos alimentados com uma dieta rica em gordura e de alto teor calórico resultou em um aumento na permeabilidade microvascular do miocárdio (106).

Um achado importante de nosso estudo foi que o protocolo de jejum em dias alternados (HLJA) foi capaz de reduzir a permeabilidade microvascular alterada nos animais alimentados com ração hiperlipídica. Portanto, este protocolo de jejum por 2 períodos de 24h parece ser capaz de reverter ou atenuar os danos vasculares causados pela sobrecarga de gordura, mas não sabemos ainda quais os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo.

Vários mediadores sabidamente envolvidos no aumento da permeabilidade endotelial, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , por exemplo, estão aumentados na obesidade (1,3,16). Portanto, uma das hipóteses para explicar esses achados é que os protocolos de jejum são capazes de alterar o estado redox, promovendo uma redução do estresse oxidativo, e também um aumento das respostas antioxidantes e antiinflamatórias (194,267–269).

Estudos têm demonstrado que o óxido nítrico (NO) pode desempenhar um papel importante como modulador intrínseco da permeabilidade microvascular. Vários mecanismos podem estar envolvidos no comprometimento microvascular na obesidade, como, por exemplo, a redução crônica da biodisponibilidade do NO secundária ao aumento do estresse oxidativo (270).

Em condições normais, a inibição da síntese de NO parece diminuir a permeabilidade microvascular. No entanto, durante condições inflamatórias, as evidências sugerem que o aumento da permeabilidade microvascular associada à diminuição da síntese de NO é dependente da ação dos leucócitos (270).

Na microcirculação, além da vasodilatação, é consenso entre os pesquisadores que na maioria dos sistemas e órgãos, senão em todos, o óxido nítrico previne a aterosclerose e outras patologias cardiovasculares através de diversos mecanismos como, por exemplo, impedindo a agregação e adesão de plaquetas e neutrófilos à superfície do endotélio, pela regulação do

tônus vasomotor e da permeabilidade microvascular, e inibição da migração e proliferação das células do músculo liso vascular (270).

No coração, a enzima NOS endotelial (eNOS) está presente nas células endoteliais da vasculatura coronária e endocárdica e dos cardiomiócitos. A forma NOS induzível (iNOS) também pode ser encontrada em cardiomiócitos (ventriculares) e células endoteliais, bem como fibroblastos e músculo liso vascular (87,91).

Dados da literatura fornecem evidências de uma relação direta entre exercício e saúde vascular pela manutenção da função de barreira endotelial, desencadeada pelo aumento do fluxo sanguíneo, resultando em aumento da expressão de eNOS e maior liberação de NO e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), potentes vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária. O exercício crônico promove a diminuição da produção de ROS, evitando o dano celular causado pelo estresse oxidativo, e todos os efeitos descritos acima refletem uma interação benéfica entre as ações do exercício e a microcirculação (153,154).

Estudos em animais mostraram que artérias de roedores treinados exibiram aumento da capacidade respiratória mitocondrial e melhor equilíbrio redox que pode, pelo menos em parte, ser atribuído à alta biodisponibilidade de NO (160,161). Corações de ratos mantidos por 8 meses em dieta de restrição calórica contínua exibiram melhora na recuperação da função após isquemia-reperfusão, conforme indicado pela melhora na respiração mitocondrial, e promoveu cardioproteção durante um processo de pré-condicionamento isquêmico (128).

Em ensaio clínico com indivíduos com sobrepeso, foi demonstrado que a dieta de uma refeição por dia (um outro tipo de protocolo de jejum com restrição de horário), com redução de calorias, melhorou significativamente a função ventricular esquerda, a recuperação da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso após o exercício (196).

Estudos anteriores de nosso grupo, com o mesmo modelo animal e protocolos semelhantes para dieta e exercícios, mostraram um aumento da expressão de iNOS na aorta de animais alimentados com alto teor de gordura (202), característico do estado inflamatório causado pela obesidade, e um aumento expressão da eNOS quando a modificação para uma dieta saudável e exercícios crônicos são combinados (153). Esses dados sugerem que as maiores melhorias na saúde são observadas com uma associação entre os efeitos protetores promovidos pelo exercício e a redução dos efeitos deletérios causados pela sobrecarga de gordura.

Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas avaliações da expressão tecidual, em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e da aorta torácica, das enzimas eNOS ou iNOS.

Entretanto, merece destaque o fato de que observamos um aumento na expressão de eNOS nos cardiomiócitos dos dois grupos submetidos ao jejum (HLJA e HLJP), variando entre 40-66%, e também no grupo de dieta convencional (HLRC), de 20% e 33%, quando estes foram comparados aos grupos controle (CT) e de dieta hiperlipídica (HL), respectivamente.

Optamos por analisar a expressão tecidual da eNOS e iNOS porque tais enzimas podem funcionar como indicadores indiretos da quantidade de NO, uma vez que o NO não pode ser diretamente medido. É possível que alterações na quantidade de NO não sejam acompanhadas por modificações detectáveis na expressão das enzimas eNOS e iNOS a ponto de serem identificadas pelo método de *Western blotting*. No entanto, devemos ressaltar que também é possível que os aumentos detectados na expressão de eNOS, observados nos grupos do nosso estudo submetidos à modificação dietética, possam representar respostas fisiológicas interessantes.

Estudos em animais e humanos destacam a importância biológica da NOS endotelial. Em camundongos, a inibição desta enzima, que catalisa a síntese endotelial de NO, acelera a aterogênese, e sua deleção genética resulta em hipertensão, remodelação vascular defeituosa, trombose e aumento das interações leucócito-endotélio. Em humanos, a disfunção endotelial, relacionada à biodisponibilidade prejudicada de NO, pode estar associada ao desacoplamento da eNOS, perda de sua função e formação de espécies reativas de oxigênio (especialmente superóxido). Nesse sentido, uma hipótese é que o jejum poderia desempenhar um papel protetor para o endotélio por potencializar a expressão da eNOS, com possível efeito ateroprotetor.

Uma hipótese para os resultados obtidos de eNOS e iNOS está na forma como nosso estudo foi desenhado: as intervenções (jejum, dieta ou exercício) foram aplicadas separadamente aos grupos experimentais e, logo, foram posteriormente comparadas individualmente. Em estudo prévio do nosso grupo (153), a expressão de eNOS em extratos de aorta mostrou um aumento linear em todos os grupos tratados com dieta e/ou exercício aeróbico crônico, porém, diferenças estatísticas significativas na expressão de eNOS em comparação ao grupo controle (ração hiperlipídica) só foram encontradas quando as duas intervenções – dieta e exercício – foram combinadas (153).

Outra hipótese para os resultados encontrados no nosso estudo pode estar relacionada às limitações técnicas do método *Imunoblotting*. Realizamos diversas tentativas para padronizar protocolos de extração, assim como de detecção, das proteínas iNOS e eNOS a partir de lisados de aorta torácica, por este representar um vaso fisiologicamente importante;

porém, não obtivemos êxito. E, ainda sobre a técnica, optamos por usar o corante vermelho Ponceau como controle interno dos experimentos, visto que a beta-actina e a tubulina, duas proteínas constitutivas classicamente utilizadas, foram moduladas pela dieta hiperlipídica e pelos exercícios (204). É possível que essa metodologia tenha influenciado negativamente nossos resultados, uma vez que encontramos uma variação muito elevada nos valores detectados dentro de cada grupo, não resultando em diferença estatística entre os grupos analisados.

Além disso, uma última hipótese a ser verificada reside na possibilidade das alterações observadas na permeabilidade microvascular não estarem relacionadas ao NO em si e, portanto, novos experimentos para elucidar os mecanismos envolvidos se fazem necessários.

Nesse sentido, experimentos de reatividade microvascular poderiam nos auxiliar a avaliar a responsividade do endotélio e da musculatura lisa, afim de testar se a suposta ausência de diferença na expressão das enzimas NOS se refletirá também nas respostas de contratilidade. Além disto, experimentos para a avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do estresse oxidativo, mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade endotelial, também poderiam nos ajudar a elucidar os mediadores envolvidos nos efeitos observados sobre a permeabilidade microvascular.

Conforme discutido, há grande dificuldade em comparar os estudos sobre os efeitos do jejum intermitente, em animais e em humanos, visto que tais estudos sobre o tema apresentam muita variabilidade nos seus resultados, que pode ser atribuída a uma série de fatores, tais como: a) diferenças no desenho experimental – variações nos tipos de protocolo de jejum adotados, bem como tempo de duração dessa intervenção; b) características do modelo animal ou da população amostral; c) dificuldade em relatar a ingestão calórica nos dias de jejum e nos dias de alimentação; e d) baixa adesão dos participantes ao tratamento proposto.

Em relação à avaliação da massa corporal, é importante considerar também que, mesmo que a massa corporal e a massa gorda tenham apresentado diminuição em muitos estudos, alguns descrevem problemas na adesão estrita aos protocolos de jejum como, por exemplo, grupos submetidos a jejum em dias alternados relataram que comeram mais do que o prescrito durante os dias de jejum, e menos do que o recomendado nos dias de alimentação livre. Além disso, as taxas de abandono destes estudos parecem altas (em torno de 40%). Sendo assim, apesar da significância estatística dos resultados de perda de peso, a importância clínica e a capacidade de sustentar um regime de jejum intermitente podem ser questionáveis (271).

Vale acrescentar que, no caso de estudos em humanos, é importante considerar os fatores subjetivos associados a cada protocolo adotado que possam influenciar a capacidade dos indivíduos em se engajar, voluntariamente, em períodos de jejum ou de alimentação muito reduzida por períodos prolongados. Adequar os horários, para que sejam mais convenientes para os pacientes, ou ainda adicionar uma refeição reduzida (10–20% das necessidades calóricas diárias) aos dias de jejum intermitente, podem tornar a prática mais aceitável e tolerável para um maior número de pessoas.

### **Conclusão**

Em resumo, o presente projeto de tese confirmou que submeter hamsters à alimentação rica em gordura (dieta hiperlipídica) induz um quadro típico de pacientes com sobrepeso e obesidade, visto que resultou em prejuízos à composição corporal, promovendo expansão do tecido adiposo branco e diminuição da massa magra, e disfunção microvascular, observada por meio do aumento da permeabilidade macromolecular induzida por estímulo de isquemia-reperfusão.

O protocolo de Jejum Intermitente Alternado (HLJA) restaurou a função microcirculatória, melhorando a permeabilidade macromolecular.

Entretanto, o protocolo de Jejum Intermitente Periódico (HLJP) não recuperou a permeabilidade microvascular, apesar da melhora na composição corporal, similar à observada com a dieta convencional, e dos menores níveis de triglicérides em relação ao exercício físico.

## REFERÊNCIAS

1. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–56.
2. WHO. Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 2016.
3. Bays HE. Adiposopathy: Is “sick fat” a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2461–73.
4. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2011;11(2):85–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3518031>
5. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde D de, Saúde V de D e A não T e P da. *Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados b [Internet]*. 1st ed. Ministério da Saúde, editor. Brasília; 2018. 130 p. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2017\\_vigilancia\\_fatores\\_risco.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_risco.pdf)
6. Sturm R, An R. Obesity and economic environments. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(5):337–50.
7. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: Where do we go from here? *Science (80- )*. 2003;299(5608):853–5.
8. Caballero B. The global epidemic of obesity: An overview. *Epidemiol Rev.* 2007;29(1):1–5.
9. Larson N, Story M. A review of environmental influences on food choices. *Ann Behav Med.* 2009;38(SUPPL.):56–73.
10. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2595–2600.
11. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875–80.
12. HUBERT HB, FEINLEIB M, McNAMARA PM, CASTELLI WP, Chalon J. Obesity as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Surv Anesthesiol.* 1984;28(1):11.
13. Bagi Z, Feher A, Cassuto J. Microvascular responsiveness in obesity: Implications for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 2012;165(3):544–60.
14. Jonk AM, Houben AJHM, de Jongh RT, Serné EH, Schaper NC, Stehouwer CDA. Microvascular Dysfunction in Obesity: A Potential Mechanism in the Pathogenesis of Obesity-Associated Insulin Resistance and Hypertension. *Physiology.* 2007;22(4):252–60.
15. Villela NR, Kramer-Aguiar LG, Bottino DA, Wiernsperger N, Bouskela E. Metabolic disturbances linked to obesity: the role of impaired tissue perfusion. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(2):238–45.
16. De Souza MDGC, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. Inflammation-induced microvascular dysfunction in obesity - A translational approach. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(4):645–54.
17. Sugihara-Seki M, Fu BM. Blood flow and permeability in microvessels. *Fluid Dyn Res.* 2005;37(1-2 SPEC. ISS.):82–132.

18. Longo VD, Mattson MP. Fasting : Molecular Mechanism and Clinical Application. *Cell Metab* [Internet]. 2015;19(2):181–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jand.2015.02.018>  
<http://www.raco.cat/index.php/HojasWarmi/article/view/208552>  
<http://www.raco.cat/index.php/HojasWarmi/article/download/208552/277739>  
<http://www.raco.cat/index.php/HojasWarmi/article/view/Article/208552/>
19. Partridge LF and L. Promoting Health and Longevity through Diet: from Model Organisms to Humans. *Cell*. 2015;161(1):106–18.
20. Mark P. Mattson, Keelin Moehl, Nathaniel Ghena, Maggie Schmaedick and AC. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(2):63–80.
21. Keogh JB, Pedersen E, Petersen KS, Clifton PM. Effects of intermittent compared to continuous energy restriction on short-term weight loss and long-term weight loss maintenance. *Clin Obes* [Internet]. 2014;4(3):150–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826770>
22. R. S, J. N, D. S, T. N, M.E. G, L. R, et al. Effects of intermittent and continuous calorie restriction on body weight and metabolism over 50 wk: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2018;108(5):933–45. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L626219104%0A>  
<http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/nqy196>
23. Headland ML, Clifton PM, Keogh JB. Effect of intermittent energy restriction on flow mediated dilatation, a measure of endothelial function: A short report. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(6).
24. I. K, S. K. Weight management in overweight and obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Br J Diabetes Vasc Dis* [Internet]. 2010;10(6):274–83. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L361234105%0A>  
<http://dx.doi.org/10.1177/1474651410388976%0A>  
<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=14746514&id=doi:10.1177%2F1474651410388976&atitle=Weight+management+in+over>
25. Headland M, Clifton PM, Carter S, Keogh JB. Weight-loss outcomes: A systematic review and meta-analysis of intermittent energy restriction trials lasting a minimum of 6 months. *Nutrients*. 2016;8(6).
26. Seimon R V., Roekenes JA, Zibellini J, Zhu B, Gibson AA, Hills AP, et al. Do intermittent diets provide physiological benefits over continuous diets for weight loss? A systematic review of clinical trials. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2015;418:153–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.014>
27. Antoni R, Johnston K, Collins A, Robertson MD. The Effects of Intermittent Energy Restriction on Indices of Cardiometabolic Health. *Res Endocrinol*. 2014;2014:1–24.
28. Antoni R, Johnston KL, Collins AL, Robertson MD. Investigation into the acute effects of total and partial energy restriction on postprandial metabolism among overweight/obese participants. *Br J Nutr*. 2016;115(6):951–9.
29. David W Haslam WPTJ. Obesity. *Lancet*. 2005;366:1197–209.
30. Wanderley EN, Ferreira VA. Obesidade: uma perspectiva plural. *Cien Saude Colet* [Internet]. 2010;15(1):185–94. Available from: [https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource\\_ssm\\_path=/media/assets/csc/v15n1/a24v15n1.pdf](https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/csc/v15n1/a24v15n1.pdf)
31. Dias PC, Henriques P, Anjos LA dos, Burlandy L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cad Saude Publica*. 2017;33(7):1–12.
32. Rodacki M. Obesity and dyslipidemia – An urgent matter in youth from the general

- population and in type 1 diabetic patients. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(3):199–201.
33. Mendonça CP, Anjos LA dos. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad Saude Publica.* 2005;20(3):698–709.
  34. Sabia RV, Santos JE dos, Ribeiro RPP. Efeito da atividade física associada à orientação alimentar em adolescentes obesos: comparação entre o exercício aeróbio e anaeróbio. *Rev Bras Med do Esporte.* 2005;10(5):349–55.
  35. Lúcia C, Forjaz DM, Negrão CE. O Papel do Sedentarismo na Obesidade. *Rev Bras Hipertens.* 2000;7(2):149–55.
  36. Cristina EC, Betzabeth S. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. *Rev Bras Epidemiol.* 2010;13(1):163–71.
  37. IBGE IB de G a e E-. Pesquisa de Orçamento Familiares 2008-2009 - Aquisição alimentar domiciliar per capita [Internet]. Vol. 46, *American Journal of Cardiology.* Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv47307.pdf>
  38. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(a008417).
  39. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol [Internet].* 2013;92(6–7):229–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
  40. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on obesity and heart disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation.* 2006;113(6):898–918.
  41. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology.* 2011;58(1):15–23.
  42. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(3):107–14.
  43. Arner P. Fat tissue growth and development in humans. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2018;89:37–45.
  44. Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013;19(5):631–4.
  45. Spiegelman BM. Banting lecture 2012: Regulation of adipogenesis: Toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes.* 2013;62(6):1774–82.
  46. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol [Internet].* 2014;10(1):24–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.204>
  47. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):96–105.
  48. Cui X-B, Chen S-Y. White adipose tissue browning and obesity. *J Biomed Res [Internet].* 2017;31(November 2016):1–2. Available from: [http://www.jbr-pub.org/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=jbr170101&flag=1](http://www.jbr-pub.org/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=jbr170101&flag=1)
  49. Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics [Internet].* 2001;108(3):712–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533341>
  50. Mishra S, Wasir HS. Obesity as a risk factor for coronary artery disease. *J Assoc Physicians India.* 1997;45(7):555–8.



51. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: Rounding out the big picture. *Cell*. 1996;87(3):377–89.
52. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783–7.
53. Camp HS, Ren D, Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2002;8(9):442–7.
54. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3).
55. Wajchenberg BL. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;44(1):13–20.
56. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316:129–39.
57. Jean César Farias de Queiroz1 MICA-V, Curi, Rui FBL. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(5):582–94.
58. Bergman DA, Henry RR, Kitabchi AE, Bays HE, Bray GA, Rodbard HW, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6(3):343–68.
59. Baker AR, da Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, et al. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:1–7.
60. Mazurek T, Zhang LF, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. *Circulation*. 2003;108(20):2460–6.
61. Engeli S. Is there a pathophysiological role for perivascular adipocytes? *Am J Physiol Circ Physiol*. 2005;289(5):H1794–5.
62. Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JML, et al. Comparison between Adventitial and Intimal Inflammation of Ruptured and Nonruptured Atherosclerotic Plaques in Human Coronary Arteries. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(1):20–4.
63. Liu J, Fox CS, Hickson DM, Sarpong D, Ekunwe L, May WD, et al. Pericardial adipose tissue, atherosclerosis, and cardiovascular disease risk factors: The Jackson heart study. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1635–9.
64. Robert H. Eckel, MD; Ronald M. Krauss M. American Heart Association call to action: Obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation*. 1998;97(21):2099–100.
65. Duncan BB. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *Sao Paulo Med J*. 2001;119(3):122–7.
66. Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and Atherosclerosis: Mechanistic Insights. *Can J Cardiol [Internet]*. 2015;31(2):177–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.11.031>
67. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis [Internet]*. 2016;248:97–109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
68. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: from Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2009;54(23):2129–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>
69. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA CH. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821–30.

70. Weisberg SP, Leibel RL, Anthony W, Jr F, Weisberg SP, Mccann D, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808.
71. Cancellato R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54(8):2277–86.
72. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and hemorrheology. *Annu Rev Fluid Mech*. 2005;3:43–69.
73. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the Microcirculation. Vol. 2, Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. 2010. 8–9 p.
74. Levy BI, G. Ambrosio, A.R. Pries, H.A.J. Struijker-Boudier. Microcirculation in hypertension: A new target for treatment? *Circulation*. 2001;104:735–40.
75. Serné EH, De Jongh RT, Eringa EC, IJzerman RG, Stehouwer CDA. Microvascular dysfunction: A potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2007;50(1):204–11.
76. Kessel RG KR. Tissues and organs: A text-atlas of scanning electron microscopy. San Francisco: W.H. Freeman & Co; 1979.
77. Inagami T. Endothelium as an Endocrine Organ. *Annu Rev Physiol*. 1995;57(1):171–89.
78. Laubichler MD, Aird WC, Maienschein J. The Endothelium in History. Cambridge Univ Press. 2009;3–20.
79. Florey, Lord. The Endothelial Cell. *Br Med J*. 1966;2(5512):487.
80. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285–95.
81. Kubes P. Nitric Oxide Affects Microvascular Permeability.
82. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1987;84(24):9265–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.24.9265>
83. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524–6.
84. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2017;250(6):H1145–9.
85. VALLANCE P, COLLIER J, MONCADA S. EFFECTS OF ENDOTHELIUM-DERIVED NITRIC OXIDE ON PERIPHERAL ARTERIOLAR TONE IN MAN. *Lancet*. 1989;
86. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure (L-arginine/hypertension/vascular endothelium/endothelium-derived relaxing factor). *Proc Nati Acad Sci USA [Internet]*. 1989;86(May):3375–8. Available from: <http://www.pnas.org/content/pnas/86/9/3375.full.pdf>
87. RMJ P, DS A, S M. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664–6.
88. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153(3):1251–6.
89. Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Böhme E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca<sup>2+</sup>-

- dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(2):678–85.
90. Maria L, Ana S. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. 1980;
  91. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–37.
  92. Folino A, Losano G, Rastaldo R. Balance of nitric oxide and reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury and protection. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62(6):567–75.
  93. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109–19.
  94. Michel CC, Curry FE. Microvascular Permeability. *Physiol Rev*. 2017;79(3):703–61.
  95. Speel TGW, Bleumer I, Diemont WL, Van der Maas MC, Wijkstra H, Meuleman EJ. Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium. *Ann Biomed Eng*. 2002;30(4):430–46.
  96. SCHNITTLER H-J, WILKE A, GRESS T, DRENCKHAHN, SUTTORP N, DRENCKHAHN D. ROLE OF ACTIN AND MYOSIN IN THE CONTROL OF PARACELLULAR PERMEABILITY IN PIG, RAT AND HUMAN VASCULAR ENDOTHELIUM. *J Physiol*. 1990;431:379–401.
  97. Svensjö E, Arfors KE, Arturson G, Rutili G. The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Ups J Med Sci*. 1978;83(1):71–9.
  98. SMITH F, ROUS P. The gradient of vascular permeability. 1930;(350).
  99. McMASTER PD, PARSONS RJ. PHYSIOLOGICAL CONDITIONS EXISTING IN CONNECTIVE TISSUE. 1938;
  100. Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74(7):787–800.
  101. Tilton RG, Chang KC, Lejeune WS, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(3):689–96.
  102. Ashina K, Tsubosaka Y, Kobayashi K, Omori K, Murata T. VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyper-permeability in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;464(2):590–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.014>
  103. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):262–71.
  104. Joshi AD, Dimitropoulou C, Thangjam G, Snead C, Feldman S, Barabutis N, et al. Heat shock protein 90 inhibitors prevent lps-induced endothelial barrier dysfunction by disrupting Rhoa signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):170–9.
  105. Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: A review of the vascular barrier. *Anaesthesia*. 2014;69(7):777–84.
  106. Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2017;278(4):H1177–85.
  107. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JAE, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2003;285(2):H722–6.
  108. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1541–7.
  109. Duling BR. The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the

- microcirculation. *Microvasc Res.* 1973;5(3):423–9.
110. Fulton GP., Jackson RG., Lutz BR. Cinephotomicroscopy of Normal Blood Circulation in the Cheek Pouch of the Hamster. *Science* (80- ). 1947;105(2727):361–2.
  111. LUTZ HR, FULTON GP. THE USE OF THE HAMSTER CHEEK POUCH FOR THE STUDY OF VASCULAR CHANGES AT THE MICROSCOPIC LEVEL. *Anat Rec.* 1954;120:293.
  112. Svensjö E. The Hamster Cheek Pouch as a Research Model of Inflammation. *Eur Respir J Suppl* [Internet]. 1990;12(November):595s-600s; discussion 600s-601s. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076153>
  113. PRIDDP RE, BRODIE AF. FACIAL MUSCULATURE, NERVES AND BLOOD VESSELS OF THE HAMSTER IN RELATIO S TO THE CHEEK POUCH. *JOURNPL Morphol.* 1948;83(2):149–80.
  114. Manda A. The hamster cheek pouch model for fi eld cancerization studies. 2015;67:292–311.
  115. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2017;250(2):H291–303.
  116. MAJNO G, PALADE GE. STUDIES ON I N F L A M M A T I O N - The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;11(2):571–605.
  117. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002;106(6):640–2.
  118. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(7):1149–60.
  119. Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med.* 1999;107(5):479–87.
  120. Williams SB, Timimi FK, Ting HH, Roddy M-A, Creager MA, Goldfine AB, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation.* 1998;97(17):1695–701.
  121. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009;58(3):718–25.
  122. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob / ob and dietary obese mice . *Am J Physiol Metab.* 2007;293(4):E1118–28.
  123. Kundumani-Sridharan V, Dyukova E, Hansen DE, Rao GN. 12/15-Lipoxygenase mediates high-fat diet-induced endothelial tight junction disruption and monocyte transmigration: A new role for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in endothelial cell dysfunction. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15830–42.
  124. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168–75.
  125. Spolidoro M, Baroncelli L, Putignano E, Maya-Vetencourt JF, Viegi A, Maffei L. Food restriction enhances visual cortex plasticity in adulthood. *Nat Commun.* 2011;2(1).
  126. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(47):16647–53.
  127. Casazza K, Bohan Brown MM, Smith Jr. DL, Allison DB, Fontaine KR, Durant N, et al. Myths, presumptions, and facts about obesity. *N Engl J Med.* 2013;368(5):446–54.
  128. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem.* 2005;16(3):129–37.

129. Anton S, Leeuwenburgh C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Exp Gerontol* [Internet]. 2013;48(10):1003–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.04.011>
130. Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: Studies in rodents and primates. *Toxicol Pathol*. 1996;24(6):742–5.
131. Weindruch R, Kayo T, Cheol-Koo L, Prolla T. Microarray Profiling of Gene Expression in Aging and Its Alteration by Caloric Restriction in Mice. *J Nutr*. 2001;131(3):S918.
132. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. *Science* (80- ) [Internet]. 2010;328(5976):321–6. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/328/5976/321.abstract>
133. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(9 SPEC. ISS.):913–22.
134. Masoro E, Ph D. Dietary Restriction. 1993;994–9.
135. Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of Brain Aging and Neurodegenerative Disorders by Genes, Diet, and Behavior. *Physiol Rev*. 2002;82(3):637–72.
136. Gonidakis S, Finkel SE, Longo VD. Genome-wide screen identifies *Escherichia coli* TCA cyclerelevant mutants with extended chronological lifespan dependent on acetate metabolism and the hypoxia-inducible transcription factor ArcA. *Aging Cell*. 2010;9(5):868–881.
137. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J VT. Annual Deaths Attributable to Obesity in the United States, Original Contribution. *J a M a*. 1999;282(16):1530–8.
138. Analysis a L. Article Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy : *Ann Intern Med*. 1990;(17).
139. Lean MEJ, Powrie JK, Anderson AS, Garthwaite PH. Obesity, Weight Loss and Prognosis in Type 2 Diabetes. *Diabet Med*. 1990;7(3):228–33.
140. Sundfør TM, Svendsen M, Tonstad S. Effect of intermittent versus continuous energy restriction on weight loss, maintenance and cardiometabolic risk: A randomized 1-year trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2018;28(7):698–706. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.03.009>
141. Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD. Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. *Obes Rev*. 2013;14(1):2–18.
142. Benton D, Young HA. A meta-analysis of the relationship between brain dopamine receptors and obesity: A matter of changes in behavior rather than food addiction. *Int J Obes* [Internet]. 2016;40(S1):S12–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2016.9>
143. Carlier N, Marshe VS, Cmorejova J, Davis C, Müller DJ. Genetic Similarities between Compulsive Overeating and Addiction Phenotypes: A Case for “Food Addiction”? *Curr Psychiatry Rep*. 2015;17(12).
144. Volkow ND, Wang G-J, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011;15(1):37–46.
145. Greenway FL. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *Int J Obes* [Internet]. 2015;39(8):1188–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2015.59>
146. Medsker B, Forno E, Simhan H, Juan C, Sciences R. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function *Martin*. 2016;70(12):773–9.
147. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J*

- Neurosci. 2009;29(2):359–70.
148. Thaler JP, Tschöp MH, Michael W, Thaler JP, Yi C, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans Find the latest version : Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012;122(1):153–62.
  149. García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Argente J, Chowen JA. Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol Metab*. 2012;1(1–2):37–46.
  150. Jastroch M, Morin S, Tschöp MH, Yi CX. The hypothalamic neural-glia network and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2014;28(5):661–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2014.02.002>
  151. Miles L. Physical activity and health. 2007;314–63.
  152. Denipoti CH, Hernandez L, Moraes SMF de. Angiogênese E Exercício. *Arq do Mus Dinâmico Interdiscip*. 2006;10(2):17–22.
  153. Boa BCS, Souza MDGC, Leite RD, Da Silva S V., Barja-Fidalgo TC, Kraemer-Aguiar LG, et al. Chronic aerobic exercise associated to dietary modification improve endothelial function and eNOS expression in high fat fed hamsters. *PLoS One*. 2014;9(7):1–10.
  154. Whyte JJ, Laughlin MH. The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199(4):441–50.
  155. Padilla J, Fadel PJ. Prolonged sitting leg vasculopathy: contributing factors and clinical implications. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2017;313(4):H722–8.
  156. Morishima T, Restaino RM, Walsh LK, Kanaley JA, Fadel PJ, Padilla J. Prolonged sitting-induced leg endothelial dysfunction is prevented by fidgeting. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2016;311(1):H177–82.
  157. Jussila L, Alitalo K. Vascular Growth Factors and Lymphangiogenesis. 2002;673–700.
  158. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J American Physiol Soc*. 1984;56(4):831–8.
  159. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* [Internet]. 1991;71(2):541–85. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1991.71.2.541>
  160. Fang J, Tang M. Exercise improves high fat diet-impaired vascular function. *Biomed Reports*. 2017;7(4):337–42.
  161. Park S-Y, Rossman MJ, Gifford JR, Bharath LP, Bauersachs J, Richardson RS, et al. Exercise training improves vascular mitochondrial function. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2016;310(7):H821–9.
  162. Abreu P, Leal-Cardoso JH, Ceccatto VM. ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO AO EXERCÍCIO FÍSICO: CONSIDERAÇÕES MOLECULARES E ENERGÉTICAS. *Rev Bras Med do Esporte*. 2017;23(1):60–5.
  163. Newcomer SC, Thijssen DHJ, Green DJ. Effects of exercise on endothelium and endothelium/smooth muscle cross talk: role of exercise-induced hemodynamics. *J Appl Physiol*. 2011;111(1):311–20.
  164. Vasconcellos F, Seabra A, Katzmarzyk PT, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E, Farinatti P. Physical activity in overweight and obese adolescents: Systematic review of the effects on physical fitness components and cardiovascular risk factors. *Sport Med*. 2014;44(8):1139–52.
  165. Smith AG, Muscat GEO. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: Implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10 SPEC. ISS.):2047–63.
  166. Metkus TS, Baughman KL, Thompson PD. Exercise Prescription and Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2010;121:2601–4.

167. ANSON JOANEM, REENLAND PG, CROIX AZLA, STEFANICK ML, MOUTON CP, OBERMAN A, et al. WALKING COMPARED WITH VIGOROUS EXERCISE FOR THE PREVENTION OF CARDIOVASCULAR EVENTS IN WOMEN. *N Engl J Med*. 2002;347(10):716–25.
168. Tanascescu M, Leitzmann MF, Rimm E, Willet W, Stampfer M HF. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA*. 2000; 288 (16): 1994–2000. *Jama*. 2000;288(16).
169. Sesso HD, Paffenbarger RS, Lee I-M. Physical Activity and Coronary Heart Disease in Men. *Circulation*. 2012;102(9):975–80.
170. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: Updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1423–34.
171. Thompson PD, Buchner D, Piña IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: A statement from the council on clinical cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the council on nutrition, physical. *Circulation*. 2003;107(24):3109–16.
172. Matsudo VKR, Matsudo SMM. Atividade física no tratamento da obesidade. *Einstein*. 2006;1:29–43.
173. Coutinho SR, Halset EH, Gåsbakk S, Rehfeld JF, Kulseng B, Truby H, et al. Compensatory mechanisms activated with intermittent energy restriction: A randomized control trial. *Clin Nutr*. 2018;37(3):815–23.
174. Reed JL, Chaput JP, Tremblay A, Doucet É. The Maintenance of Energy Balance Is Compromised after Weight Loss. *Can J Diabetes [Internet]*. 2013;37(2):121–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.03.022>
175. Ochner CN, Barrios DM, Lee CD, Pi-Sunyer FX. Biological Mechanisms that Promote Weight Regain Following Weight Loss in Obese Humans. *Physiol Behav*. 2013;0:106–13.
176. MacLean PS, Bergouignan A, Cornier M-A, Jackman MR. Biology’s response to dieting: the impetus for weight regain. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2011;301(3):R581–600.
177. Harvie MN, Pegington M, Mattson MP, Frystyk J, Dillon B, Evans G, et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: A randomized trial in young overweight women. *Int J Obes [Internet]*. 2011;35(5):714–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.171>
178. Ortner Hadžiabdić M, Mucalo I, Hrabač P, Matić T, Rahelić D, Božikov V. Factors predictive of drop-out and weight loss success in weight management of obese patients. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28(s2):24–32.
179. &NA; Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *J Occup Environ Med*. 1996;38(7):662.
180. Menozzi R, Bondi M, Baldini A, Venneri MG, Velardo A, Del Rio G. Resting metabolic rate, fat-free mass and catecholamine excretion during weight loss in female obese patients. *Br J Nutr*. 2000;84(4):515–20.
181. Ballor DL, Harvey-Berino JR, Ades PA, Cryan J, Calles-Escandon J. Decrease in fat oxidation following a meal in weight-reduced individuals: A possible mechanism for weight recidivism. *Metabolism*. 1996;45(2):174–8.
182. Cornier MA. Is your brain to blame for weight regain? *Physiol Behav [Internet]*. 2011;104(4):608–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.003>
183. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *Nutr*

- Clin Metab. 2002;16(3):219–20.
184. T.C. A, J. J, M.S. W-P. Decreased glucagon-like peptide 1 release after weight loss in overweight/obese subjects. *Obes Res* [Internet]. 2005;13(4):710–6. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L41833521%5Cnhttp://zc6sj2ch8l.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=10717323&id=doi:&atitle=Decreased+glucagon-like+peptide+1+release+after+weight+loss+in+overweight/obese+sub>
  185. Doucet É, Cameron J. Appetite control after weight loss: what is the role of bloodborne peptides? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(3):523–32.
  186. Collier R. Intermittent fasting: the science of going without. *CMAJ*. 2013;185(9):363–4.
  187. Collier R. Intermittent fasting: the next big weight loss fad. *CMAJ*. 2013;185(8):321–2.
  188. Catenacci VA, Zhaoxing Pan, Ostendorf D, Brannon S, Gozansky WS, Mattson MP, et al. A randomized pilot study comparing zero-calorie alternate-day fasting to daily caloric restriction in adults with obesity. *Obes (Silver Spring)*. 2016;24(9):1874–1883.
  189. Varady KA. Intermittent versus daily calorie restriction: Which diet regimen is more effective for weight loss? *Obes Rev*. 2011;12(7):593–601.
  190. Stockman MC, Thomas D, Burke J, Apovian CM. Intermittent Fasting: Is the Wait Worth the Weight? *Curr Obes Rep*. 2018;7(2):172–85.
  191. Ravussin E, Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD. Alternate-day fasting in nonobese subjects: Effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1):69–73.
  192. Byrne NM, Sainsbury A, King NA, Hills AP, Wood RE. Intermittent energy restriction improves weight loss efficiency in obese men: The MATADOR study. *Int J Obes* [Internet]. 2018;42(2):129–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.206>
  193. Mattson MP, Iyun T, Rios M, Ingram DK, Hagepanos A, Anson RM, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(10):6216–20.
  194. Castello L, Froio T, Maina M, Cavallini G, Biasi F, Leonarduzzi G, et al. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-kB activation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;48(1):47–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.003>
  195. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Komatsu M, Tanaka K, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131–5.
  196. Wan R, Ahmet I, Brown M, Cheng A, Kamimura N, Talan M, et al. Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2010;21(5):413–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.020>
  197. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489(7415):242–9.
  198. Stote KS, Baer DJ, Spears K, Paul DR, Keith Harris G, Rumpler W V, et al. A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults. 2007;85(4):981–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2645638/pdf/nihms45606.pdf>
  199. Gabel K, Hoddy KK, Haggerty N, Song J, Kroeger CM, Trepanowski JF, et al. Effects of 8-hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study. *Nutr Heal Aging*. 2018;4(4):345–53.
  200. Kashiwaya Y, Bergman C, Lee J-H, Wan R, King MT, Mughal MR, et al. A ketone



- ester diet exhibits anxiolytic and cognition-sparing properties, and lessens amyloid and tau pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(6):1530–9.
201. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *YTrends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014;25(1):42–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-28782-1.00061-7>
  202. Costa RRS, Villela NR, Souza M das GC, Boa BCS, Cyrino FZGA, Silva S V., et al. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc Res* [Internet]. 2011;82(3):416–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2011.08.007>
  203. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334–59.
  204. Marzuca-nassr GN, Fernando K, Aur M, Hermano C, Newsholme P, Curi R. Housekeeping proteins : How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models ? *lio Salom a*. 2016;504:38–40.
  205. N H Persson, M Erlansson, E Svensjö, R Takolander DB. The hamster cheek pouch-- an experimental model to study postischemic macromolecular permeability. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1985;4(3):257–63.
  206. Bouskela, Eliete and WG. Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions. *Am J Physiol*. 1992;262(31):478–85.
  207. Conceicao F, Conde C, Svensjo E, Bottino D, Bouskela E. Preconditioning of the response to ischemia/reperfusion-induced plasma leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Clinics*. 2012;67(8):923–9.
  208. WHO. WHO. 2017. p. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ob>.
  209. Ouchi, Noriyuki; Parker, Jennifer; Lugus, Jesse; Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. 2012;11(2):85–97.
  210. Salim Yusuf, Steven Hawken, Stephanie Ôunpuu, Tony Dans, Alvaro Avezum, Fernando Lanas, Matthew McQueen, Andrzej Budaj PP, John Varigos LL. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937–952.
  211. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288–98.
  212. MacMahon S, Baigent C, Duffy S, Rodgers A, Tominaga S, Chambless L, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* [Internet]. 2009;373(9669):1083–96. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60318-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60318-4)
  213. Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012;33(2):173–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2011.203>
  214. Article R. Animal models in metabolic syndrome. 45(5):1–10.
  215. Pedrosa DF, Fisiológicas C, Fisiológicas C. EFEITOS BENÉFICOS DO ESTROGÊNIO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR. :190–6.
  216. Ganesan K, Habboush Y, Sultan S. Intermittent Fasting : The Choice for a Healthier Lifestyle Methods. 2018;10(7).
  217. Varady KA, Bhutani S, Church EC, Klempel MC. Short-term modified alternate-day fasting : a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults 1 – 3. 2009;1138–43.
  218. Chausse B, Solon C, Caldeira CC, Masselli IG, Manchado-gobatto FB, Gobatto CA, et

- al. Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency , Low Body Mass and Overeating. 2014;155(July):2456–66.
219. Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kr N, et al. Modulatory role of food , feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. 2005;76:1553–73.
  220. Anson RM, Guo Z, Cabo R De, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. 2003;
  221. Beck B, Beck B, Poincare H. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. 2006;(July).
  222. Gotthardt JD, Verpeut JL, Yeomans BL, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA, et al. Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. 2016;157(February):679–91.
  223. Hariri N, Thibault L, Hariri N, Thibault L. High - fat diet - induced obesity in animal models High-fat diet-induced obesity in animal models Nutrition Research Reviews. 2012;(October 2010).
  224. Shao A, Campbell WW, Chen CO, Mittendorfer B, Rivas DA, Griffiths JC. The emerging global phenomenon of sarcopenic obesity : Role of functional foods ; a conference report q. J Funct Foods [Internet]. 2017;33:244–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.048>
  225. Corcoran MP, Lamon-fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance : effect of dietary fatty acids and exercise 1 – 3. 2007;662–77.
  226. Degens H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. 2010;28–38.
  227. Kemp JG, Blazev R, Stephenson DG, Stephenson GMM. Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese ( ob / ob ) mouse. 2009;831–41.
  228. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles , exercise and obesity : skeletal muscle. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2012;8(8):457–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>
  229. S P, E. H. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e desempenho. 2009. 646 p.
  230. CASPERSEN CJ, POWELL KE, CHRISTENSON GM. Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research. Public Health Rep. 1985;100(2):126–31.
  231. Jaspers RT, Zillikens MC, Friesema ECH, Delli Paoli G, Bloch W, Uitterlinden AG, et al. Exercise, fasting, and mimetics: Toward beneficial combinations? FASEB J. 2017;31(1):14–28.
  232. Taylor SI. Deconstructing Type 2 Diabetes. Cell. 1999;97:9–12.
  233. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. Rev Physiol Biochem Pharmacol [Internet]. 2003;159–216. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10254-002-0004-7>
  234. Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. 2020;495–504.
  235. Levin BE, Dunn-meynell AA, Barry E, Chronic AAD. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. 2020;1095:771–8.
  236. Levin BE, Dunn-meynell AA. Differential effects of exercise on body weight gain and adiposity in obesity-prone and -resistant rats. 2006;(January):722–7.
  237. Wewege M, Berg R Van Den, Ward RE, Keech A. The effects of high-intensity

- interval training vs . moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults : a systematic review and meta-analysis. 2017;(June):635–46.
238. Little JP, Safdar A, Benton CR, Wright DC. Skeletal muscle and beyond : the role of exercise as a mediator of systemic mitochondrial biogenesis. 2011;607:598–607.
  239. Bhutani S, Klempel MC, Kroeger CM, Trepanowski JF, Varady KA. Alternate Day Fasting and Endurance Exercise Combine to Reduce Body Weight and Favorably Alter Plasma Lipids in Obese Humans. 2013;21(7).
  240. Tinsley GM, Bounty PM La. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. 2015;73(10):661–74.
  241. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2010;10(4):306–15.
  242. Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J*. 2009;276(20):5738–46.
  243. Ye J. Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Obes*. 2009;33(1):54–66.
  244. Matyi S, Jackson J, Garrett K, Deepa SS, Unnikrishnan A. The effect of different levels of dietary restriction on glucose homeostasis and metabolic memory. 2018;139–49.
  245. Lucı M, Gallardo N, Alvarez C, Pe C, Escriva F, Ros M. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats : role of adiposity. 1997;131–41.
  246. Cameron KM, Miwa S, Walker C, Zglinicki T Von. Male mice retain a metabolic memory of improved glucose tolerance induced during adult onset , short-term dietary restriction. 2012;1–9.
  247. Selman C, Hempenstall S. Evidence of a metabolic memory to early-life dietary restriction in male C57BL / 6 mice. 2012;1–11.
  248. Mitchell SJ, Madrigal-matute J, Scheibye-knudsen M, Ingram DK, Bernier M, Cabo R De, et al. Effects of Sex , Strain , and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice Article Effects of Sex , Strain , and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. 2016;1093–112.
  249. Effect of Calorie Restriction With or Without Exercise on Insulin Sensitivity ,  $\beta$ -Cell Function , Fat Cell Size , and Ectopic. 2006;29(6).
  250. Frisbee JC. Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *Microcirculation*. 2005;12(5):383–92.
  251. Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, et al. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*. 2009;58(1):95–103.
  252. Gavin TP. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans. *J Appl Physiol*. 2004;98(1):315–21.
  253. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(10):4963–71.
  254. Meininger CJ, Cai S, Parker JL, Channon KM, Kelly KA, Becker EJ, et al. GTP cyclohydrolase I gene transfer reverses tetrahydrobiopterin deficiency and increases nitric oxide synthesis in endothelial cells and isolated vessels from diabetic rats. *FASEB J*. 2004;17(1):1–17.
  255. Koppenol H, Koppenol H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. 2019;(73).
  256. Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker’s yeast fuel advances in biomedical research. *Proc*

- Natl Acad Sci. 2017;114(2):201–5.
257. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, Murphy J, Ma X, Rohatgi N, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*. 2017;13(11):1952–68.
  258. Heindl B, Kupatt C. Endothelial function and hemostasis. 2000;167:160–7.
  259. Olsson Y, Svensjö E, Arfors KE, Hultström D. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropathol*. 1975;33(1):45–50.
  260. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004;70:71–86.
  261. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol* [Internet]. 2000;190(3):255–66. Available from: DL Carden, DN Granger - The Journal of pathology, 2000 - Wiley Online Library
  262. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2010;(March):1–23.
  263. Rodrigues SF, Granger DN. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):291–9.
  264. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MCL, Cooper MA. Neutrophils - A key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2013;40(6):463–70.
  265. Dakak N, Husain S, Mulcahy D, Andrews NP, Panza JA, Waclawi M, et al. Contribution of nitric oxide to reactive hyperemia impact of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 1998;32(1):9–15.
  266. Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic Value of Systemic Endothelial Dysfunction in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2004;110(14):1926–32.
  267. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117–32.
  268. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* [Internet]. 2009;84(21–22):705–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.026>
  269. Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD, et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(5):665–74.
  270. Kubes P, Granger DN, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. 2020;
  271. Bhutani S, Hoddy KK, Gabel K, Freels S, Rigdon J, Rood J, et al. Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults. *JAMA Intern Med*. 2018;177(7):930–8.