

Universidade Federal do Rio de Janeiro

EFEITO DA ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE E DO TREINAMENTO
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE A PERFORMANCE, O
METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE RATOS WISTAR

Everton Luis dos Santos Cardoso

2023



EFEITO DA ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE E DO TREINAMENTO
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE A PERFORMANCE, O
METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE RATOS WISTAR

Everton Luis dos Santos Cardoso

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Endocrinologia (Medicina), da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientadores: Mario Vaisman
Verônica Salerno Pinto

Rio de Janeiro
Agosto de 2023

Cardoso, Everton Luis dos Santos

Efeito da alimentação intermitente e do treinamento intervalado de alta intensidade sobre a performance, o metabolismo do tecido adiposo branco o comportamento alimentar de ratos wistar. / Everton Luis dos Santos Cardoso. – Rio de Janeiro: UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2023.

61 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Mario Vasman e Verônica Salerno Pinto

Tese (doutorado) – UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia), 2023.

Referências: f. 54-60.

1. Obesidade. 2. Comportamento Sedentário. 3. Treinamento Intervalado de Alta Intensidade. 4. Jejum Intermitente. 5. Endocrinologia – Tese. I. Vasman, Mario. II. Pinto, Verônica Salerno. III. UFRJ, CCS, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia). IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Andreia de Oliveira Paim CRB - 7/5183

EFEITO DA ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE E DO TREINAMENTO
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE A PERFORMANCE, O
METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE RATOS WISTAR

Everton Luis dos Santos Cardoso

Orientadores: Mario Vaisman
Verônica Salerno Pinto

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Endocrinologia (Medicina), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado por:

Prof. Dr^a. Alice Dutra Violante

Prof. Dr. Tiago Veltri

Prof. Dr^a Miriam Raquel Meira Mainenti

Prof. Dr^a Luciane Barcellos

Prof. Dr^a. Melanie Rodacki

Rio de Janeiro
Agosto de 2023

*“Você pode me disparar com suas palavras,
pode me cortar com seus olhos,
pode me matar com seu ódio,
mas, ainda assim, como o ar,
eu me levantarei.
(Maya Angelou)*

Agradecimentos

Agradeço, sempre em primeiro lugar aos Orixás e Guias Espirituais, por sempre me orientarem e concederem as oportunidades ímpares em minha vida. Em segundo, agradeço à minha família, já não tenho a maioria deles nesse plano espiritual, mas sinto sempre a presença, o amor e agradeço a todos os ensinamentos desde sempre.

Agradeço ao meu orientador Mario Vaisman pela oportunidade de realizar o meu doutorado sob a sua orientação em um programa de excelência acadêmica.

Esse ano completo 10 anos de LaBEMMol, ao lado da minha querida amiga/orientadora Verônica Salerno. Com ela eu aprendi o que significa “dar aula”, ela sempre foi meu maior exemplo e sempre tive muito orgulho de fazer parte desse grupo, que se tornou minha família também, depois de tanto tempo, rimos juntos, aprendemos juntos, brigamos juntos e seguimos em frente, sempre acreditando na ciência e nas potências de cada integrante. Obrigado Vê.

Agradeço muito a minha amiga/irmã Thalita Ponce, em especial nesse último e tão difícil ano, ela esteve sempre presente, colocando muitas vezes suas dores de lado para ouvir as minhas. Tenho tanto orgulho de você, da grande pesquisadora que se tornou e fico muito honrado em fazer parte da sua jornada também.

Agradeço a todos os alunos que tive o prazer de orientar ao longo desses anos de doutorado, eles me mostraram onde meu coração reside, em especial meus dois primeiros, que hoje traçam brilhantes caminhos na ciência, Iordan e Raimundo, sem vocês, esse projeto não teria acontecido.

Meu muito obrigado aos amigos do laboratório, muitos de vocês tiveram participação fundamental nessa conclusão, Michele e Camili ao longo dos cuidados com os animais, Fabio com as ideias e ajuda fundamental na produção do artigo, Marcelo na sua incessante luta para que conseguíssemos melhores resultados, infelizmente a Pandemia não permitiu, mas você foi fundamental. Diego, Vitor, Rafael e todos os demais, obrigado pelos ensinamentos, conversas e até mesmo os cafezinhos, que sempre fizeram parte de nosso dia a dia.

Quero agradecer aos meus amigos de longa data, sem vocês ao meu lado, mesmo que virtualmente, eu não teria conseguido.

Registro também, o meu agradecimento aos membros componentes da banca, prof. Dra^a Miriam Mainenti, prof. Dr^a Luciane Barcelos, prof Dr^a Alice Dutra, prof. Dr^a. Melanie Rodacki e o prof. Dr Tiago Veltri, pelo aceite e por toda a colaboração nessa etapa tão importante.

Resumo

Introdução: O sedentarismo e a alta ingestão calórica contribuem com o aumento das taxas de obesidade mundial e a literatura tem buscado alternativas não-medicamentosas para auxiliar no combate à essa epidemia. Nesse cenário, o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) e a alimentação intermitente (AI) surgem como possíveis aliados com resultados expressivos quando observados isoladamente. O presente estudo, tem como objetivo observar a interação desses dois protocolos e os seus efeitos sobre a *performance* de nado, a morfologia e a bioquímica de adipócitos, bem como o comportamento alimentar de ratos Wistar machos.

Metodologia: Foram utilizados 74 ratos Wistar machos com 60 dias de idade, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: (C) controle sedentário, (EX) controle exercitado, (AI) alimentação intermitente e (AIEX) alimentação intermitente + exercício. Os grupos foram submetidos a 8 semanas de tratamento. Foram analisados a capacidade máxima de nado, o comportamento alimentar, a morfologia e marcadores bioquímicos dos adipócitos.

Resultados: Os grupos que realizaram treinamento apresentaram maior tempo de nado na comparação entre grupos no teste final, contudo, somente o grupo AIEX apresentou melhor *performance* de nado quando comparado ao seu momento inicial (Antes: AIEX: 134.15 ± 25.49 s; Depois: AIEX: 168.5 ± 46.22 s). Como esperado, o grupo AI desenvolveu comportamento hiperfágico e apesar do treinamento sozinho ter atenuado a ingestão alimentar, quando associado a alimentação intermitente, esse benefício foi perdido (C: 9.22 g ± 1.98; EX: 6.44 g ± 1.74; AI: 15.11 g ± 2.71; AIEX: 13.55 g ± 3.24). Os grupos exercitados apresentaram uma maior quantidade de células adiposas na mesma área (C: 306.75 ± 57.86; EX: 733 ± 102.37; AI: 404.25 ± 21.17; AIEX: 809.5 ± 178.09), além disso, os grupos exercitados, sobretudo o AIEX apresentaram maior marcação (CD31) para formação de vasos (C: 0.0162 ± 0.001; EX: 0.032 ± 0.003; AI: 0.0147 ± 0.002; AIEX: 0.0647 ± 0.009). A quantificação de UCP1 foi maior nos grupos exercitados, sobretudo no grupo AIEX.

Conclusão: O treinamento tem um impacto significativo no aumento da *performance* de nado bem como na morfologia e bioquímica dos adipócitos. A

associação entre AI e exercício apresenta um efeito potencializador desses achados. O HIIT induziu ao processo de *Browning*, o qual foi determinado pelo aumento da angiogênese e dos níveis de UCP1. Este processo também foi potencializado pela associação entre os protocolos. O comportamento alimentar foi alterado pela AI e atenuado pelo HIIT, contudo a associação entre os dois protocolos não reduziu a hiperfagia.

Abstract

Introduction: The sedentary lifestyle and high caloric intake contribute to the increase in obesity rates worldwide and literature has sought non-medicinal alternatives to help combat this epidemic. In this scenario, high-intensity interval training (HIIT) and intermittent feeding (AI) emerge as possible allies with significant results when observed separately. The present study aims to observe the interaction of these two protocols and their effects on the swimming performance, morphology, and biochemistry of adipocytes, as well as the feeding behavior of Wistar male rats.

Methodology: For the study, 74 Wistar male rats aged 60 days were used and randomly divided into 4 experimental groups: (C) sedentary control, (EX) exercised control, (AI) intermittent feeding, and (AIEX) intermittent feeding + exercise. The groups underwent 8 weeks of treatment, depending on the assigned group. Maximal swimming capacity, feeding behavior, adipocyte morphology, and also their biochemistry markers were analyzed.

Results: The groups that performed training showed longer swimming time in the comparison between groups in the final test, however, only the AIEX group showed better swimming performance when compared to its initial time (Before: AIEX: 134.15 ± 25.49 s; After: AIEX: 168.5 ± 46.22 s). As expected, the AI group developed hyperphagic behavior and although training alone attenuated food intake, when associated with intermittent feeding, this benefit was lost (C: $9.22 \text{ g} \pm 1.98$; EX: $6.44 \text{ g} \pm 1.74$; AI: $15.11 \text{ g} \pm 2.71$; AIEX: $13.55 \text{ g} \pm 3.24$). The exercised groups showed a greater amount of fat cells in the same area (C: 306.75 ± 57.86 ; EX: 733 ± 102.37 ; AI: 404.25 ± 21.17 ; AIEX: 809.5 ± 178.09), moreover, the exercised groups, especially AIEX that showed greater marking of vessel formation (C: 0.0162 ± 0.001 ; EX: 0.032 ± 0.003 ; AI: 0.0147 ± 0.002 ; AIEX: 0.0647 ± 0.009). The level of UCP1 was quantified and the exercised groups showed higher levels of this protein, especially the AIEX group.

Conclusion: Training has a significant impact on swimming performance increase as well as on the morphology and biochemistry of adipocytes. The association between AI and exercise has a potentiating effect on these findings. HIIT induced the *browning* process, which was determined by increased

angiogenesis and UCP1 levels. This process was also enhanced by the association between the protocols. Eating behavior was altered by AI and attenuated by HIIT, however the association between the two protocols did not reduce hyperphagia.

Lista de Abreviações

AgRP: proteína relacionada à agouti

AI: alimentação intermitente

ALEX: alimentação intermitente + exercício

AKT: proteína quinase B

ARC: núcleo arqueado do hipotálamo

C: controle sedentário

CART: transcrição regulada por cocaína e anfetamina

CD31: cluster de diferenciação 31

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

COX: ciclooxigenase

COX IV: ciclooxigenase subunidade IV

COX X: ciclooxigenase subunidade X

CREB: proteína de ligação em resposta ao AMP cíclico

DAB: diamino benzidina

DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo

EX: controle exercitado

FIT1: receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade (*High Intensity Interval Training*)

IMC: índice de massa corporal

JAK: janus quinase

KDR: receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

LHA: área lateral do hipotálamo

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NPY: neuropeptídeo Y

NRF1: fator respiratório nuclear 1

PECAM1: molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PFA: paraformaldeído

PGC1 α : coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo

POMC: proopiomelanocortina

PRMD-16: domínio PR contendo 16

PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico

RC: restrição calórica

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SIRT1: sirtuína 1

STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

Tie-1: tirosina quinase com “tipo imunoglobulina” com “tipo EGF domínio 1”

Tie-2: tirosina quinase com “tipo imunoglobulina” com “tipo EGF domínio 2”

Tris-EDTA: trisaminometano com ácido edetético

UCP-1: proteína desacopladora 1

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VMH: núcleo ventromedial hipotalâmico

VO₂max: consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Exercício e treinamento	17
1.2 Restrição calórica e alimentação intermitente	20
1.3 O tecido adiposo	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4 ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 Amostra e protocolo de alimentação intermitente	34
5.2 Treinamento intervalado de alta intensidade e teste de <i>performance</i>	35
5.3 Coleta de tecidos	36
5.4 Consumo alimentar e hiperfagia	36
5.5 RT-PCR e neurotransmissores orexigênico e anorexigênico	36
5.6 Histologia e imunohistoquímica	37
5.6.1 Processamento histológico	37
5.6.2 Técnica de H&E	38
5.6.3 Imunohistoquímica	39
5.6.4 Quantificação de vasos	40
5.6.5 Quantificação da área dos adipócitos	40
5.6.6 Análise qualitativa de UCP1	40
5.7 Análises estatísticas	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
Referências Bibliográficas	55
Anexos	62

Índice de Ilustrações

Figura 1 - Curva de sobrevivência de ratos.....	21
Figura 2 – Alvos hipotalâmicos da leptina, grelina e insulina.....	24
Figura 3 - Vias sinalização das adipocinas.....	26
Figura 4 - Os diferentes tipos de tecido adiposo.	27
Figura 5 - Sistema de transporte da UCP1.....	28
Figura 6 - Ativação da termogênese dependente de UCP1.	29
Figura 7 - Desenho Experimental.....	35
Tabela 1: Efeito do Treinamento na Performance.....	18
Tabela 2: Sequência de Primers	37
Equação 1 - Cálculo da quantificação de vasos.....	40

1 INTRODUÇÃO

A inatividade física é considerada um dos males da atualidade bem como um dos fatores responsáveis pelo surgimento de diversas doenças crônicas, como por exemplo: obesidade, hipertensão, diabetes, doenças articulares, dentre outras (WARBURTON; NICOL; BREDIN, 2006). Sendo a obesidade classificada como uma doença crônica não transmissível, atualmente, é considerada epidemia global, capaz de aumentar em 20 a 30% o risco de morte em adultos. Além disso, a obesidade representa um gasto importante aos cofres públicos com despesas em tratamentos às suas comorbidades (CATENACCI; HILL; WYATT, 2009).

Somente no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, existe uma prevalência de pessoas obesas na faixa 22,4% da população, 47,2% dos brasileiros possuem uma prática insuficiente de atividades físicas e 14,9% da população encontra-se em inatividade física. Apesar de ter se mantido estável nos últimos anos, o Brasil apresenta um aumento de 60% de prevalência da obesidade na população nos últimos dez anos (“Vigitel Brasil 2006-2020”, “Vigitel Brasil 2021”).

Frente a esse quadro de epidemia global, faz-se necessário a criação de estratégias eficientes para o enfrentamento da obesidade. Uma das estratégias que está bem consolidada na literatura é a prática regular de exercícios físicos. Prestigiadas instituições como a World Health Organization recomendam, para pessoas adultas, a prática de ao menos 150 a 300 minutos de atividade aeróbica de intensidade moderada ou 75 a 150 minutos de atividade aeróbica intensa por semana e além disso, a redução do tempo gasto em inatividade, com a finalidade de manutenção de um perfil de vida saudável (GARBER et al., 2011; WHO, 2010).

Sabendo-se que a prática de exercícios é de importância fundamental na manutenção da saúde (ASCENSÃO; FERREIRA; MAGALHÃES, 2007), um programa de treinamento regular pode contribuir para a redução do peso corporal e o controle de outros fatores de risco, como por exemplo, glicemia alterada, hipertensão sistêmica e dislipidemia. Fatores como intensidade, tipo e

volume do exercício proposto são de extrema importância para que se alcance os benefícios relatados (VANHEES et al., 2012).

1.1 Exercício e treinamento

Atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos e que envolva um gasto energético acima do basal. Por outro lado, o exercício físico se caracteriza pela aplicação da atividade física de forma planejada, estruturada e repetitiva, com o objetivo de melhora da aptidão física (FLETCHER et al., 1996). Quando o exercício é praticado de forma planejada e consecutiva, é chamado de treinamento e o mesmo pode ser classificado de diferentes maneiras a depender dos objetivos propostos. Além disso, é possível ainda outras subdivisões com base na duração e intensidade (WINTER; FOWLER, 2009).

Dentre os métodos de treinamento capazes de promover melhoras significativas na capacidade cardiorrespiratória e nos indicadores de *performance*, o *endurance* ou treinamento contínuo é aquele estudado há mais tempo e que comprovadamente promove adaptações positivas nos indicadores supracitados (MILANOVIĆ; SPORIŠ; WESTON, 2015; SHARMA et al., 2013). De forma simplificada, podemos definir o *endurance* como eventos com duração entre 5 e 240 minutos e que apresentem intensidade entre 65 e 100% do VO_2max (JONES; CARTER, 2000).

A literatura mostra que um protocolo de *endurance* conduzido por apenas duas semanas em homens saudáveis é capaz de gerar importantes adaptações como o aumento da *performance* dos sujeitos envolvidos. Este fato, segundo Gibala et al. (2006), se dá em função de alterações positivas no metabolismo oxidativo do músculo esquelético, com melhora significativa da função mitocondrial vista pelo aumento da atividade da COX e também do aumento do conteúdo proteico das subunidades COX X e COX IV.

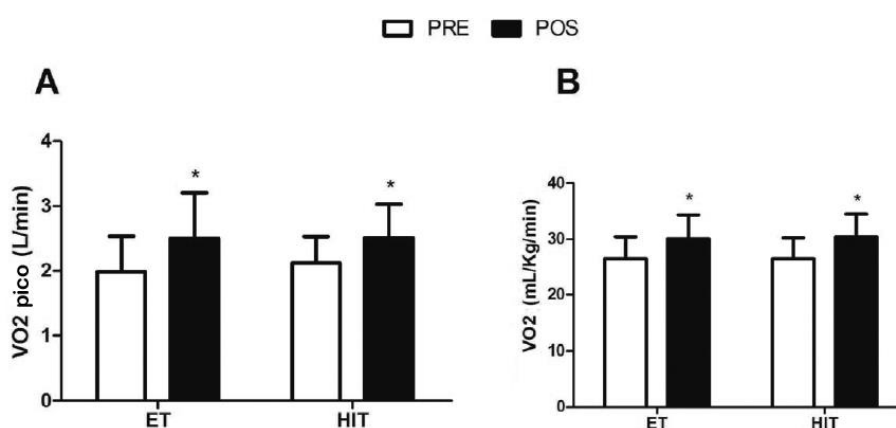
Apesar dos diversos benefícios apontados pela prática regular de exercícios físicos, uma das principais barreiras à aderência a um programa de exercícios, tanto para pessoas inativas quanto àquelas que já se exercitam regularmente é a falta de tempo (HASAN; SHARIF; JAHAN, 2023). Uma das formas de sobrepujar essas barreiras se dá a partir da utilização de modelos de

treinamento que apesar de apresentarem menor volume total, e com isso, menor tempo de execução, ainda apresentem resultados equivalentes aos modelos de maior volume e duração. Dentre esses modelos, o Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT), foi o que mais se popularizou entre os praticantes (GIBALA; JONES, 2013).

Diversos protocolos de HIIT veem sendo utilizados na literatura, sendo que o mais difundido foi proposto por Tabata et al. (1996) e consiste na utilização de um estímulo de 170% do VO_2 max por 20 segundos, seguido de recuperação passiva de 10 segundos, perfazendo um total de 7 a 8 séries, conseguindo, dessa maneira, melhoras na capacidade aeróbica máxima e capacidade anaeróbica, concomitantemente.

A eficiência do HIIT é comparável ao do treinamento de *endurance* para variáveis como VO_2 max como pode ser observado na Tabela 1. Crianças obesas submetidas aos dois protocolos apresentaram melhoras semelhantes tanto nos valores de pico de VO_2 relativo, quanto no VO_2 max; além disso, houve melhora no tempo máximo de exercício e na velocidade de pico. Esses desfechos demonstram que os dois protocolos são eficientes ao promover alterações metabólicas e de *performance* positivas nos indivíduos (CORTE DE ARAUJO et al., 2012).

Tabela 1 - Efeito do Treinamento na *Performance*



Efeitos do Treinamento de Endurance (ET) e do Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) sobre os parâmetros de fitness respiratório. A: VO_2 de pico (L/min); B: VO_2 (ml/kg/min). Resultados após 12 semanas de treinamento. Adaptado de (CORTE DE ARAUJO et al., 2012)

Já há algum tempo, estudos que se utilizaram do HIIT vêm demonstrando que esse modelo de treinamento é eficiente em promover aumento dos indicadores de *performance* em diferentes populações. Lee et al. (2021) demonstraram que apenas 4 semanas de treinamento aumentou a força desenvolvida e a velocidade do teste de corrida em jovens mulheres sedentárias. Em idosos sedentários, Knowles et al. (2015) demonstraram que o treinamento intervalado de alta intensidade aumentou a capacidade aeróbica máxima.

Sendo considerado eficiente em promover a saúde metabólica de seus praticantes (KHALAFI; SYMONDS, 2020), é possível aplicar o HIIT como uma alternativa não medicamentosa no auxílio do tratamento da diabetes tipo 2, doença conhecidamente metabólica. O HIIT realizado por 8 semanas foi capaz de alterar valores de glicemia, bem como a função das células beta de diabéticos. Além da glicemia, outros marcadores característicos da diabetes tipo 2 também foram significativamente melhorados, como pressão sanguínea, sensibilidade à insulina e a massa de gordura abdominal, fatores que por si próprios, já garantiriam uma melhor qualidade do quadro de saúde desses pacientes (MADSEN et al., 2015).

Além das alterações de *performance* e metabólicas, uma das mais importantes promovida pelo HIIT é a alteração antropométrica, como observado por Trapp et al. (2008). Estes autores demonstram que o treinamento intervalado de alta intensidade foi capaz de reduzir a massa gorda total e a gordura abdominal central de jovens mulheres. Outro importante achado é que, além de promover mudanças positivas na antropometria, o HIIT também é capaz de promover o remodelamento dos adipócitos, inclusive com desfechos mais proeminentes que o treinamento de *endurance*. Animais submetidos a esse protocolo de treinamento apresentaram maior alteração dos fatores ligados ao processo de "*Browning*", aumentando a expressão gênica das proteínas Domínio PR contendo 16 (PRMD-16), importante co-regulador de transcrição de adipócitos marrons e UCP1, o que demonstra que esse modelo de treinamento, pode ser um forte aliado no combate à obesidade (KHALAFI et al., 2020).

O exercício não é a única estratégia não-medicamentosa para o enfrentamento da obesidade, diferentes propostas dietéticas emergem nesse

horizonte, então nada mais natural do que buscar a associação entre essas propostas. A associação entre o HIIT e a restrição calórica, vem ganhando destaque nos últimos anos. Batitucci et al. (2022) observaram que a associação dos protocolos de HIIT e alimentação intermitente, realizada por mulheres jovens e obesas por 8 semanas, foi capaz de gerar alterações positivas na composição corporal, reduzindo o índice de massa corporal (IMC), peso corporal, medidas de circunferências da cintura, abdômen e quadril, além de reduzir a massa gorda em níveis maiores do que nos grupos submetidos somente a alimentação intermitente ou ao HIIT.

1.2 Restrição calórica e alimentação intermitente

Amplamente discutida, a restrição calórica (RC) é definida como a redução da ingestão de calorias, sem desnutrição (MCCAY et al., 1939). É possível perceber que diferentes modelos de restrição calórica são utilizados pela literatura. Como exemplo há o Limite Diário, em que se observa o consumo de alimentos de um grupo controle com alimentação *ad libitum* e calcula-se uma porcentagem fixa para a quantidade de alimentos ofertados ao grupo experimental; há também a Alimentação Intermitente (AI) ou mais conhecido como Every Other Day, em que tanto o grupo controle quanto o grupo experimental recebem alimentação *ad libitum*, porém, o grupo experimental é submetido a alternâncias de dias de alimentação e dias de jejum; e por último há um modelo que combina os dois anteriores, em que os animais do grupo experimental são submetidos a dias de jejum e nos dias de alimentação, existe um controle da quantidade de comida ofertada (ANSON; JONES; DE CABO, 2005).

Estudados há décadas, os benefícios da restrição calórica são amplos, sendo que o mais proeminente é o aumento da longevidade (Figura1) de diversas formas de seres vivos, sendo que os estudos em ratos têm maior proeminência (CARLSON, 1945; MCCAY et al., 1939). A restrição de calorias atenuou alterações nas junções neuromusculares esqueléticas destes animais, o que se traduziu em diminuição e também em reversão de danos causados pelo envelhecimento no sistema nervoso (VALDEZ et al., 2010). Outro aspecto relacionado ao envelhecimento, o déficit de cognição, também foi reduzido em resposta a um protocolo de restrição calórica (YANG et al., 2014).

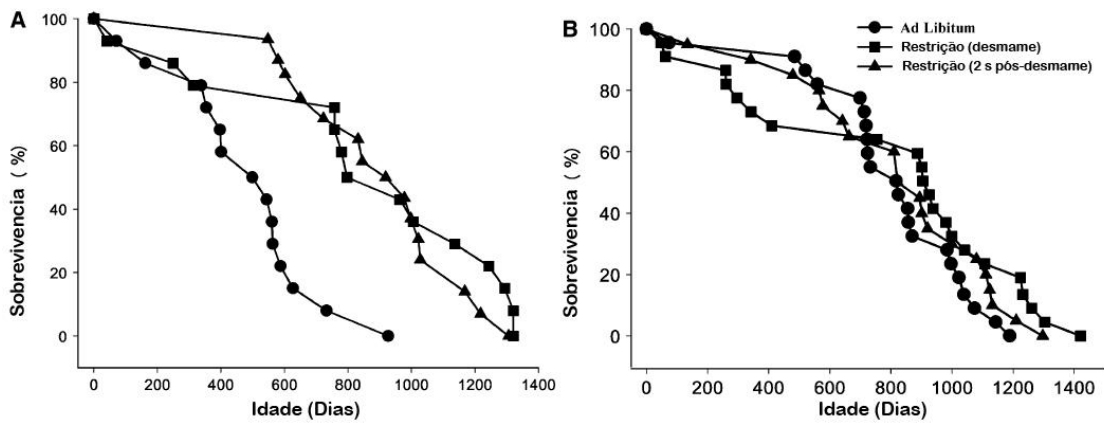


Figura 1 - Curva de sobrevivência de ratos machos (A) e fêmeas (B) após restrição calórica. Adaptado de: (MCDONALD& RAMSEY, 2010).

O aumento da longevidade pode estar atrelado a biogênese mitocondrial e a restrição calórica é capaz de promover o aumento da expressão de mRNA de fatores de transcrição como PGC1 α e NRF1 que estão diretamente ligados ao metabolismo e atividade mitocondrial e também a SIRT1, que é um fator transcricional ligado ao aumento da longevidade (NISOLI et al., 2009).

Ao longo do tempo, diversos estudos surgiram demonstrando como a Alimentação Intermitente era capaz de gerar alterações morfológicas positivas em roedores, reduzindo seu peso corporal e o conteúdo de massa gorda (GOTTHARDT et al., 2016). Contudo, durante muito tempo, as pesquisas envolvendo a alimentação intermitente em humanos, estavam restritas ao modelo referente ao Ramadan, período pelo qual o povo muçulmano estabelece períodos de jejum alternado e com cunho religioso (CHAOUACHI et al., 2009; HARDER-LAURIDSEN et al., 2017). Entretanto, recentemente, emergiram diversos estudos que foram eficientes em demonstrar os efeitos benéficos da Alimentação Intermitente em humanos, sobretudo nas modificações antropométricas, como o estudo conduzido por Domaszewski et al. (2020). Estes autores demonstraram que mulheres idosas submetidas a um protocolo de alimentação intermitente reduziram não somente o IMC, como também o percentual de gordura sem redução da massa magra.

Como já mencionado previamente, quando associada ao exercício físico, a restrição de calorias pode ter alguns de seus efeitos benéficos potencializados, como por exemplo, a redução da incidência de tumorigênese em ratos

(KRITCHEVSKY, 1990), além de promover a otimização do metabolismo de lipídios e diminuição do dano gerado pelo estresse oxidativo (RODRÍGUEZ-BIES et al., 2010). Nosso grupo vem demonstrando o efeito da RC associada ao treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT). Real-Hohn et al. (2018) demonstraram que a AI associada ao HIIT promove uma maior atividade das enzimas ligadas ao metabolismo glicolítico, assim como maior acoplamento mitocondrial, promovendo uma melhora significativa no metabolismo energético, traduzida em aumento de *performance* dos animais. Outros autores como Sharma et al. (2013) também demonstraram que a restrição calórica quando aliada ao exercício é capaz de aumentar a captação de glicose nos músculos com predominância de fibras glicolíticas, e também a fosforilação de AKT, que é uma proteína ligada aos processos de inibição de apoptose e regulação metabólica.

Por outro lado, apesar dos diversos benefícios comprovados, alguns estudos têm apontado para a presença de efeitos adversos da aplicação do protocolo de alimentação intermitente, como por exemplo: a absorção de glicose foi afetada negativamente em jovens mulheres saudáveis, após somente 3 semanas de aplicação do protocolo de AI (HEILBRONN et al., 2005). Resultado semelhante foi encontrado em um estudo conduzido com ratos Sprague-Dawley, no qual após 32 semanas de Alimentação Intermitente, os ratos apresentaram não somente essa alteração negativa na resposta à glicose, como também aumento do desbalanço redox (CERQUEIRA, 2012).

Contudo, os resultados adversos que mais chamaram atenção foram observados por Munhoz et al. (2020) de forma que um protocolo de 12 semanas de AI em ratas fêmeas levou ao desenvolvimento de um comportamento hiperfágico, causando até mesmo aumento do tamanho do estômago desses animais. Chausse et al. (2014b) após um protocolo de apenas 3 semanas de AI, aplicado em ratos machos também observaram comportamento hiperfágico. Dessa forma, os animais comeram nas duas horas imediatamente após a oferta de alimento, o equivalente a 50% do total consumido no dia. Esses autores demonstraram que a mudança no comportamento alimentar dos animais, veio acompanhada de alterações nos neurotransmissores controladores das vias orexigênicas, com o aumento da expressão de mRNA desses

neurotransmissores como o neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à agouti (AgRP).

Esses resultados indicam que a AI pode afetar o controle alimentar de ratos, esse controle é realizado por um complexo sistema que tem como principal regulador o cérebro. Este delicado sistema depende da capacidade do cérebro de captar, interpretar e integrar os diferentes sinais do balanço energético do corpo e como o corpo responderá através do consumo de alimentos, metabolismo e gasto energético (WILLIAMS et al., 2001).

Esses diferentes sinais se originam em múltiplas regiões do corpo; como por exemplo no estômago, com a produção de grelina, no tecido adiposo com a produção de leptina, dentre outros. Esses sinais se integram no hipotálamo, principal agregador desse complexo mecanismo, com a produção de diversos neurotransmissores que atuarão na interpretação dos sinais de fome e saciedade (ABDALLA, 2017).

Esses sinais guiarão não somente as ações de alimentação e gasto energético, como os múltiplos aspectos da homeostase energética. Com o avanço na compreensão dos mediadores e dos componentes neurais reguladores tanto do peso corporal quanto do processo de ingestão, foi possível caracterizar os diferentes centros neurais do hipotálamo, bem como os grupos neuronais responsáveis pelo controle dos processos orexigênicos e anorexigênicos, sempre em resposta às alterações no balanço energético (WILLIAMS et al., 2001).

Os centros funcionais ou núcleos do hipotálamo são responsáveis por abrigar grupos de neurônios que irão secretar importantes neurotransmissores controladores do mecanismo de fome/saciedade e do gasto energético. O núcleo arqueado (ARC) é o de ação mais proeminente e com o maior arcabouço para os neurônios responsáveis pela expressão dos neurotransmissores NPY e AgRP e em antagonismo a proopiomelanocortina (POMC) e a transcrição regulada por cocaína e anfetamina (CART). Apesar de sua elevada importância no controle alimentar, o ARC vai atuar em sinergismo com outros núcleos hipotalâmicos como o núcleo paraventricular (PVN), núcleo dorsomedial (DMH), núcleo

ventromedial (VMH) e a área hipotalâmica lateral (LHA), todos atuando em maior ou menor escala na homeostase energética (Figura 2) (WILLIAMS et al., 2001).

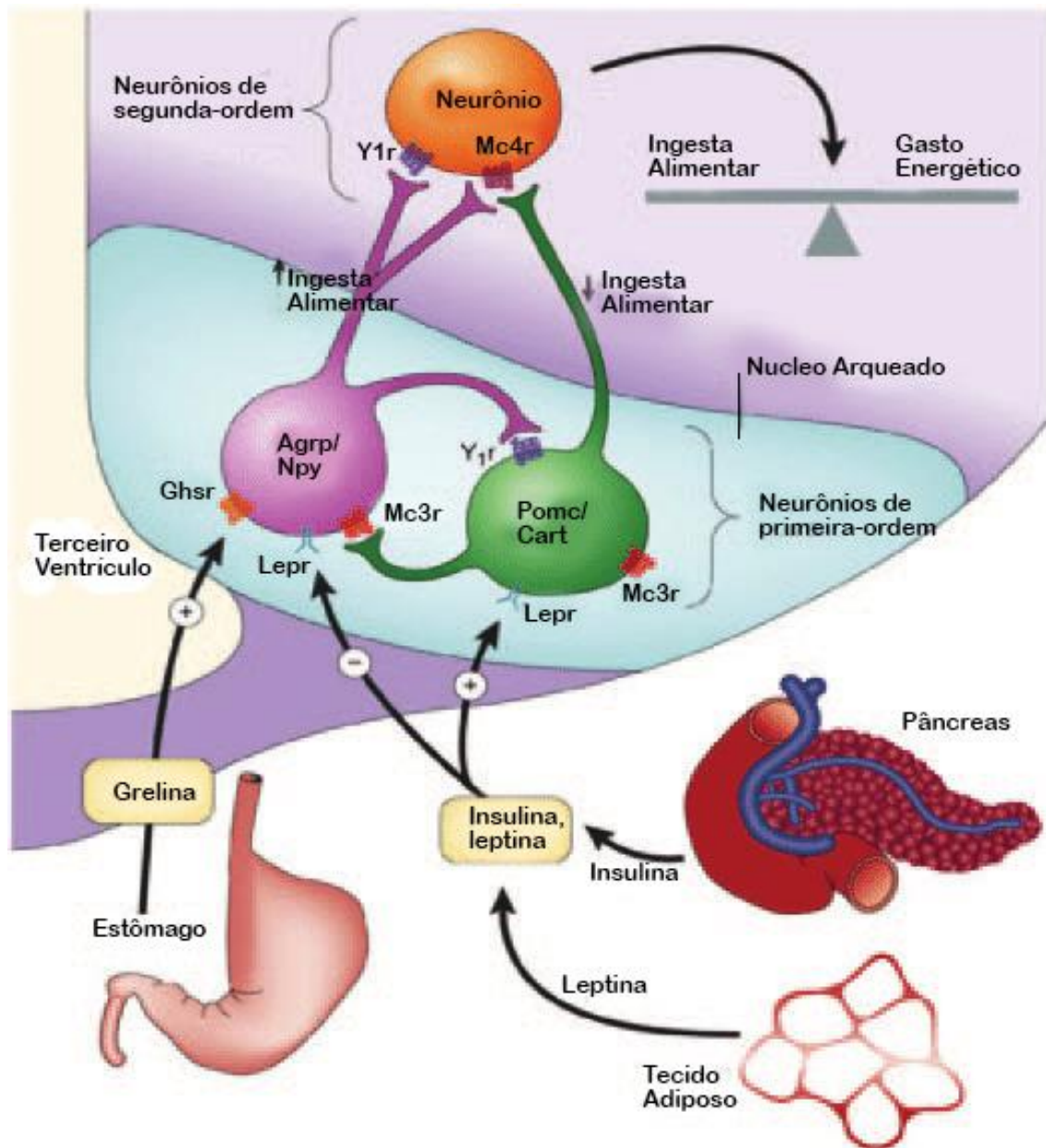


Figura 2 – Alvos hipotalâmicos da leptina, grelina e insulina. Adaptado de FOSTER-SCHUBERT; CUMMINGS, (2006)

Esses núcleos hipotalâmicos são estimulados pelos difusos sinais recebidos, sendo que a leptina, hormônio sintetizado principalmente pelo tecido adiposo é o que tem maior participação nos intrincados mecanismos de controle alimentar e de homeostase energética (KWON; KIM; KIM, 2016). Essas cascatas de sinalização irão, através de processos de ativação e fosforilação de segundos

mensageiros como os receptores JAK-STAT3, atuar tanto nos neurônios das vias orexigênicas quanto nos das vias anorexigênicas (SAHU, 2003).

Essas cascatas serão ativadas a partir do recebimento de sinais acerca do estado energético do corpo e isso ocorrerá pela secreção de leptina nos adipócitos, da insulina pelo pâncreas e por peptídeos gastrointestinais, como a grelina. A ligação tanto da leptina quanto da insulina em seus receptores nos núcleos hipotalâmicos, desencadeará processos catabólicos, estimulando a expressão de neurotransmissores anorexigênicos, POMC; ao passo que a grelina terá efeito diretamente inverso, estimulando a atividade anabólico pelo aumento da expressão de neurotransmissores orexigênicos, NPY e AgRP (MORTON et al., 2006). Os neurônios, considerados de primeira-ordem, receberão esses sinais, em especial no hipotálamo, e vão se comunicar com neurônios de segunda-ordem tanto no hipotálamo quanto em outras áreas, modulando a ingesta e o gasto energético, contribuindo, assim, para a homeostase energética frente a estímulos hormonais (Figura 2) (FOSTER-SCHUBERT; CUMMINGS, 2006).

1.3 O tecido adiposo

Sendo extremamente suscetível às adaptações geradas pelo treinamento e pela restrição de calorias, o tecido adiposo, por décadas, fora considerado apenas como um reservatório energético. Contudo, descobertas mais recentes, apontam que esse tecido exerce importantes funções regulatórias e endócrinas, secretando hormônios, citocinas e proteínas que, além de regularem o crescimento das demais células adiposas, também contribuem diretamente com o sistema endócrino. Sendo assim, hoje, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino (Figura 3) (TRAYHURN; BEATTIE, 2001; VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008).

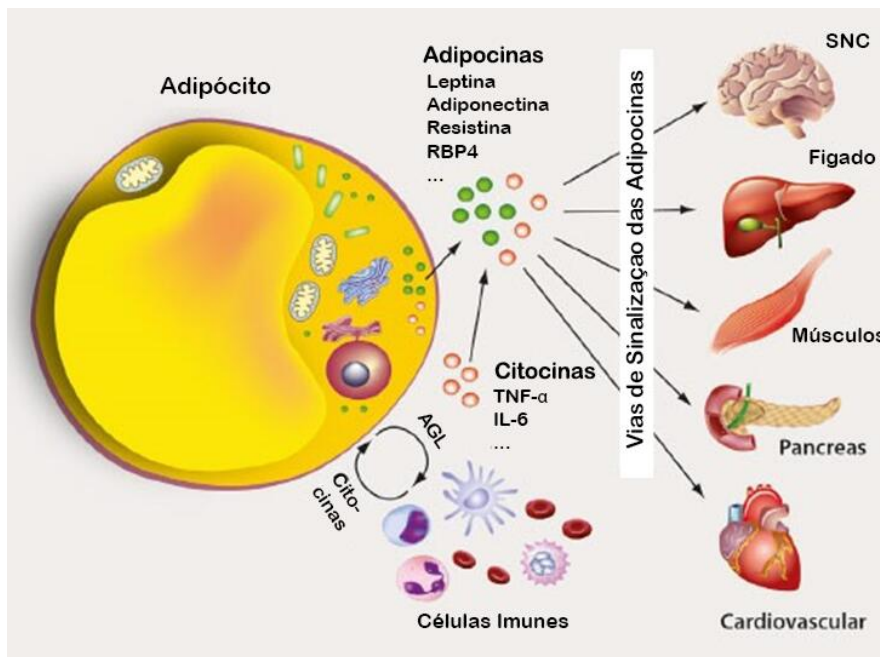


Figura 3- Vias sinalização das adipocinas. Adaptado de “Adipocytokine Signaling Pathway - Creative Diagnostics”.

Os mecanismos que envolvem a sua regulação são interligados de maneiras extremamente complexas e podem estar associados a estímulos β adrenérgicos, ao fluxo sanguíneo que chega diretamente aos adipócitos e ao nível energético do corpo. Esse intrincado mecanismo regulatório constitui o que é conhecido na literatura como fisiologia integrativa do tecido adiposo (FRAYN et al., 2003).

O tecido adiposo apresenta três variações em suas células: o tecido adiposo branco (Figura 4A), que tem como principal função o armazenamento e fornecimento de substrato energético, além disso, esse grupo celular está ligado a produção hormonal, função imune e contribui na arquitetura tecidual. O tecido adiposo marrom (Figura 4B) que devido à grande presença de mitocôndrias em sua matriz, desempenha papel importante na termorregulação; papel esse conduzido a partir de sua elevada expressão de UCP1, importante proteína desacopladora. Por último, porém não menos importante, o tecido adiposo bege (Figura 4C) surge a partir de um processo de adaptação sofrido pelas células do tecido adiposo branco (*browning*), que passam a apresentar características semelhantes às células do tecido marrom, como por exemplo: grande número de mitocôndrias e elevada expressão de UCP1 (STANFORD; GOODYEAR, 2016; TRAN; KAHN, 2010).

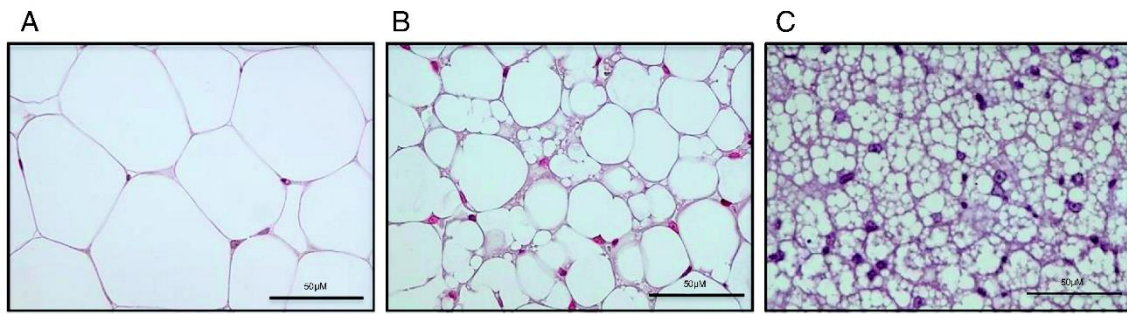


Figura 4 - Os diferentes tipos de tecido adiposo. Corte histológico demonstrando os 3 diferentes tipos de tecido adiposo: (A) Tecido adiposo branco, (B) Tecido adiposo bege e (C) Tecido adiposo marrom. Adaptado de KEIPERT; JASTROCH, (2014)

O tecido adiposo branco tem como principais funções metabólicas as atribuições de lipólise e lipogênese, que são controladas pelos sistemas endócrinos e neurais, garantido assim os níveis adequados e estáveis de reservas energéticas do corpo. Além disso, a leptina, principal hormônio secretado pelos adipócitos, atua, em conjunto com os neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, controlando a percepção de saciedade. Este hormônio também está envolvido em outras funções biológicas como a reprodução, angiogênese e controle pressórico (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo branco é capaz de secretar uma série de substâncias de grande importância biológica, conhecidas como adipocinas. As principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo são Interleucina-6, adiponectina, vaspina, fator de necrose tumoral alfa, resistina e leptina. Essas adipocinas são citocinas com variadas funções fiso-metabólicas que incluem a regulação do comportamento alimentar, o controle do metabolismo de carboidratos e lipídios, e, até mesmo a sensibilidade à insulina (Figura 3) (PROENÇA et al., 2014).

Sendo exclusividade dos mamíferos, o tecido adiposo marrom tornou-se alvo de diversos estudos que investigavam novos tratamentos à obesidade, já que a sua principal função fisiológica, a termorregulação, depende de constante provimento de altas cargas de substratos energéticos (ROTHWELL, 1997).

Sendo o mais importante e mais estudado sinalizador para o tecido adiposo marrom, a noradrenalina, controla não somente a termogênese através de uma série de diferentes cascatas, como também está atrelada aos processos de diferenciação, proliferação, maturação e apoptose dos adipócitos marrons

(NEDERGAARD; LINDBERG, 1979). Essas cascatas ativadas pelos estímulos adrenérgicos serão mediadas por diversos fatores, como por exemplo a ativação da Proteína Kinase A, que no adipócito marrom, irá fosforilar o fator de transcrição CREB; este por sua vez, dará início à transcrição de importantes genes que atuarão no controle da termogênese, sendo a UCP1, o principal (THONBERG et al., 2002).

A UCP1 ou proteína desacopladora 1, faz parte de uma importante família de proteínas mitocondriais com função de carreamento de prótons. Essa função de carreamento de prótons está diretamente ligada a um importante co-fator: os ácidos graxos livres (Figura 5). Embora o mecanismo de ativação da UCP1 ainda não seja completamente compreendido, sabe-se que a presença de ácidos graxos livres ou derivados semelhantes, é essencial para sua ativação e função (KLINGENBERG et al., 1999).

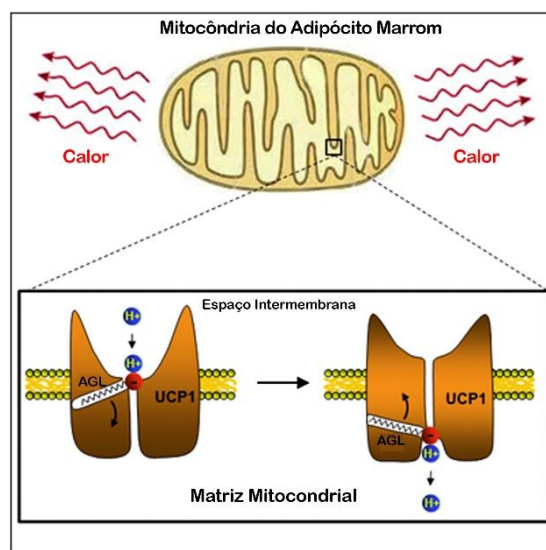


Figura 5 - Sistema de transporte da UCP1. Modelo de transporte de H⁺ mediada por ácido graxo livre e termogênese dependente de UCP1. Adaptado de FEDORENKO; LISHKO; KIRICHOK, (2012).

Matthias et al. (2000) utilizando-se de adipócitos marrons isolados, provenientes de camundongos *wild-type* e camundongos geneticamente manipulados para não expressar UCP1, demonstraram que o estímulo adrenérgico gerado pela noradrenalina é capaz de estimular a termogênese nos

animais *wild-type*, contudo esse aumento não fora observado nos animais modificados (Figura 6). Estes dados demonstraram que a termogênese do tecido adiposo marrom é completamente dependente da presença de UCP1, fato esse que mostra a importância de se compreender ainda mais os mecanismos que envolvem a ação e ativação dessa proteína.

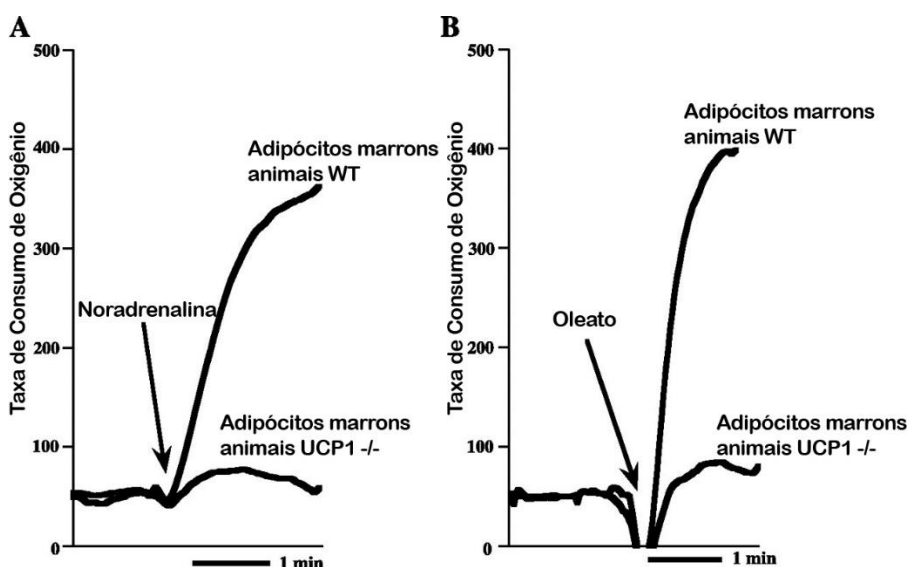


Figura 6 - Ativação da termogênese dependente de UCP1. Consumo de oxigênio dos adipócitos marrons em resposta à adição de noradrenalina (A) ou de ácidos graxos (B). Adaptado de MATTHIAS et al., (2000).

Apesar de apresentar as mesmas funções de termogênese ativada por UCP1, o tecido adiposo bege não pode ser considerado um tecido adiposo marrom tradicional. Existem diferentes proposições para a origem das células desse tecido, sendo que, as principais acreditam que os adipócitos beges podem ter sua origem tanto de células progenitoras de adipócitos, quanto pelo processo de transdiferenciação de adipócitos brancos em adipócitos bege (WU et al., 2012; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

Pensar no tecido adiposo bege como uma possível estratégia ao combate à obesidade, já é uma realidade na comunidade científica, uma vez que, a quantidade de tecido adiposo marrom é diretamente proporcional ao gasto energético e em pessoas obesas, essa taxa costuma ser menor (KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020). A promoção da transdiferenciação do tecido adiposo branco em tecido adiposo bege, pode contribuir para o aumento da lipólise e do consumo de substratos energéticos.

Durante décadas, acreditou-se que o processo de *browning* seria desencadeado a partir da exposição ao frio intenso ou através de estímulos adrenérgicos, mais recentemente uma nova perspectiva passou a figurar na literatura, a da adaptação ao exercício (GOLLISCH et al., 2009), e, como esperado, essas adaptações estendem-se ao Treinamento Intervalado, que também é capaz de estimular o processo de *browning* (KHALAFI et al., 2020).

Uma das chaves para ativação do processo de *browning* é a angiogênese. Essa constatação se deu a partir da observação de adipócitos bege que, em função do estado de obesidade, passaram pelo processo de transdiferenciação reversa: “*whitening*”. O processo de “*whitening*” se deu a partir da redução vascular do tecido e instalação da condição de hipóxia. Por outro lado, com a restauração do aporte vascular, o adipócito retornou ao fenótipo bege. O exercício foi capaz de estimular a conversão de adipócito branco em bege pois promoveu a angiogênese e o maior aporte vascular do tecido (ALDISS et al., 2018).

Diversos são os marcadores de angiogênese utilizados na literatura, como por exemplo as citocinas Angiopietina-1 e Angiopietina-2, as quinases receptoras de tirosina Flt-1, KDR, Tie-1 e Tie-2, contudo o marcador mais utilizado na literatura é o Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SHIH et al., 2002). Embora o VEGF seja amplamente utilizado, esta molécula é apenas um fator e o aumento de sua expressão não necessariamente se traduz em formação de vasculatura, neste sentido a presença de marcadores de adesão endotelial, como a CD31 (PECAM-1), identificam com mais precisão a formação vascular (LIU; SHI, 2012).

Em estudo conduzido por Xiao et al. (2023), utilizando-se de ratos obesos submetidos a um protocolo de HIIT por 10 semanas, foi possível observar claramente que o HIIT foi capaz, não somente, de alterar a morfologia dos adipócitos como também aumentou a expressão genética de UCP1. Estes autores demonstraram que o HIIT promoveu maior sinalização para os promotores de transdiferenciação de tecido adiposo branco em tecido adiposo bege o que contribuiu para redução da massa gorda desses ratos.

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde mundial e como descrito anteriormente está associada ao surgimento de diversas patologias, que impactam a saúde da população. Neste sentido, há necessidade da busca por estratégias que sejam eficientes na redução da gordura corporal e melhora do metabolismo energético. A literatura demonstra que o exercício físico é uma estratégia eficiente na regulação do metabolismo energético e fenótipo do tecido adiposo, além de promover alteração nos neurotransmissores que controlam a fome e a saciedade. Ao mesmo tempo, a alimentação intermitente tem sido uma estratégia eficientemente empregada no contexto da redução do peso e adiposidade corporal, com desfechos benéficos tanto em humanos quanto em roedores. Da mesma forma que o exercício, a AI também é capaz de promover alterações nos neurotransmissores que controlam a fome e a saciedade, modulando as vias anorexigênica e orexigênica. Contudo, a literatura ainda é escassa quando se trata da associação entre estas estratégias, principalmente quando o exercício empregado não segue o modelo tradicional de *endurance*. Desta forma, o impacto da associação entre estas estratégias, deve ser melhor avaliado tendo em vista o potencial benéfico do mesmo para a população.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da associação entre alimentação intermitente e exercício intervalado de alta intensidade sobre a *performance* de nado, o controle alimentar e a morfologia e bioquímica do tecido adiposo branco de ratos Wistar machos.

3.2 Específicos

-Determinar o efeito das intervenções utilizadas sobre as vias orexigênicas e anorexigênicas;

-Determinar se a associação entre a AI e o exercício são capazes de regular o comportamento alimentar dos animais;

-Determinar as alterações morfológicas do tecido adiposo branco em resposta aos diferentes tratamentos;

-Avaliar se a associação entre AI e HIIT é capaz de promover o processo de *browning* do tecido adiposo branco dos diferentes grupos experimentais.

-Quantificar as alterações bioquímicas sofridas no tecido adiposo branco por meio da quantificação da expressão de UCP1 em resposta aos diferentes tratamentos.

4 ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese foi organizada da seguinte forma: Introdução e suas sub seções que trazem um embasamento científico acerca do trabalho desenvolvido. Justificativa e Objetivos onde é apresentada a lacuna da literatura e a importância do trabalho, bem como os objetivos que foram explorados. Em seguida a seção Materiais e Métodos que descreve as metodologias utilizadas ao longo do projeto, desde os protocolos de alimentação e treinamento, as técnicas laboratoriais até as análises estatísticas utilizadas. Em seguida pode-se observar a seção Resultados e Discussão que será apresentada na forma de um artigo original, publicado na revista *Tissue and Cell* e contém todos os dados produzidos ao longo do doutorado. Após, observa-se a seção Considerações Finais com o fechamento dos resultados obtidos e, por fim, as seções Referências Bibliográficas e Anexos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra e protocolo de alimentação intermitente

No trabalho aqui desenvolvido, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar. Todos os tratamentos e procedimentos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro e segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA) (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934. Número do protocolo: 059/16.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados 74 ratos machos da linhagem Wistar, com idade de 60 dias pesando em média $247,9 \text{ g} \pm 11,74$, divididos em 4 grupos experimentais Controle Sedentário (C), Controle Exercitado (EX), Alimentação Intermitente (AI) Alimentação Intermitente e Exercício (AIEX) e acomodados em gaiolas coletivas com, no máximo, 4 animais. É importante ressaltar que, cada experimento teve um número diferente de animais utilizados. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controlados ($22,8 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$, 45–50% umidade) e submetidos a ciclo invertido de luz-escuro de 12 h, com livre acesso a água e comida, exceto quando o tratamento exigia condições diferentes. A ração oferecida aos animais era uma ração comercial padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes, Paraná, Brasil) e com a seguinte composição nutricional: 22% de proteínas, 8% de fibras e 4% de gorduras. Duas semanas antes do início dos tratamentos os animais foram submetidos a um protocolo de adaptação que consistia em: duas semanas de alimentação intermitente (grupos AI e AIEX) e uma semana de reconhecimento do meio aquático (todos os grupos, sem sobrecarga, por 1 minuto). Os animais do grupo Controle (C) e os animais do grupo Exercitado (EX) tiveram livre acesso à ração durante todo o protocolo, ao passo que, os animais dos grupos Alimentação Intermitente (AI) e Alimentação Intermitente e Exercício (AIEX) tiveram acesso à ração por 24 horas e depois seguiam em restrição alimentar por 24 horas, durante todo o protocolo (Figura 7). Também conhecido como *Every Other Day* o protocolo de Alimentação Intermitente já é bem descrito na

literatura e o mesmo garante uma redução do aporte calórico, sem que ocorra má nutrição (RODRÍGUEZ-BIES et al., 2010). Os animais foram pesados semanalmente, às segundas-feiras, e a ração consumida foi pesada diariamente durante todo o protocolo.

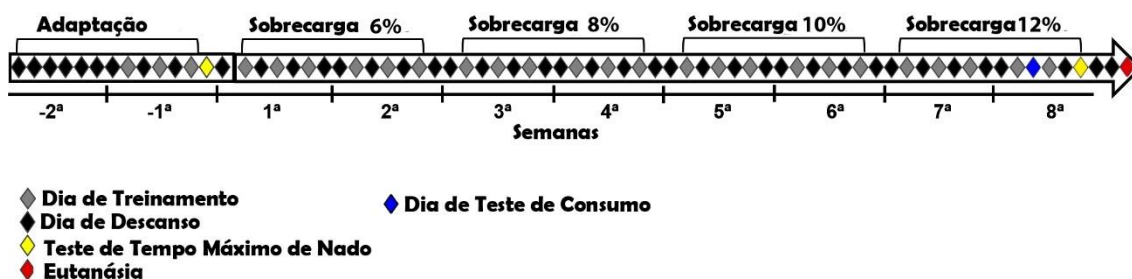


Figura 7 - Desenho Experimental

5.2 Treinamento intervalado de alta intensidade e teste de *performance*

O protocolo de treinamento utilizado foi o Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) e os animais dos grupos EX e ALEX foram submetidos a esse protocolo por 8 semanas em piscina adaptada para roedores com água a 37°C e realizavam 14 “bouts” de esforço com duração de 20 segundos intercalados com 10 segundos de recuperação passiva, perfazendo um total de 6:50 min, com sobrecarga anexada a região próxima da cauda (iniciava-se com sobrecarga equivalente a 6% do peso corporal de cada animal e a cada 2 semanas, havia um acréscimo de 2%, até a sobrecarga máxima de 12% do peso corporal). Esse protocolo é uma adaptação ao protocolo estabelecido por Terada et al. (2001). O protocolo de exercícios foi administrado 3 vezes por semana, às segundas, quartas e sextas, garantindo assim que os animais não estariam sujeitos ao overtraining. A fim de observar melhorias cardiorrespiratórias promovidas pelos protocolos de tratamento, foram executados dois testes de *performance* de nado, que consistiam em testes de tempo máximo de nado. Os testes consistiam em observar o tempo máximo de nado de cada animal, até a fadiga, com o implemento de uma sobrecarga de 12% do peso corporal e foram realizados no dia 0 e no último dia de tratamento. A fadiga era determinada quando o animal não era capaz de emergir para respirar, num período superior a 20 segundos. (CASIMIRO-LOPES et al., 2008)

5.3 Coleta de tecidos

Todos os animais foram eutanasiados por decapitação utilizando guilhotina específica 48 horas após a última sessão de treinamento. O hipotálamo foi rapidamente retirado, pesado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. O tecido adiposo branco visceral e epididimal foi retirado, pesado e parte foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas e parte foi preservada em solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) para as análises histológicas e ensaio de imunohistoquímica. O peso de todos os tecidos foi corrigido pelo peso corporal da última pesagem anterior à eutanásia.

5.4 Consumo alimentar e hiperfagia

Para verificar o consumo alimentar dos diferentes grupos e o impacto das intervenções sobre os mesmos, a ração consumida foi pesada e registrada diariamente ao longo de todo o tratamento. Com o objetivo de observar o desenvolvimento de comportamento hiperfágico, típico de animais sob protocolos de alimentação intermitente, fato observado por Chausse et al. (2014), foi realizado um teste de consumo individual, no qual, todos os grupos experimentais foram alocados em gaiolas individuais e permaneceram em restrição alimentar por 12 horas, após esse período todos tiveram ração ofertada ao mesmo tempo e o consumo das mesmas registrada a cada 2 horas, num total de 8 horas.

5.5 RT-PCR e neurotransmissores orexigênico e anorexigênico

RNA hipotalâmico foi isolado utilizando-se kit ReliaPrep RNA tissue Miniprep System (Promega). A concentração e pureza das amostras de RNA foram avaliadas pela razão das absorbâncias a 260 e 280 nm usando equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies Inc.). Um micrograma do RNA total foi usado para sintetizar cDNA usando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de expressão de mRNA de Proopiomelanocortina (POMC) e Neuropeptídeo Y (NPY) foram avaliados pelo RT-PCR de tempo real usando GoTaq qPCR Master Mix (Promega), foram utilizados 5 ng de cDNA e primers específicos (Tabela 2). As amostras rodaram utilizando ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com protocolo de termociclagem consistindo em 2 min a 50 °C, 10

min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C e terminando com uma curva de desnaturação variando de 60 a 95°, permitindo a distinção de produtos específicos. Os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 2 - Primers

Primers			
Forward	Reverse	Sequências	Tamanho do produto
POMC		5'- GAAGGTGTACCCCAATGTCG- 3'	211bp
	POMC	5'- CTTCTCGGAGGTCATGAAGC- 3'	
NPY		5'- TGTGGTGATGGGAAATGAAA- 3'	87bp
	NPY	5'- CAGGCAGACTGGTTTCACAG - 3'	
βACTIN		5'- CACTTTCTACAATGAGCTGCG -3'	148 bp
	βACTIN	5'- CTGGATGGCTACGTACATGG- 3'	

5.6 Histologia e imunohistoquímica

5.6.1 Processamento histológico

Os tecidos adiposos brancos foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% a fim de retardar o metabolismo tecidual, bem como evitar a autólise celular e uma possível proliferação de microrganismos. Para desidratação, os tecidos foram submetidos a um processamento histológico com séries crescentes de

álcool etílico (Isofar, Brasil) 70% e 90% por 40 minutos e 2 banhos de 100% por 1 hora cada. Para tornar o tecido o mais translúcido possível, facilitando a penetração da parafina, os tecidos foram submetidos a etapa de clarificação com 3 banhos de xilol (Isofar, Brasil) por 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos adiposos foram submetidos a 2 banhos de parafina por 50 minutos cada. Ao final do último banho, as amostras foram incluídas na central de inclusão Leica EG1150 H (Leica Biosystems, EUA), na qual as amostras foram colocadas em formas de metal e submersas em parafina, a fim de formar um bloco de parafina após solidificação. Por fim, os tecidos foram cortados no micrótomo Rotatory Microtome CUT 5062 (Slee Medical GMBH, Alemanha) em cortes escalonados à 5µm de espessura, para posterior coloração com hematoxilina e eosina e análises por imunohistoquímica. Foram capturadas 15 imagens digitais de campos aleatórios do tecido adiposo branco em uma câmera de alta resolução Olympus DP72 (Olympus Corporation, Japão) acoplada ao microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Japão).

5.6.2 Técnica de H&E

Para realizar a técnica, as lâminas obtidas pelo processamento histológico foram colocadas por 24 horas em uma estufa à 56°C, com o intuito de derreter o máximo de parafina impregnada no tecido. No dia seguinte, para clarificação do tecido, as lâminas foram submetidas a 3 banhos sucessivos de xilol, por 5 minutos cada, seguido de banhos com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90% e 70%) também por 5 minutos cada para hidratação tecidual. Em seguida, após um banho de 2 minutos com água destilada, os cortes foram corados com hematoxilina (VETEC 630) por 3 min, lavadas em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas por 2 minutos em eosina (Sigma E4382) e lavadas em água destilada e corrente por 5 minutos. A hematoxilina e eosina coram o núcleo da célula com a cor azul arroxeado e o citoplasma celular e a matriz extracelular em tons avermelhados a róseos, respectivamente. Em seguida submetidas a banhos com concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 90% e 100%) por 5 minutos cada para desidratação tecidual e a 3 banhos consecutivos de xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck Millipore, Alemanha) (DE ALMEIDA et al., 2021)

5.6.3 Imunohistoquímica

Os cortes foram colocados na estufa à 56°C por 24 horas para amolecer a parafina presente nos tecidos e depois submetidas ao processo de desparafinização com 3 banhos consecutivos de xilol por 3 minutos cada, para completo derretimento da parafina. A técnica de imunohistoquímica utilizada foi a da avidina-biotina-peroxidase, utilizando o kit Vectastain (Vector Laboratories, EUA). As lâminas foram imersas em banhos decrescentes com álcool etílico 100%, 90% e 70% por 3 minutos cada, seguido por um banho com água destilada por 2 minutos, e então foram colocadas em câmara úmida para início do protocolo. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e o seu excesso foi retirado com 3 banhos de tampão fosfato-salina (PBS) contendo o detergente Tween a 0,2% (tampão PBS-T) por 5 minutos cada banho. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram submersas em tampão de Tris-EDTA pH 9,0, sendo colocadas 3 vezes no micro-ondas em potência máxima por 5 minutos cada, com intervalos em temperatura ambiente por 5 minutos cada, seguido de descanso no gelo por 10 minutos. Após essa primeira solução, as lâminas foram colocadas em tampão citrato de sódio pH 6,0, sendo levadas 2 vezes ao micro-ondas em potência 6 por 5 e 3 minutos, com intervalos de 10 minutos no gelo. Após essas soluções, os cortes foram lavados com 2 banhos de PBS-T por 5 minutos cada e incubadas com PBS/albumina sérica bovina a 3% por 1 hora para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Após este intervalo de tempo ocorreu a incubação overnight à 4°C dos tecidos com os anticorpos primários específicos, CD31 (Abcam ab28364, diluição 1:25), UCP1 (Sigma U6382, diluição 1:500). No dia seguinte, foi realizada a incubação com anticorpo secundário, conjugado com biotina (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA) durante 1 hora e posteriormente com estreptavidina (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA) também por 1 hora. Após a lavagem com PBS-T, foi aplicada uma gota de diamino benzidina (DAB) (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA) em cada corte por 1 minuto, sempre verificando a coloração do tecido. A reação foi interrompida com água destilada. O material foi contra corado com hematoxilina por 5 segundos e após, as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, Alemanha).

5.6.4 Quantificação de vasos

A quantificação dos vasos e dos adipócitos foi feita através do programa STEPanizer para realizar o cálculo dos parâmetros estereológicos (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). Para a contagem de vasos e dos adipócitos foi realizada uma contagem separada da área teste em todos os campos capturados. Para o cálculo dos núcleos por área (Q_A) foi utilizada a fórmula abaixo (Equação 1):

$$Q_A = \frac{\text{n}^\circ \text{ núcleos na área teste}}{\text{área teste } (\mu\text{m}^2)}$$

Equação 1 - Cálculo da quantificação de vasos

5.6.5 Quantificação da área dos adipócitos

Para essa análise, avaliamos oito imagens de diferentes campos para cada animal, em um total de quatro animais por grupo experimental. Em cada campo analisamos cinco adipócitos, nos quais medimos o menor e o maior diâmetro para calcular a área dos adipócitos conforme descrito anteriormente (OSMAN et al., 2013). Para cada adipócito, o diâmetro foi calculado como a média aritmética do menor e do maior diâmetro.

5.6.6 Análise qualitativa de UCP1

A UCP-1 é expressa exclusivamente no tecido adiposo marrom em roedores e em recém-nascidos, sendo regulada por noradrenalina e hormônios da tireoide. Desta forma, foi realizada uma análise qualitativa da presença ou não de marcação UCP1 no tecido adiposo branco. Onde 0=ausente, 1=pouca marcação, 2=marcação intermediária, 3=muita marcação

5.7 Análises estatísticas

O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para a análise dos dados. As comparações foram feitas usando ANOVA de duas vias com o teste de Tukey para comparações múltiplas, ANOVA de três vias (consumo a cada 2h) e teste de Kruskal-Wallis para medidas não paramétricas (intensidade de marcação UCP-1). O tamanho do efeito das intervenções (η^2) foi calculado no Microsoft Excel para o peso final, consumo de alimentos, expressão de mRNA de Pomc e Npy, peso do tecido adiposo branco, área de adipócitos, número de adipócitos,

razão CD31/área de adipócitos e marcação de UCP1. Um tamanho de efeito foi considerado baixo quando $\eta^2 \leq 0,01$, moderado quando $\eta^2 \leq 0,06$ e alto quando $\eta^2 \geq 0,14$. Os resultados foram expressos em média \pm DP e o nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo: Combined effects of Intermittent Fasting with Swimming-based High Intensity Intermittent Exercise Training in Wistar rats.

Autores: Everton Luis dos Santos Cardoso, Fábio Cahuê, Iordan Emanuel Ferreira Miranda, Marcelo de Lima Sant'Anna, Cherley Borba Vieira de Andrade, Raiana Andrade Quintanilha Barbosa, Tania Maria Ortiga-Carvalho, Mário Vaisman, Verônica Salerno Pinto.

Situação: Publicado na revista Tissue and cell



Combined effects of intermittent fasting with swimming-based high intensity intermittent exercise training in Wistar rats

Everton Luis dos Santos Cardoso^{a,d}, Fábio Cahuê^{a,g}, Jordan Emanuel Ferreira Miranda^{a,b}, Marcelo de Lima Sant'Anna^e, Cherley Borba Vieira Andrade^{b,c}, Raiana Andrade Quintanilha Barbosa^{b,f}, Tania Maria Ortiga-Carvalho^b, Mário Vaisman^d, Verônica Pinto Salerno^{a,*}

^a Departamento de Biociência do Exercício, Escola de Educação Física e Desporto, Universidade Federal do Rio de Janeiro, (EEFD)/UFRJ, Brasil

^b Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, (IBCCF)/UFRJ, Brasil

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, (IBRAG)/UERJ, Brasil

^d Departamento de Endocrinologia Médica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/(HUCFF)/UFRJ, Brasil

^e Centro de Instrução Almirante Sylvania de Camargo, Corpo de Fuzileiros Navais, Brasil

^f Centro de Tecnologia Celular, Instituto Nacional de Cardiologia, RJ, Brasil

^g Instituto de Nutrição Josué de Castro, UFRJ, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:

Intermittent Fasting
High Intensity Intermittent Exercise
Adipose
Obesity

ABSTRACT

High caloric intake and physical inactivity are known precursors to the development of several chronic metabolic diseases. For obesity and sedentarism, High Intensity Intermittent Exercise (HIIE) and Intermittent Fasting (IF) have emerged as individual strategies to attenuate their negative effects by improving metabolism. To study their combined effects, Wistar male rats ($n = 74$, 60 days old) were divided into four groups: Sedentary Control (C), swimming-based HIIE only (HIIE), Intermittent Fasting only (IF), and swimming-based HIIE associated with Intermittent Fasting (HIIE/IF). Over an eight-week period swimming performance, body composition, weight and feeding behavior were analyzed. The final morphology of white adipose tissue showed a significant reduction in adipocyte size consistent with a higher number of cells per area in exercised animals (vs C and IF, $p < 0.05$), which also displayed characteristics of browning through UCP-1 levels and CD31 staining. These results suggest that the increased performance in the HIIE/IF group is, in part, by modifications of WAT metabolism through the browning process.

1. Introduction

Physical inactivity is a major health concern that in association with a high-calorie diet increases the risk factors for the onset of several weight-related chronic diseases such as obesity, hypertension, diabetes, joint diseases, and others (Warburton et al., 2006). Inactive people often cite a lack of time as a major barrier to regular exercise that can be overcome by the short-duration nature of high-intensity interval training (HIIT) that has repeatedly shown similar results to traditional, higher-volume training (Gibala and Jones, 2013; Stutts, 2002). HIIT can increase physical performance by metabolic improvements including increased coupling of the electron transport chain and greater efficiency of glycolytic enzymes, as previously observed by our group (Real-Hohn

et al., 2018); as well as improved fatty acid metabolism (Gibala et al., 2006). In addition, programmed physical activity alone can reduce post-session food consumption (Blundell and King, 2000), which may be related to the physical intensity of the exercise. Hunger and the motivation to eat can be reduced by HIIT even after a single session (Bilski et al., 2020). It has been suggested that HIIT promotes a greater reduction in food intake compared to other exercise programs by increasing leptin expression levels, including in eutrophic individuals (Katch et al., 1979; Rocha et al., 2016). This increase in leptin levels may explain the contribution of exercise to a reduction in caloric intake (Caldeira et al., 2018; Varkaneh Kord et al., 2021).

Intermittent fasting (IF) is another method to lead to a weight loss that directly affects the calorie intake. Rats subjected to an IF protocol

* Correspondence to: School of Physical Education and Sports, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 540, Cidade Universitária, CEP: 21941-599, Brazil.

E-mail address: vpsalerno@yahoo.com.br (V.P. Salerno).

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102099>

Received 5 December 2022; Received in revised form 25 April 2023; Accepted 25 April 2023

Available online 26 April 2023

0040-3166/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

showed an improvement in metabolic homeostasis through morphological and biochemical changes in adipocytes of the white adipose tissue (WAT), which displayed signs of a browning process towards brown adipose tissue (Kim et al., 2017). This process describes the onset of chemical-structural modifications that occur in white adipocyte as they acquire characteristics of brown adipose tissue cells. This influences the thermal regulation process through non-shivering thermogenesis and the leaking of electrons through UCP-1 in the electron transport chain of mitochondrial respiration (Picó et al., 2022). Several studies have shown that IF, used as a calorie restriction protocol, has been considered effective in inducing morphological changes and promoting attenuation of parameters considered to be at risk for the onset and progression of chronic metabolic diseases. (Eshghinia and Mohammadzadeh, 2013; Grajower and Horne, 2019). Importantly, Chausse et al. (2014) observed that animals submitted to a 4-week IF protocol developed hyperphagic behavior on chow offering days as a function of alterations in appetite-controlling neurotransmitters. Regular exercise can also induce the expression of genes responsible for the browning process of white adipose tissue (Otero-Díaz et al., 2018), which can contribute to weight loss in overweight or obese people by increasing thermogenesis (YE et al., 2019).

Separately, exercise and IF are two approaches to control weight gain by increasing calorie expenditure (only exercise) and reducing calorie intake (both approaches). Although several studies show that both HIIE and IF can generate similar results, there is still a large gap in the literature when it comes to the association of two protocols. The study conducted by Moraes et al. (2017) observed changes in the body composition of animals but did not observe changes in feeding behavior. Thus, this study aims to evaluate the effects of combination of the two treatments on the body composition as well as on the feeding behavior of rats. In addition, this study investigated the morphological, structural, biochemical changes of adipocytes and the swimming performance.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats ($n = 74$, 60 days old, 247.9 ± 11.74 g), provided by Central Animal Facility of the Health Sciences Center (CCS) of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), were randomized using Excel and divided into four experimental groups: Sedentary Control (C), Exercise Only (HIIE), Intermittent Fasting (IF), and Exercise with Intermittent Fasting (HIIE/IF). The animals were housed in collective cages with a maximum of 4 animals/cage under a controlled environment (22.8 ± 2.0 °C, 45–50% humidity) and inverted light-dark cycle of 12 h. Food and water were available ad libitum, except for the IF groups. Animals were fed with standard commercial chow Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrients, Paraná, Brazil) with following nutritional composition: 22% protein, 8% fiber, and 4% fat. Two weeks before the study period, animals were submitted to an adaptation protocol that consisted of two weeks of intermittent fasting (IF and HIIE/IF groups) and one week to adapt all groups to an aquatic environment by swimming for 1 min without overload (Fig. 1). The Control group (C) and Exercised

group (HIIE) had water and food ad libitum throughout the protocol. The Intermittent Fasting (IF) and Intermittent Fasting and Exercise (HIIE/IF) groups had access to food for 24 h followed by 24 h of feed restriction as described by Rodríguez-Bies et al., (2010). The animals were weighed weekly on Mondays and the feed consumed was weighed daily throughout the protocol (8 weeks). This project is in compliance with the ARRIVE guideline, the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, current legislation and the norms established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Ethics Committee for the use of animals (CEUA) in Scientific Experimentation of the CCS-UFRJ under number: 059/16.

2.2. High-intensity intermittent exercise

The animals in groups HIIE and HIIE/IF were submitted to an eight-week high intensity, intermittent swimming protocol that was adapted from Terada et al. (2001). Animals performed 14 bouts of swimming in a pool adapted for rodents and a water temperature of 37 °C for 20 sec interspersed with 10 s of passive recovery. Animals carried an overload of weight attached to the proximal tail region that started with 6% of the animal body weight and increased 2% every 2 weeks up to the maximum overload of 12% of body weight. The total exercise session lasted 6 min and 50 s. For animals in the training groups, the HIIE protocol was performed on Mondays, Wednesdays, and Fridays. The animals in the sedentary groups were placed in shallow water at the same temperature as the animals under training were exposed. It is important to emphasize that the water level was such to mimic the water temperature of the animals undergoing training, without, however, having sufficient depth to perform the swimming movement.

2.3. Performance test

The cardiorespiratory endurance of animals was measured by the time recorded from a maximum swimming test performed before the exercise protocol started (Day 0) and at the end of training period as showed in Fig. 1. The test consisted of a single swimming bout until fatigue with a 12% body weight overload of current body weight. Fatigue was defined as 20 sec underwater (Casimiro-Lopes et al., 2008).

2.4. Tissue collection

After a 48 h recovery period from the maximum swim test, animals were euthanized by decapitation using a dedicated guillotine. The hypothalamus was rapidly removed, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen. Visceral and epididymal white adipose tissue were removed, weighed, and aliquoted. One portion for biochemical analyses was frozen immediately in liquid nitrogen and another for histological analyses and immunohistochemistry assays was preserved in 4% Paraformaldehyde (PFA) solution. The weight of all tissues was normalized by the final body weight of the animal.

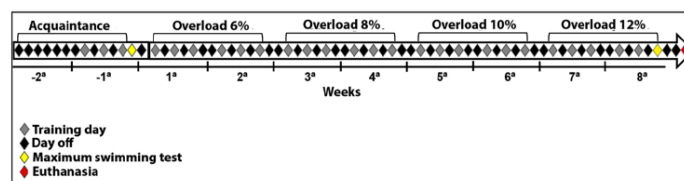


Fig. 1. Graphical representation of the experimental design. Two weeks before the study period, animals were acclimated to the aquatic venue for the swimming HIIE program. Maximum swim tests were performed at day 0 and the last day.

2.5. Food consumption

Animals in individual cages were fasted for 12 h followed by the addition of chow (100 g). The food remaining was weighted every 2 h for 8 h. This test was conducted for all experimental groups.

2.6. Orexigenic and anorexigenic neurotransmitters expression analysis by RT-PCR

Hypothalamic RNA was isolated using the RNeasy Plus RNA tissue Miniprep System kit (Promega). The concentration and purity of RNA samples were evaluated by the ratio of absorbances at 260 and 280 nm using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.). One microgram of the total RNA was used to synthesize cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Pro-opiomelanocortin (POMC) and Neuropeptide Y (NPY) mRNA expression levels were assessed by real-time RT-PCR using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) with 5 ng of cDNA and primer pairs specific to the target (Table 1). Reactions were executed on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with a thermocycling protocol consisting of 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C and ending with a denaturation curve ranging from 60° to 95°C, allowing distinction of specific products. The results were analyzed by the method of relative quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.7. Histology and immunohistochemistry

2.7.1. Tissue processing

White adipose tissue was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and dehydrated with a series of ethyl alcohol solutions (Isolar, Brazil) of increasing concentrations (from 70% to 90% for 40 min each before two 1 h incubations in 100%). Next, tissues were clarified and prepared for the infiltration of paraffin with three, 20-min incubations in 100% xylol (Isolar, Brazil). Subsequently, the adipose tissue was submitted to 2 paraffin baths of 50 min each. At the end of the last bath, the samples were included in the Leica EG1150H inclusion center (Leica Biosystems, USA), where the samples were placed in metal molds and submerged in paraffin to form a paraffin block. After solidification, the samples were cut on a Rotatory Microtome CUT 5062 (Slee Medical GMBH, Germany) in 5 µm thick, staggered sections for subsequent hematoxylin and eosin staining as well as immunohistochemistry analysis.

2.7.2. H&E technique

Slides with histological sections were placed in an oven at 56 °C for 24 h to melt the maximum paraffin impregnated in the tissue. Next, paraffin was removed by 3 successive baths in 100% xylene for 5 min each followed by baths in decreasing percentages of ethyl alcohol (100%, 90%, and 70%), also for 5 min each. After a 2-min bath in distilled water, the sections were stained with hematoxylin (Harris's Hematoxylin solution 100%; Erviegas EP-11-20571) for 3 min and washed under running water. Subsequently, the slides were dipped for 2 min in a 0.5% alcoholic solution of eosin (Eosin A alcoholic solution 0.5%; Merck Product #102439) and washed under running distilled water for 5 min. Then submitted to baths with increasing concentrations

of ethyl alcohol (70%, 90%, and 100%) for 5 min each for tissue dehydration and three consecutive xylol baths. The slides were then mounted with Entellan (Merck Millipore, Germany) (de Almeida et al., 2021).

2.7.3. Immunohistochemistry

Sections on glass slides were placed in an oven at 56 °C for 24 h to soften the paraffin present in the tissues and then submitted to the deparaffinization process with 3 consecutive 100% xylol baths for 3 min each for complete removal of paraffin. Next, slides were immersed in baths with decreasing percentages of ethyl alcohol (100%, 90%, and 70%). Immunohistochemistry utilized the avidin-biotin-peroxidase approach employed in the Vectastain kit (Vector Laboratories, USA). Slides were placed in a humidified chamber and endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide for 30 min followed by three rinses in phosphate-buffered saline containing 0.2% Tween20® detergent (PBS-T) for 5 min each. Antigen was retrieved by submerging slides in Tris-EDTA buffer (pH 9.0) and three rounds of maximum microwave power for 5 min, rest at room temperature for 5 min each and a 10 min incubation on ice. Next, slides were placed in sodium citrate buffer (pH 6.0) and microwaved 2 times at power 6 for 5 and 3 min with 10 min intervals on ice. Sections were then washed twice in PBS-T for 5 min each before blocking nonspecific sites with 3% bovine serum albumin in PBS. Next, sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies against CD31 (Abcam ab28364, 1:25 dilution) or UCP1 (Sigma U6382, 1:500 dilution). After three washes in PBS-T, sections were incubated with secondary antibody conjugated with biotin (SPD060 - Spring Bioscience, USA) for 1 h and then with streptavidin (SPD-060 - Spring Bioscience, USA) also for 1 h. After washing with PBS-T, a drop of diaminobenzidine (DAB) (SPD-060 - Spring Bioscience, USA) was applied to each section for 1 min, always checking the staining of the tissue. The reaction was stopped with distilled water. The material was counterstained with hematoxylin for 5 s and then the samples were dehydrated, diaphanized, and mounted with Entellan. All negative controls followed the same protocol with omission of the primary antibody (Merck Millipore, Germany). (Andrade et al., 2021).

2.7.4. Imaging of histological sections

Fifteen digital images of random fields of white adipose tissue were captured on an Olympus DP72 high-resolution camera (Olympus Corporation, Japan) coupled with an Olympus BX53 microscope (Olympus Corporation, Japan) (Almeida et al., 2017).

2.7.5. Quantification of vessels

The quantification of vessels and adipocytes was performed using the STEPanizer program to perform the calculation of stereological parameters (Tschanz et al., 2011). For vessel and adipocyte counts, a separate count of the test area was performed in all captured fields. For the calculation of vessels per area (QA) the following formula was used:

$$Q_A = \frac{NO. of vessel \sin test area}{area test (\mu m^2)}$$

2.7.6. Quantification of adipocyte area

For this analysis, eight images were evaluated from different fields for each animal for a total of four animals per experimental group. In each field, we analyzed five adipocytes, in which we measured the smallest and largest diameter to calculate the area of the adipocytes as previously described (Osman et al., 2013). For each adipocyte, the diameter was calculated as the arithmetic mean of the smallest and largest diameter.

2.7.7. Qualitative analysis of UCP1

A qualitative analysis of the presence or absence of UCP1 marking in white adipose tissue was performed, where 0 = absent, 1 = little marking, 2 = intermediate marking, and 3 = high marking as described

Table 1

Primers sequences.

Primers Forward	Reverse	Sequences	Product Size
POMC	POMC	5'-GAAGGTGTACCCCAATGTCC-3' 5'-CTTCTCGGAGGTCATGAAGC-3'	211 bp
NPY	NPY	5'-TGTGGTGATGGGAATGAAA-3' 5'-CAGGCAGACTGGTTTCACAG - 3'	87 bp
βACTIN	βACTIN	5'-CACTTTGTACAATGAGCTCCG - 3' 5'-CTGGATGGCTACGTACATGG-3'	148 bp

by Zimmermann et al. (2014).

2.8. Statistical analysis

GraphPad Prism 8.0 software was used for data analysis. Comparisons were made using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons, three-way ANOVA (consumption every 2 h) and a Kruskal-Wallis test for non-parametric measures (UCP-1 labeling intensity). Interventions' effect size (η^2) was calculated in Microsoft Excel for Final Weight, Food Consumption, *Pomc* and *Npy* mRNA expression, white adipose tissue weight, adipocyte area, number and ratio CD31/adipocyte area and UCP1 labeling. An effect size was considered low when $\eta^2 < 0.01$, moderate when $\eta^2 < 0.06$ and high when $\eta^2 > 0.14$. The results were expressed as mean \pm SD and the accepted significance level was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of HIIE and IF on swimming performance

The animals submitted to the training protocol achieved higher maximum swimming times after the treatment period when compared to the sedentary groups (Fig. 2) (C: 124.35 \pm 33.35 s; HIIE: 166.68 \pm 41.44 s; IF: 118.66 \pm 27.0 s; HIIE/IF: 168.5 \pm 46.22 s). However, it is important to point out that only the group that combined the two treatments obtained better performance when compared to their initial moment (Before: HIIE/IF: 134.15 \pm 25.49 s; After: HIIE/IF: 168.5 \pm 46.22).

3.2. Influence of IF and HIIE on body composition

To observe how the combination of HIIE and IF could impact body composition, animals subjected to different protocols had their weight measured weekly and thus it was observed the initial weight (Fig. 3A), the final weight (Fig. 3B) and followed the evolution of weight gain of these animals (Figs. 3C and 3D). Animals submitted to IF presented less weight gain when compared to the control groups (ad libitum diet) (C: 358.2 g \pm 31.69; HIIE: 341.2 g \pm 46.01; IF: 306.2 g \pm 20.32; HIIE/IF: 293.7 g \pm 14.89; on last week; $\eta^2 = 0.45$ for IF). When comparing the initial weight to the final weight of these animals only the group that associated the two protocols (HIIE/IF) had no significant weight gain (Before: 263.2 g \pm 15.22; After: 293.7 g \pm 14.89). Animals under IF had no weight loss. It can be observed in Fig. 3D the weekly animals weight variation in the different experimental groups. Can be noticed that the IF and HIIE/IF groups presented a higher variation than the control groups. This is because the animals under restriction were weighed on fed and

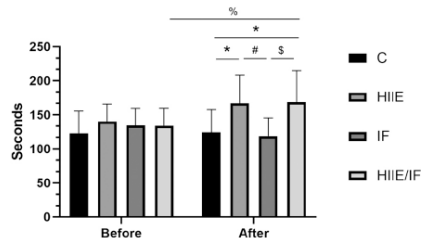


Fig. 2. Impact of HIIE and IF on physical performance. The graph shows the mean swimming time (\pm SD) of animals carrying + 12% body weight recorded from the first test and second at the end of the treatment period in the (C) Sedentary control, (HIIE) Exercised control, (IF) Sedentary intermittent fasting, and (HIIE/IF) Exercised intermittent fasting groups ($n = 19$ per group). * $P < 0.01$ x C; # $P < 0.001$ x HIIE, # $P < 0.001$ x IF, # $P < 0.05$ x HIIE/IF.

non-fed days since they were always weighed on Mondays. To observe if this weight difference between the groups was related to the accumulation of visceral white fat, the tissue was collected and weighed at the end of the treatment. The weight of the white adipose tissue (WAT), both visceral and epididymal, was normalized by the body weight of the animals in the last week of treatment (Fig. 3E) (C: 0.0076 \pm 0.0017; HIIE: 0.00802 \pm 0.003; IF: 0.00703 \pm 0.0023; HIIE/IF: 0.00571 \pm 0.00175; $\eta^2 = 0.06$ for HIIE, $\eta^2 = 0.02$ for IF). Despite the lower body weight and a moderate effect size of IF on WAT weight, there was no statistical difference between the content of WAT between animals subjected to the IF protocol and animals on a free diet.

3.3. HIIE and/or IF effect on food intake and feed control

To understand how these same protocols affected the animals' feed intake and control, chow was weighed daily throughout the treatment. The animals that went through the diet restriction protocol consumed less chow over the total treatment period (Fig. 4A) (C: 123.22 g \pm 8.05; HIIE: 119.04 g \pm 9.95; IF: 93.62 g \pm 14.14; HIIE/IF: 95.53 g \pm 11.53; $\eta^2 = 0.59$ for IF), but when the day of feed supply was offered, can be noticed that these animals ate more than the free-diet animals (Fig. 4B) (C: 123.22 g \pm 17.76; HIIE: 119.04 g \pm 20.62; IF: 187.257 g \pm 28.29; HIIE/IF: 191.07 g \pm 23.06; $\eta^2 = 0.69$ for IF). To analyze the feeding behavior of the animals, a consumption test was performed. It was observed that animals in the IF and IF/HIIE groups developed hyperphagic behavior, especially in the first two hours of food supply (Fig. 4C). Importantly, HIIE was able to reduce food intake in the initial hours when compared to the other groups, but when associated with intermittent fasting, this effect is lost (C: 9.22 g \pm 1.98; HIIE: 6.44 g \pm 1.74; IF: 15.11 g \pm 2.71; HIIE/IF: 13.55 g \pm 3.24). Even after 4 h of feeding, the consumption of animals under the HIIE protocol was still lower than those who associated HIIE with IF and a strong trend towards the IF group (HIIE: 5.22 g \pm 2.10; IF: 10 g \pm 4.47; HIIE/IF: 8.66 g \pm 2.59). This phenomenon of hyperphagia had already been observed in the literature by (Chausse et al., 2014), and it occurs, according to their study, due to alterations in orexigenic and anorexigenic neurotransmitters.

To measure whether the protocols would be able to modulate these neurotransmitters, two important neurotransmitters that regulate eating behavior, NPY (Fig. 4D), known to be orexigenic, and POMC (Fig. 4E) (C: -5.55 \pm 0.18; HIIE: 0.02 \pm 0.24; IF: 0.18 \pm 0.19; HIIE/IF: 0.19 \pm 0.23), anorexigenic, were relatively quantified through real-time RT-PCR, and it was identified a significant increase in the expression of POMC in hypothalamic tissue of animals subjected to the IF protocol ($\eta^2 = 0.15$ for IF) associated or not with training.

3.4. Impact of HIIE and IF on the morphology, structure, and WAT Browning

Hematoxylin and eosin stain the cell nucleus with purplish blue color and the cell cytoplasm and extracellular matrix in reddish to pinkish shades, respectively. In the WAT, it was observed by the histological images that the animals from groups HIIE, IF and HIIE/IF had smaller adipose cell sizes when compared to the animals from control group (Fig. 5) (C: 4559.79 $\mu\text{m}^2 \pm$ 432.40; HIIE: 1752.64 $\mu\text{m}^2 \pm$ 176.80; IF: 2462.28 $\mu\text{m}^2 \pm$ 331.02; HIIE/IF: 1173.09 $\mu\text{m}^2 \pm$ 104.46; $\eta^2 = 0.88$ for IF, $\eta^2 = 0.94$ for HIIE, $\eta^2 = 0.69$ for interaction). Additionally, in both groups that exercised in association with or not IF, adipocytes displayed a smaller number of cells when compared to the IF group (Fig. 5) (C: 306.75 \pm 57.86; HIIE: 733 \pm 102.37; IF: 404.25 \pm 21.17; HIIE/IF: 809.5 \pm 178.09; $\eta^2 = 0.18$ for IF, $\eta^2 = 0.83$ for HIIE). This result led to the observation that the exercised groups presented a higher number of adipose cells in the same area.

As the literature suggests that exercise is capable of inducing changes in the molecular characteristics of adipocytes in the WAT towards brown adipose tissue, vessel formation was quantified through CD31. CD31

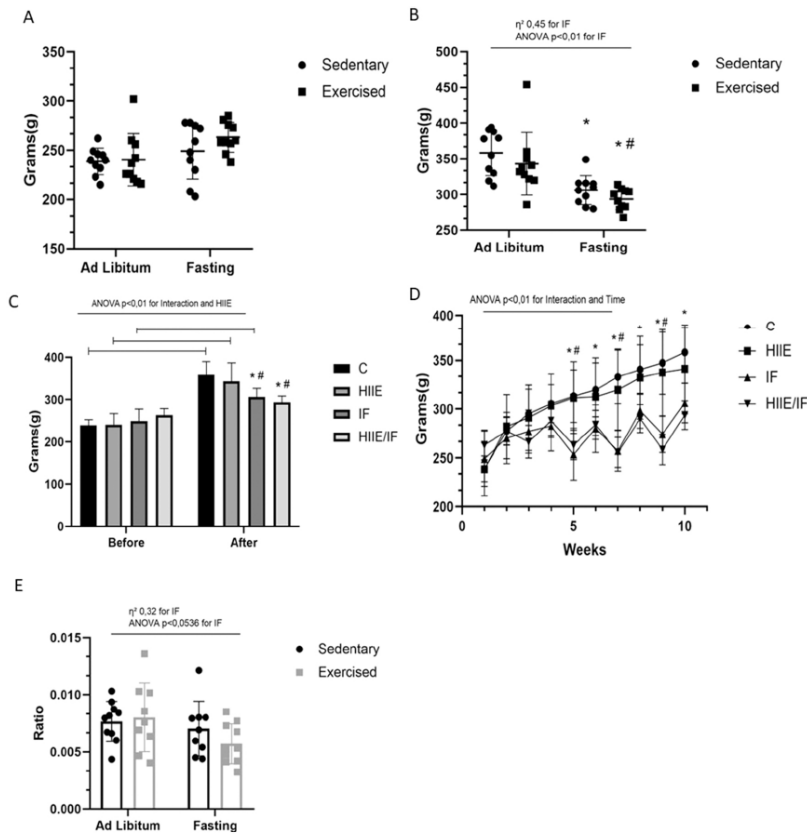


Fig. 3. Impact of diet, training, and their combination on body composition. (A) Initial weight of animals. (B) Final weight of animals. (C) Comparison of Initial X Final weight. (D) Weight gain curve across treatments. (E) Weight of white adipose tissue (visceral + epididymal) normalized by final body weight. Values are expressed as mean and \pm SD ($n = 10$ animals per group). * $P < 0.05$ x C; # $P < 0.05$ x HIIE.

labeling was normalized by the average size of the adipocytes. The HIIE group showed higher labeling than groups C and IF. Furthermore, animals in the HIIE/IF group showed higher CD31 labeling relative to adipocyte size than all other groups (Fig. 6) (C: 0.0162 ± 0.001 ; HIIE: 0.032 ± 0.003 ; IF: 0.0147 ± 0.002 ; HIIE/IF: 0.0647 ± 0.009 ; $\eta^2 = 0.76$ for IF, $\eta^2 = 0.93$ for HIIE, $\eta^2 = 0.79$ for Interaction), suggesting the prevalence of the effect of training on these parameters and a synergism between IF and HIIE.

To further evaluate the possibility of browning in WAT, the level of UCP-1 was determined by immunostaining. It was observed that the exercised animals, showed higher UCP-1 intensity in comparison to animals in C group, and the animals that combined HIIE with IF had the highest expression of this protein (Fig. 7). Effect size suggests a high impact of IF ($\eta^2 = 0.37$) and HIIE ($\eta^2 = 0.81$), and a moderate impact of interaction ($\eta^2 = 0.06$), suggesting that the WAT in exercised animals had a greater propensity to undergo the browning process.

4. Discussion

Morphological and biochemical changes in adipose tissue that influence weight in rats can be induced, independently, by both HIIE (Holloway et al., 2015; Pimenta et al., 2015) and IF (Katare et al., 2009; Martel et al., 2018). Recent studies suggest that their combination could lead to synergistic effects on rat skeletal muscle metabolism (Real-Hohn et al., 2018). Here, we aimed to examine their possible synergy on physical performance, feeding behavior as well as the morphology and biochemistry of adipocytes in rats subjected to both protocols.

As expected, animals in the HIIE groups presented longer swimming time in the final test. A significant difference was seen for the HIIE/IF group when comparing the swimming time before and after the study period. This is consistent with Martínez-Rodríguez et al. (2021) study, which found an increase in countermovement jump in active women that trained with a HIIE protocol (3×10 bouts of 30 s with 30 s rest) concomitant with 14 h of intermittent fasting. This improvement in physical performance can be explained by an increase in muscle mass and strength as well as an optimization in anaerobic energy metabolism

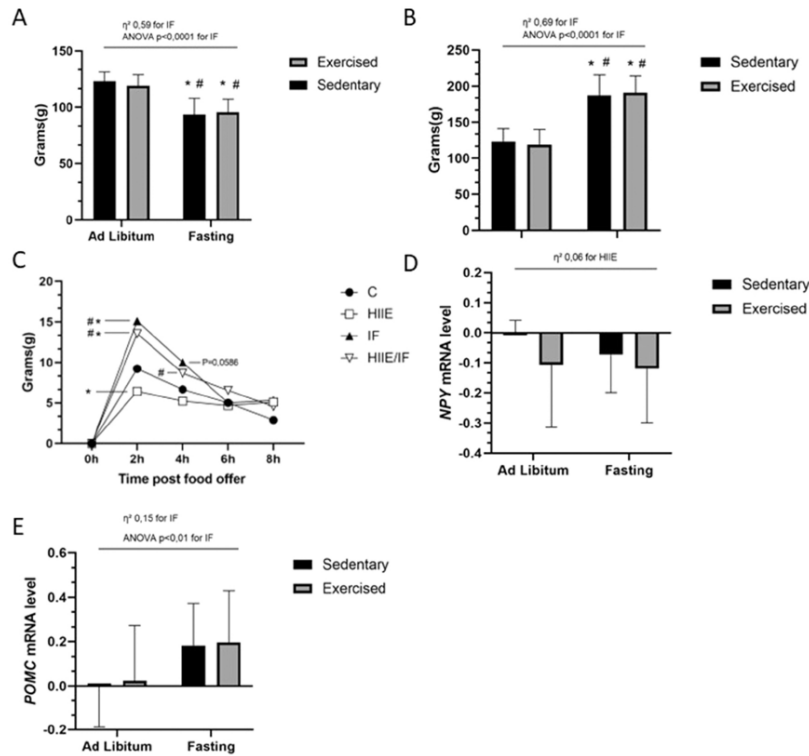


Fig. 4. HIIE and IF affect feeding behavior feed intake and control. (A) Average feed intake over the total treatment time. (B) Average feed intake on chow offer days for IF group. (C) Consumption after a 12 h fasting measured every 2 h. (D) Hypothalamic expression levels of NPY (D) and POMC (E) assessed by qRT-PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n \approx 10$ animals per group). * $P < 0.05$ x C; # $P < 0.05$ x EX

(Batitucci et al., 2022; Real-Hohn et al., 2018).

Another expected effect from the interaction between HIIE and IF is the impact on body composition. It can be seen how IF had a greater impact when looking at the weight gain of animals throughout the treatment. Animals under some IF protocols began to develop a hyperphagic behavior after 4 weeks of treatment. This behavior has been ascribed to changes in appetite controlling neurotransmitters levels, such as *Pomc* (Chausse et al., 2014). Some studies have shown a decrease in *Pomc* gene expression after 4 (Gotthardt et al., 2016) or 12 (Spezani et al., 2020) weeks of IF. Others have found no statistical difference in *Pomc* mRNA expression in fasted animals subjected to IF compared to ad libitum animals, although chow was offered for 24 h (Chausse et al., 2014). A notable difference between the studies is the fed state of the animals before euthanasia. The first study utilized animals that were euthanized in a fasted state, the second 24 h after the end of the IF state and our experiment design euthanized animals 48 h after the end of IF protocol with a return to ad libitum food. This suggests an impact on *Pomc* levels by fasting that is overcorrected within 48 h. A dedicated study will be needed to determine the dynamics of *Pomc* levels in relation to fasting.

When examining adipocytes, no statistical differences in WAT content were measured across the groups, but the IF-related moderate effect size suggests an impact of intermittent fasting protocol on WAT weight.

However, the possibility of morphological and biochemical changes in these adipocytes were considered since the literature has shown that both an intermittent fasting protocols and training can generate remodeling of adipose cells (Ye et al., 2019). Furthermore, training is capable of the same feat without weight loss even in humans (Ahn et al., 2022). Noticeable morphological changes in adipocytes were observable in WAT from animals subjected to the HIIE training.

An important change in the adipocytes was the remodeling towards brown adipose tissue through the browning process. This can contribute to the improvement in their metabolic profile as well as to thermogenesis (Verma et al., 2020). One of the tools used to identify the browning process in these adipocyte cells was the identification of new blood vessels and alteration of gene expression related to brown adipose tissue (Xia et al., 2021). The CD31 molecule is an excellent identifier of endothelium formation (Delisser et al., 1993; Liu & Shi, 2012) because unlike other markers, such as VEGF, that are induction factors and do not identify the presence of endothelium, CD31 identifies tissue formation.

Here, it was possible to observe through labeling of CD31 protein that only animals subjected to the HIIE protocol had higher levels of this marker. Further, there seems to be an additive effect in the HIIE/IF group. This result was unexpected as it contrasts with some studies that showed that IF alone was able to increase the expression of angiogenesis

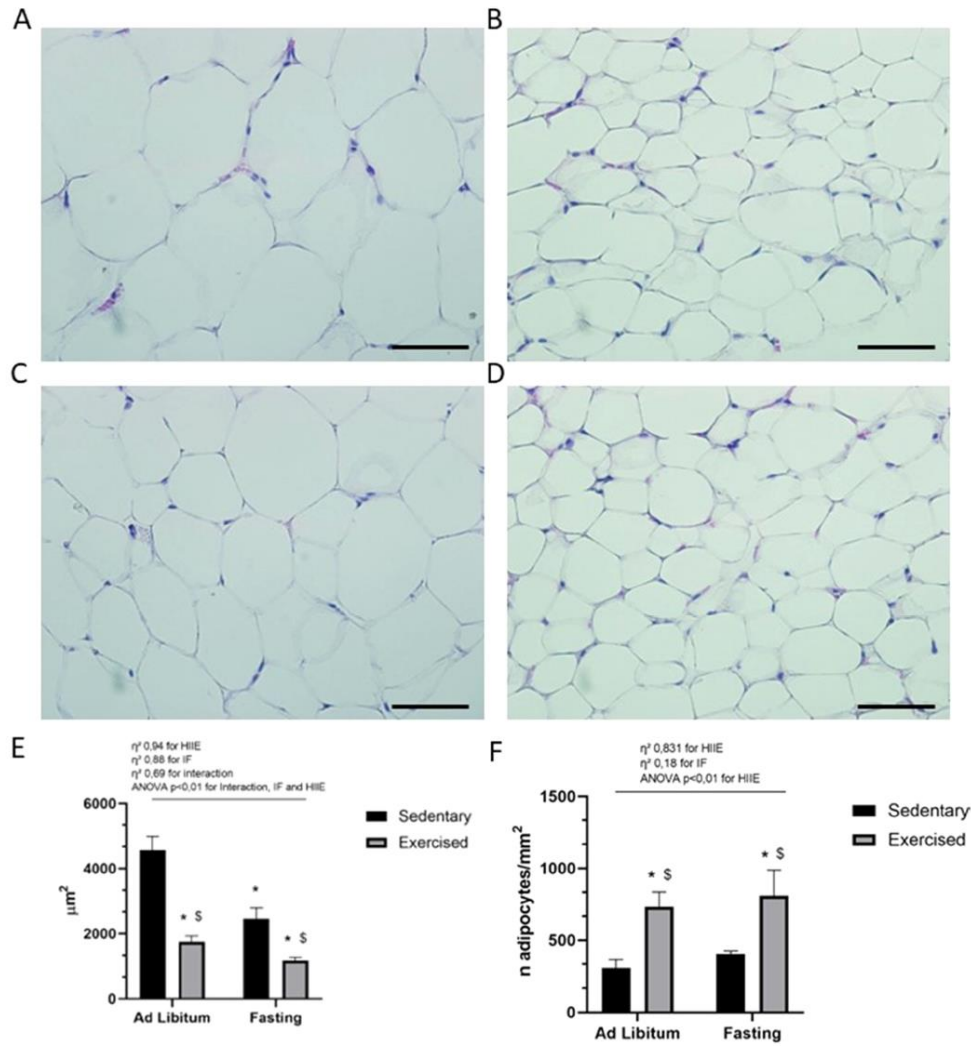


Fig. 5. Morphology of adipocytes in white adipose tissue from animals subjected to HIIE, IF and their combination. Light microscopy of H&E stained histological sections of white adipose tissue, from animals in (A) Sedentary control, (B) Exercised control, (C) Sedentary intermittent fasting, and (D) Exercised intermittent fasting. Dimensional measurements for the mean size (E) and number of adipocytes (F). Values are expressed as mean and \pm SD ($n = 4$ animals per group). Scale bar of 50 μm . * = $P < 0.05$ x C; # = $P < 0.05$ x HIIE, § = $P < 0.05$ x IF.

markers (Kim et al., 2017). Our data suggests that HIIE may also have a potential angiogenic effect on adipose tissue. Honkala et al. (2020) showed an increase of CD31 protein labeling on adipose tissue of healthy and insulin-resistant men that trained sprint interval training for 2 weeks, also suggesting that HIIE may play a role in adipose tissue vascularization. These changes could increase the browning process in WAT and energy metabolism in general.

Moreover, one of the most used markers to identify the browning

process of white adipose tissue cells is the UCP-1 expression which is involved in the thermogenic capabilities to these cells (Bargut et al., 2016). As its expression can be regulated by exercise training (Flouris et al., 2017), the animals submitted to the HIIE protocol here did show higher levels of expression of this protein. Interestingly, the animals subjected to the IF protocols showed a high effect size in UCP-1 levels that is lower than effect size in the HIIE group. Interaction between interventions also showed a moderate impact, suggesting that IF and

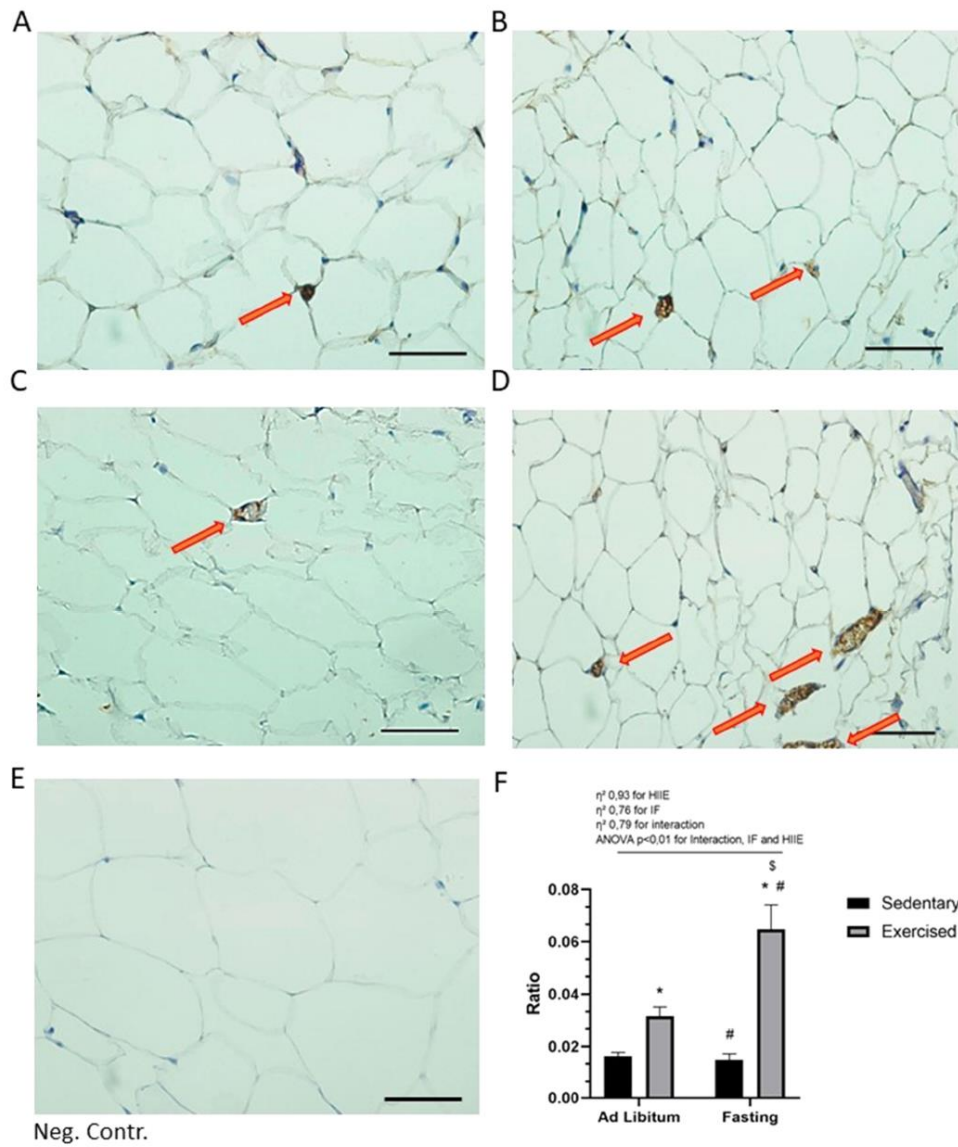


Fig. 6. Characterization of adipocyte tissue from animals subjected to HIIE, IF, or both. Light microscopy of histological sections of white adipose tissue, immunostained for CD31 (brown coloring) as a biomarker for browning. Representative fields from (A) Sedentary control, (B) Exercised control, (C) Sedentary intermittent fasting, and (D) Exercised intermittent fasting along with a negative control (E). Red arrows indicate sites with the high CD31 labeling intensity. (F) CD/31 staining normalized by adipocyte size. Values are expressed as mean and \pm SD (n = 4). * $P < 0.05$ x C; # $P < 0.05$ x HIIE, $^{\$}P < 0.05$ x IF. Scale bar 50 μ m.

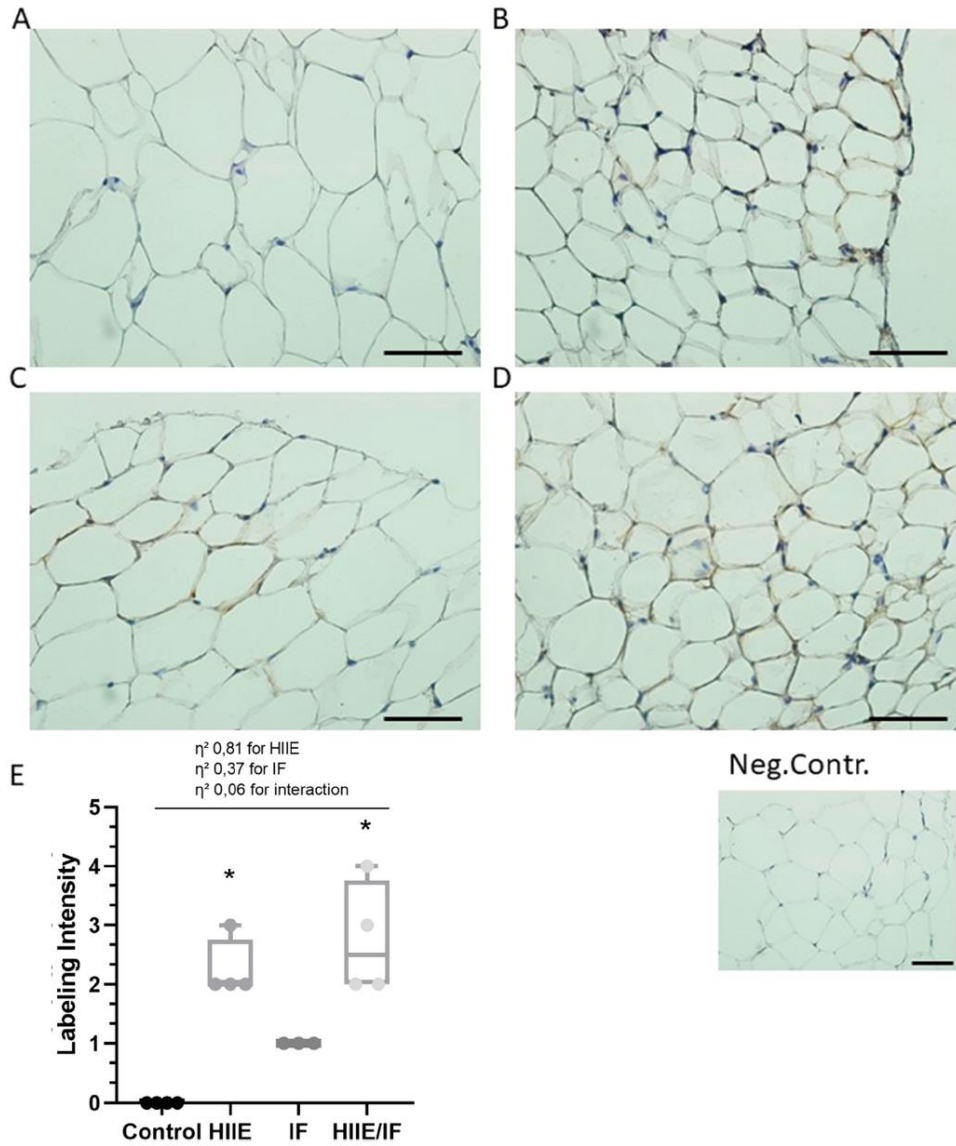


Fig. 7. Characterization of adipocyte tissue from animals subjected to HIIE, IF, or both. Light microscopy of histological sections of white adipose tissue, immunostained for UCP1 (brown coloring) as a biomarker for browning. Representative fields from (A) Sedentary control, (B) Exercised control, (C) Sedentary intermittent fasting, and (D) Exercised intermittent fasting along with a negative control (lower right panel). (E) Label intensity of staining for UCP1. Values are expressed as median, min.to max. and \pm SD (n = 4). * P < 0.05 x C (n = 4). Scale bar 50 μ m.

HIE together, may impact UCP1 expression, which has been reported (Ahn et al., 2022; Rodrigues et al., 2018). The increase in UCP-1 protein expression can also be explained by the increase in POMC expression in hypothalamus. Dodd et al. (2015) showed that the increase in UCP1 protein expression in WAT is partially dependent of POMC neurons activation. Ropelle et al. (2010) suggested that exercise training can restore *Pomc* mRNA expression in diet-induced obese and leptin-deficient (*ob/ob*) mice. Overall, the improvements in physical performance and weight maintenance appear attributable to the HIE training and IF protocol, respectively, while the changes in the adipocyte morphology and profile (CD31 and UCP1 expressions) suggest a possible synergistic effect of both interventions together in promoting the browning process in WAT.

The present study aimed to evaluate the impact of an 8-week protocol of HIE and IF, concomitant or not, on swimming performance, body composition, and feeding behavior along the morphology of WAT in healthy male Wistar rats. As described by Real-Hohn et al. (2018), HIE and IF together increase physical performance that can be partially explained by an optimization of energy metabolism in skeletal muscle. The data here suggest that this can also extend to WAT metabolism through a browning process as observed by an impact of HIE and IF, alone and together, in CD31 and UCP-1 levels. The role of IF in this process may be related to an increase in *Pomc* mRNA expression in hypothalamus. We also found a hyperphagic effect of IF like others, although more studies are necessary to evaluate the effect of exercise training on maintenance of this behavior in rats subjected to an IF protocol, since exercise alone can reduce food intake.

Funding

This work received a careful attention to English during revision of the manuscript by Dr. D. William Provenca Jr. Financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Authorship contributions

Category 1 Conception and design of study: E.L. Cardoso, M. Vaisman, V.P. Salerno; Acquisition of data: E.L. Cardoso, I.E. Miranda, C.B. Andrade, R.A. Barbosa; Analysis and/or interpretation of data: E.L. Cardoso, F. Cahué, V.P. Salerno, I.E. Miranda, C.B. Andrade, M.L. Sant'Anna. Category 2 Drafting the manuscript: E.L. Cardoso, F. Cahué, V.P. Salerno; Revising the manuscript critically for important intellectual content: E.L. Cardoso, F. Cahué, T.M. Ortiga-Carvalho, V.P. Salerno. Category 3 Approval of the version of the manuscript to be published (the names of all authors must be listed): E.L. Cardoso, F. Cahué, I.E. Miranda, C.B. Andrade, R.A. Barbosa, M.L. Sant'Anna, T.M. Ortiga-Carvalho, M. Vaisman, V.P. Salerno.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript (e.g., technical help, writing and editing assistance, general support), but who do not meet the criteria for authorship, are named in the Acknowledgements and have given us their written permission to be named. This statement is signed by all the

authors.

Authorship statement

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Tissue and Cell* journal.

References

- Ahn, C., Ryan, B.J., Schleh, M.W., Varshney, P., Ludzki, A.C., Gillen, J.B., van Pelt, D.W., Pitchford, L.M., Howton, S.M., Rode, T., Hummel, S.L., Burant, C.F., Little, J.P., Horowitz, J.F., 2022. Exercise training remodels subcutaneous adipose tissue in adults with obesity even without weight loss. *J. Physiol.* 600, 2127–2146. <https://doi.org/10.1113/JP282371>.
- Almeida, M.M., Diaz-Rocha, C.P., Souza, A.S., Muro, M.F., Mendonca, L.S., Pazos-Moura, C.C., Trevenzoli, I.H., 2017. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br. J. Nutr.* 118, 788–803. <https://doi.org/10.1017/S0007114517002884>.
- de Almeida, M.M., Diaz-Rocha, C.P., Reis-Gomes, C.F., Wang, H., Cordeiro, A., Pazos-Moura, C.C., Jose-Moore, L., Trevenzoli, I.H., 2021. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot-specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. *Eur. J. Nutr.* 60, 1313–1326. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02318-w>.
- Andrade, C.B.V., Monteiro, V.R., de, S., Coelho, S.V.A., Gomes, H.R., Sousa, R.P.C., Nascimento, V.M., de, O., Bloise, F.F., Matthews, S.G., Bloise, E., Arruda, L.B., Ortiga-Carvalho, T.M., 2021. ZIKV disrupts placental ultrastructure and drug transporter expression in mice. *Front Immunol.* 12, 1821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689246>/BIBTEX.
- Bargut, T.C.L., Aguilu, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2016. Brown adipose tissue: updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell* 48, 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.08.001>.
- Batistucci, G., Faria Junior, E. v., Nogueira, J.E., Brandão, C.F.C., Abud, G.F., Ortiz, G.U., Marchini, J.S., Freitas, E.C., 2022. Impact of Intermittent Fasting Combined With High-Intensity Interval Training on Body Composition, Metabolic Biomarkers, and Physical Fitness in Women With Obesity. *Front Nutr* 9, 1032. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.84305>/BIBTEX.
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A.I., Surmiak, M., Hubalewska-Mazgaj, M., Pokorski, J., Nitecki, J., Nitecka, E., Pokorska, J., Targosz, A., Ptak-Belowska, A., Zoladz, J.A., Brzozowski, T., 2020. Effect of acute sprint exercise on myokines and food intake hormones in young healthy men. *Int J. Mol. Sci.* 21, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21228848>.
- Blundell, J.E., King, N.A., 2000. Exercise, appetite control, and energy balance. *Nutrition* 16, 519–522. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00250-1).
- Caldeira, R.S., Panissa, V.L.G., Inoue, D.S., Campos, E.Z., Monteiro, P.A., Giglio, B., de, M., Pimentel, G.D., Hofmann, P., Lira, F.S., 2018. Impact to short-term high intensity intermittent training on different storages of body fat, leptin and soluble leptin receptor levels in physically active non-obese men: a pilot investigation. *Clin. Nutr.* ESPEN 26, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.08.005>.
- Casimiro-Lopes, G., Alves, S.B., Salerno, V.P., Passos, M.C.F., Lisboa, P.C., Moura, E.G., 2008. Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. *Horm. Metab. Res.* 40, 276–280. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1046799>.
- Chause, B., Solon, C., Caldeira da Silva, C.C., Masselli dos Reis, I.G., Manchado-Gobatto, F.B., Gobatto, C.A., Velloso, L.A., Kowaltowski, A.J., 2014. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. *Endocrinology* 155, 2456–2466. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2057>.
- Delisser, H.M., Newman, P.J., Albelda, S.M., 1993. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 184, 37–45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78253-4_3/COVER.
- Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.Y., Kahn, B.B., Neel, B.G., Bence, K.K., Andrews, Z.B., Cowley, M.A., Tiganis, T., 2015. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.022>.
- Eshghinia, S., Mohammadzadeh, F., 2013. The effects of modified alternate-day fasting diet on weight loss and CAD risk factors in overweight and obese women. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-4>.
- Flouris, A.D., Dinas, P.C., Valente, A., Andrade, C.M.B., Kawashita, N.H., Sakellariou, P., 2017. Exercise-induced effects on UCP1 expression in classical brown adipose tissue: A systematic review. *Horm Mol Biol Clin Investig* 31. <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2016-0048>.
- Gibala, M.J., Jones, A.M., 2013. Physiological and performance adaptations to high-intensity interval training. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* 76, 51–60. <https://doi.org/10.1159/000350256>.

- Gibala, M.J., Little, J.P., Van Essen, M., Wilkin, G.P., Burgomaster, K.A., Safdar, A., Raha, S., Tarnopolsky, M.A., 2006. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J. Physiol.* 575, 901–911. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112094>.
- Gotthardt, J.D., Verpeut, J.L., Yeomans, B.L., Yang, J.A., Yasrebi, A., Roepke, T.A., Bello, N.T., 2016. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide Y gene expression in diet-induced obese male mice. *Endocrinology* 157, 679–691. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1622>.
- Grajower, M.M., Horne, B.D., 2019. Clinical management of intermittent fasting in patients with diabetes mellitus. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11040873>.
- Holloway, T.M., Bloembergen, D., da Silva, M.L., Simpson, J.A., Quadraltero, J., Spriet, L.L., 2015. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121138>.
- Honkala, S.M., Motiani, P., Kivela, R., Hemantakumar, K.A., Tolvanen, E., Motiani, K.K., Eskelinen, J.J., Virtanen, K.A., Kempainen, J., Heiskanen, M.A., Lyytyniemi, E., Nuutila, P., Kalliokeki, K.K., Hannukainen, J.C., 2020. Exercise training improves adipose tissue metabolism and vasculature regardless of baseline glucose tolerance and sex. *BMJ Open Diabetes Res Care* 3, e000830. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-000830>.
- Katara, R.G., Kakimura, Y., Arikawa, M., Yamazaki, F., Sato, T., 2009. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signalling pathway. *J. Mol. Cell Cardiol.* 46, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.10.027>.
- Katch, V.L., Martin, R., Martin, J., 1979. Effects of exercise intensity on food consumption in the male rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1401–1407. <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.7.1401>.
- Kim, K.-H., Kim, Y.H., Son, J.E., Lee, J.H., Kim, S., Cho, M.S., Moon, J.H., Zhong, J., Fu, K., Lenglin, F., Yoo, J.-A., Bilan, P.J., Klip, A., Nagy, A., Kim, J.-R., Park, J.G., Hussein, S.M., Doi, K.-O., Hui, C., Sung, H.-K., 2017. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Res* 27, 1309–1326. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.126>.
- Liu, L., Shi, G.-P., 2012. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res* 94, 3–5. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs108>.
- Martel, C., Pinçon, A., Belanger, A.M., Luo, X., Gillis, M.-A., de Montgolfier, O., Thorin-Trescases, N., Thorin, E., 2018. Knockdown of angiotensin-like 2 mimics the benefits of intermittent fasting on insulin responsiveness and weight loss. *Exp. Biol. Med.* 243, 45–49. <https://doi.org/10.1177/1535370217745505>.
- Martínez-Rodríguez, A., Rubio-Arias, J.A., García-De Frutos, J.M., Vicente-Martínez, M., Gunnarsson, T.P., Langbecker, A., 2021. Effect of high-intensity interval training and intermittent fasting on body composition and physical performance in active women. *mdpi.com* 18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126431>.
- Morales, R.C.M., de Portari, G.V., Ferraz, A.S.M., da Silva, T.E.O., Marocolo, M., 2017. Effects of intermittent fasting and chronic swimming exercise on body composition and lipid metabolism. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 42, 1341–1346. <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0435>.
- Osman, O.S., Selway, J.L., Kępczyńska, M.A., Stocker, C.J., O'Dowd, J.F., Cawthorne, M.A., Arch, J.R., Jassim, S., Langlands, K., 2013. A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. *Adipocyte* 2, 160–164. <https://doi.org/10.4161/adip.24652>.
- Otero-Díaz, B., Rodríguez-Flores, M., Sánchez-Muñoz, V., Monraz-Praciado, F., Ordoñez-Ortega, S., Becerril-Elias, V., Baay-Guzmán, G., Obando-Monge, R., García-García, E., Palacios-González, B., Villarreal-Molina, M.T., Sierra-Salazar, M., Antuna-Puente, B., 2018. Exercise induces white adipose tissue browning across the weight spectrum in humans. *Front Physiol.* 9, 1781. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01781>.
- Picó, C., Palou, M., Pomar, C.A., Rodríguez, A.M., Palou, A., 2022. Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 23, 13–30. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09667-5/FIGURES/5>.
- Pimenta, M., Bringenti, I., Souza-Mello, V., dos Santos Mendes, I.K., Aguilá, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2015. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sci.* 139, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.08.004>.
- Real-Hohn, A., Navegantes, C., Ramos, K., Ramos-Filho, D., Cahué, F., Galina, A., Salerno, V.P., 2018. The synergism of high-intensity intermittent exercise and every-other-day intermittent fasting regimen on energy metabolism adaptations includes hexokinase activity and mitochondrial efficiency. *PLoS One* 13, e0202784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202784>.
- Rocha, G.L.D., Crisp, A.H., Oliveira, M.R.M.D., Silva, C.A.D., Silva, J.O., Duarte, A.C.G.O., Sene-Flores, M., Verjengis, R., 2016. Effect of high intensity interval and continuous swimming training on body mass adiposity level and serum parameters in high-fat diet fed rats. *Sci. World J.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2194120>.
- Rodrigues, K.C., da C., Pereira, R.M., Campos, T.D.P., de Moura, R.F., de Silva, A.S.R., da Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Araújo, M.B., de Moura, L.P., de 2018. The role of physical exercise to improve the browning of white adipose tissue via POMC neurons. *Front Cell Neurosci.* 12, 88. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00088>.
- Rodríguez-Bies, E., Calvo, S.S.C., Fontan-Lozano, A., Amaro, J.P., Berral de la Rosa, F.J., Carrion, A.M., Navas, P., Lopez-Lluch, G., 2010. Muscle physiology changes induced by every other day feeding and endurance exercise in mice: effects on physical performance. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013900>.
- Ropelle, E.R., Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., Marin, R.M., Oliveira, A.G., Augusto, T.M., Carvalho, H.F., Velloso, L.A., Saad, M.J.A., Carvalheira, J.B.C., 2010. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *e1000465 PLoS Biol.* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000465>.
- Spezani, R., da Silva, R.R., Martins, F.F., de Souza Marinho, T., Aguilá, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2020. Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 83, 109419. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.109419>.
- Stutts, W.C., 2002. Physical activity determinants in adults perceived benefits. *Barriers Self Effic.* 50.
- Tschanz, S.A., Burri, P.H., Weibel, E.R., 2011. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J. Microsc.* 243, 47–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03481.x>.
- Varkaneh Kord, H., M., Tinsley, G., O., Santos, H., Zand, H., Nazary, A., Fatahi, S., Mokhtari, Z., Salehi-sahlabadi, A., Tan, S.C., Rahmani, J., Gaman, M.A., Sathian, B., Sadeghi, A., Hatami, B., Soltanieh, S., Aghamiri, S., Bawadi, H., Hekmatdoost, A., 2021. The influence of fasting and energy-restricted diets on leptin and adiponectin levels in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Nutr.* 40, 1811–1821. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.10.034>.
- Verma, N., Thakkar, N., Phillips, J., Easley, K., Sung, H.K., 2020. Dynamic remodeling of white adipose tissue by intermittent fasting. *Curr. Opin. Food Sci.* 34, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.023>.
- Warburton, D.E.R., Nicol, C.W., Bredin, S.S.D., 2006. Health benefits of physical activity: the evidence. *BMJ* 332, 913–914. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7756.913>.
- Xia, J., Zhu, H., Zhu, S., Ge, J., Wang, Z., Lu, F., Liao, Y., Cai, J., 2021. Induced beige adipocytes improved fat graft retention by promoting adipogenesis and angiogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 147, 549–558. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000008227>.
- Ye, Y., Liu, H., Zhang, F., Hu, F., 2019. mTOR signaling in brown and beige adipocytes: implications for thermogenesis and obesity. *Nutr. Metab.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0404-1>.
- Zimmermann, A.K., Camenisch, U., Rechsteiner, M.P., Bode-Lesniewska, B., Rössle, M., 2014. Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 122, 48–58. <https://doi.org/10.1002/CNCY.21352>.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo aqui apresentado teve como objetivo observar e avaliar os efeitos da combinação da Alimentação Intermitente, que é uma estratégia dietética com grande visibilidade na atualidade com um protocolo de exercícios de alta intensidade, o HIIT e seus efeitos na *performance* de nado, na morfologia e bioquímica do tecido adiposo e também as possíveis alterações do comportamento alimentar dos ratos submetidos a esses tratamentos.

Compreender esses mecanismos é de extrema importância, pois as duas estratégias são consideradas importantes aliados ao combate à obesidade e entender como a combinação dessas estratégias se dá à nível celular, pode trazer grande contribuição à população.

Observa-se que o treinamento tem um impacto significativo no aumento da *performance* de nado bem como na morfologia dos adipócitos e que a associação entre as duas estratégias tem um efeito potencializador desses achados. Como esperado a AI levou ao desenvolvimento do comportamento hiperfágico, embora o treinamento tenha reduzido a necessidade de ingestão alimentar, a associação dos protocolos não foi capaz de mitigar a hiperfagia desenvolvida. É interessante observar que a AI sozinha não foi capaz de gerar alterações significativas em grande parte dos indicadores avaliados, porém quando associada ao HIIT, ela foi capaz de potencializar os efeitos benéficos do exercício sobre os indicadores avaliados.

Em termos práticos, esse estudo chama atenção para os cuidados necessários ao se utilizar esse modelo de intervenção dietética, visto que o mesmo pode causar alterações comportamentais que levam a hiperfagia. Além disso, a utilização de um protocolo de HIIT pode trazer grandes benefícios à saúde metabólica.

É possível reconhecer as limitações do estudo, como por exemplo não ter sido possível analisar os núcleos hipotalâmicos de maneira isolada, visto que tanto as ações quanto a produção de neurotransmissores podem variar de núcleo para núcleo; além disso, seria interessante observar o impacto dessas intervenções em ratos obesos, uma vez que a obesidade irá afetar a produção

de hormônios sinalizadores para o hipotálamo e todas as cascatas de sinalização adiante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. M. I. Central and peripheral control of food intake. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 1, p. 52–70, 1 jan. 2017.

Adipocytokine Signaling Pathway - **Creative Diagnostics**. Disponível em: <<https://www.creative-diagnostics.com/adipocytokine-signaling-pathway.htm>>. Acesso em: 24 maio. 2023.

ALDISS, P. et al. Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 81, p. 63–70, 1 abr. 2018.

ANSON, R. M.; JONES, B.; DE CABO, R. The diet restriction paradigm: A brief review of the effects of every-other-day feeding. **Age**, v. 27, n. 1, p. 17–25, 2005.

ASCENSÃO, A.; FERREIRA, R.; MAGALHÃES, J. Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. **International Journal of Cardiology**, v. 117, n. 1, p. 16–30, 2007.

BATITUCCI, G. et al. Impact of Intermittent Fasting Combined With High-Intensity Interval Training on Body Composition, Metabolic Biomarkers, and Physical Fitness in Women With Obesity. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1032, 26 maio 2022.

CARLSON, J. Apparent prolongation of the lifespan of rats by intermittent fasting. p. 363–375, 1945.

CASIMIRO-LOPES, G. et al. Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, n. 4, p. 276–280, 2008.

CATENACCI, V. A.; HILL, J. O.; WYATT, H. R. The Obesity Epidemic. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 3, p. 415–444, set. 2009.

CERQUEIRA, F. M. Efeitos da restrição calórica nas vias de sinalização por insulina e óxido nítrico: implicações para biogênese, morfologia e função mitocondriais. **São Paulo: Universidade de São Paulo**, 27 fev. 2012.

CHAOUACHI, A. et al. Effects of Ramadan intermittent fasting on sports performance and training: a review. **journals.humankinetics.com**, v. 4, p. 419–434, 2009.

CHAUSSE, B. et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014a.

- CHAUSSE, B. et al. Intermittent Fasting Induces Hypothalamic Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency, Low Body Mass and Overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 1 jul. 2014b.
- CORTE DE ARAUJO, A. C. et al. Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–8, 2012.
- DE ALMEIDA, M. M. et al. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot-specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 1313–1326, 1 abr. 2021.
- DOMASZEWSKI, P. et al. Effect of a Six-Week Intermittent Fasting Intervention Program on the Composition of the Human Body in Women over 60 Years of Age. **International Journal of Environmental Research and Public Health** **2020**, Vol. 17, Page 4138, v. 17, n. 11, p. 4138, 10 jun. 2020.
- FEDORENKO, A.; LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 400–413, 12 out. 2012.
- FLETCHER, G. F. et al. Statement on Exercise: Benefits and Recommendations for Physical Activity Programs for All Americans. **Circulation**, v. 94, n. 4, p. 857–862, 1996.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216–229, abr. 2006.
- FOSTER-SCHUBERT, K. E.; CUMMINGS, D. E. Emerging therapeutic strategies for obesity. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 7, p. 779–793, dez. 2006.
- FRAYN, K. N. et al. Integrative physiology of human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 8, p. 875–888, 1 ago. 2003.
- GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, jul. 2011.
- GIBALA, M. J. et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. **Wiley Online Library**, v. 575, n. 3, p. 901–911, set. 2006.
- GIBALA, M. J.; JONES, A. M. Physiological and performance adaptations to high-intensity interval training. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 76, p. 51–60, 2013.

GOLLISCH, K. S. C. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 2, ago. 2009.

GOTTHARDT, J. D. et al. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide Y gene expression in diet-induced obese male mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 679–691, 2016.

HARDER-LAURIDSEN, N. M. et al. Ramadan model of intermittent fasting for 28 d had no major effect on body composition, glucose metabolism, or cognitive functions in healthy lean men. **Nutrition**, v. 37, p. 92–103, maio 2017.

HASAN, A. B. M. N.; SHARIF, A. BIN; JAHAN, I. Perceived barriers to maintain physical activity and its association to mental health status of Bangladeshi adults: a quantile regression approach. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 8993, 2 jun. 2023.

HEILBRONN, L. K. et al. Glucose Tolerance and Skeletal Muscle Gene Expression in Response to Alternate Day Fasting. **Obesity Research**, v. 13, n. 3, p. 574–581, mar. 2005.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Medicine**, v. 29, n. 6, p. 373–386, 2000.

KEIPERT, S.; JASTROCH, M. Brite/beige fat and UCP1 — is it thermogenesis? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1837, n. 7, p. 1075–1082, 1 jul. 2014.

KHALAFI, M. et al. The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Male Rats. **Nutrients 2020, Vol. 12, Page 925**, v. 12, n. 4, p. 925, 27 mar. 2020.

KHALAFI, M.; SYMONDS, M. E. The impact of high-intensity interval training on inflammatory markers in metabolic disorders: A meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 30, n. 11, p. 2020–2036, 1 nov. 2020.

KLINGENBERG, M. et al. Structure–Function Relationship in UCP1. **International Journal of Obesity**, v. 23, p. S24–S29, 1 jun. 1999.

KNOWLES, A. M. et al. Impact of low-volume, high-intensity interval training on maximal aerobic capacity, health-related quality of life and motivation to exercise in ageing men. **Age**, v. 37, n. 2, 2015.

KRITCHEVSKY, D. Influence of caloric restriction and exercise on tumorigenesis in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine**, v. 193, n. 1, p. 35–38, 1990.

KURYŁOWICZ, A.; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, M. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 6241, v. 21, n. 17, p. 6241, 28 ago. 2020.

KWON, O.; KIM, K. W.; KIM, M. S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 7, p. 1457–1477, 1 abr. 2016.

LEE, J. S. et al. Effect of high-intensity circuit training on obesity indices, physical fitness, and browning factors in inactive female college students. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 17, n. 3, p. 207, 2021.

LIU, L.; SHI, G.-P. CD31: beyond a marker for endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 1, p. 3–5, 1 abr. 2012.

MADSEN, S. M. et al. High intensity interval training improves glycaemic control and pancreatic B cell function of type 2 diabetes patients. **PLoS ONE**, 2015.

MATTHIAS, A. et al. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25073–25081, 18 ago. 2000.

MCCAY, C. M. et al. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. **The journal of nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 1939.

MCDONALD, R. B.; RAMSEY, J. J. Honoring Clive McCay and 75 years of calorie restriction research. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 7, p. 1205–10, 2010.

MILANOVIĆ, Z.; SPORIŠ, G.; WESTON, M. Effectiveness of High-Intensity Interval Training (HIT) and Continuous Endurance Training for VO₂max Improvements: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. **Sports Medicine**, v. 45, n. 10, p. 1469–1481, 5 out. 2015.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature** 2006 443:7109, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 21 set. 2006.

MUNHOZ, A. C. et al. Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female wistar rats. **Nutrients**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2020.

- NEDERGAARD, J.; LINDBERG, O. Norepinephrine-Stimulated Fatty-Acid Release and Oxygen Consumption in Isolated Hamster Brown-Fat Cells: Influence of Buffers, Albumin, Insulin and Mitochondrial Inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 95, n. 1, p. 139–145, 1979.
- NISOLI, E. et al. Calorie Restriction Promotes Mitochondrial Biogenesis by Inducing the Expression of eNOS. **Science**, v. 314, n. 2005, p. 314–317, 2009.
- ORGANIZATION, W. H. Recomendaciones Mundiales sobre Actividad Física para la Salud. **Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication**, n. Completo, p. 1–58, 2010.
- OSMAN, O. S. et al. A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. **Adipocyte**, v. 2, n. 3, p. 160–164, 24 jul. 2013.
- PROENÇA, A. R. G. et al. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 192–205, 2014.
- REAL-HOHN, A. et al. The synergism of high-intensity intermittent exercise and every-other-day intermittent fasting regimen on energy metabolism adaptations includes hexokinase activity and mitochondrial efficiency. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0202784, 21 dez. 2018.
- RODRÍGUEZ-BIES, E. et al. Muscle physiology changes induced by every other day feeding and endurance exercise in mice: Effects on physical performance. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.
- ROTHWELL, N. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Obesity Research**, v. 5, n. 6, p. 650–656, 1997.
- SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 225–253, 1 dez. 2003.
- SHARMA, N. et al. Heterogeneous Effects of Calorie Restriction on In Vivo Glucose Uptake and Insulin Signaling of Individual Rat Skeletal Muscles. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- SHIH, S.-C. et al. Molecular Profiling of Angiogenesis Markers. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 1, p. 35–41, jul. 2002.
- STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of adipose tissue. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1191307>, v. 5, n. 2, p. 153–162, 2 abr. 2016.

TABATA, I. et al. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 28, n. 10, p. 1327–1330, 1996.

TERADA, S. et al. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 90, n. 6, p. 2019–2024, 2001.

THONBERG, H. et al. A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: Mediation via α 1-adrenoceptors and protein kinase C activation. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 1, p. 73–79, 15 maio 2002.

TRAN, T. T.; KAHN, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 195–213, abr. 2010.

TRAPP, E. et al. The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 4, p. 684–91, 2008.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 329–339, 2001.

TSCHANZ, S. A.; BURRI, P. H.; WEIBEL, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images: The STEPanizer. **Journal of Microscopy**, v. 243, n. 1, p. 47–59, jul. 2011.

VALDEZ, G. et al. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14863–8, 2010.

VANHEES, L. et al. Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in defining the benefits to cardiovascular health within the general population: recommendations from the EACPR (Part I). **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 19, n. 4, p. 670–686, 2012.

VÁZQUEZ-VELA, M. E. F.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 8, p. 715–728, nov. 2008.

Vigitel Brasil 2006-2020 - Prática de Atividade Física — **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2006-2020-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-pratica-de-atividade-fisica-nas>>

capitais-dos-26-estados-brasileiros-e-no-distrito-federal-entre-2006-e-20.pdf/view>. Acesso em: 14 maio. 2023.

Vigitel Brasil 2021 - estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas — **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas/view>>. Acesso em: 14 maio. 2023.

WARBURTON, D. E. R.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 174, n. 6, p. 801–9, 2006.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 683–701, 12 nov. 2001.

WINTER, E. M.; FOWLER, N. Exercise defined and quantified according to the Système International d'Unités. <https://doi.org/10.1080/02640410802658461>, v. 27, n. 5, p. 447–460, 2009.

WU, J. et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, jul. 2012.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes & Development**, v. 27, n. 3, p. 234–250, 1 fev. 2013.

XIAO, M. et al. Calorie Restriction Combined with High-Intensity Interval Training Promotes Browning of White Adipose Tissue by Activating the PPAR γ /PGC-1 α /UCP1 Pathway ORIGINAL RESEARCH. **The Health Med**, v. 29, n. 3 Altern, p. 135, 2023.

YANG, F. et al. MTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 82–90, 2014.

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação Científica



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 22 de novembro de 2016

Prezada Professora Verônica Salerno Pinto

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Efeito do Jejum Intermitente e do Exercício Intervalado de Alta Intensidade Sobre o Metabolismo.”**, protocolo n° 059/16, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 18/10/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 22/11/2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
N° de animais	60 animais
Peso/idade	250-300g / 2-3 meses
Sexo	machos
Origem	Biotério Fernando Pompeu - EEFD UFRJ.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -
Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br