

ANA PRISCILA CAYRES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A VIA DA MIOSTATINA E O
FENÓTIPO MUSCULAR EM RATOS SUBMETIDOS A ALIMENTAÇÃO
INTERMITENTE**

CAMPO GRANDE

2016

ANA PRISCILA CAYRES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A VIA DA MIOSTATINA E O
FENÓTIPO MUSCULAR EM RATOS SUBMETIDOS A ALIMENTAÇÃO
INTERMITENTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de mestre em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na
Área de Respostas ao Exercício e Saúde Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Felipe Martinez

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Assis de Oliveira Júnior

CAMPO GRANDE

2016

*Aos meus pais, Wilson e Adir, exemplos
de caráter, perseverança e dedicação.
Aos meus queridos irmãos, Max Wilson e
Ana Paula, ao meu cunhado Júlio, à
minha sobrinha Clara, meu sobrinho
Caetano (já te espero ansiosamente).
E ao Renan, meu namorado e amigo.*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Silvio Assis de Oliveira Júnior, por me guiar antes mesmo da minha entrada no programa de pós-graduação, pela ajuda durante o período experimental e por estar sempre disponível para ensinar.

Ao Prof. MSc. Fernando Sérgio Silva Barbosa e à Profa. MSc. Thayana Regina de Souza Grance, pelas contribuições como banca de pré-defesa da dissertação.

À Profa. Dra. Paula Felipe Martinez, orientadora e inspiração de dedicação e paixão pelo ensino e pesquisa. Meus agradecimentos pelo tempo e conhecimento compartilhado, pelo voto de confiança e por contribuir no meu amadurecimento profissional e pessoal.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao programa de pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, em especial à Vera Nascimento Silva e à Áurea Soares Gobi, pela gentileza e disponibilidade para resolver problemas.

Aos professores, técnicos e alunos do programa de pós-graduação em Fisiopatologia e Clínica Médica da UNESP/Botucatu, em especial à Mariana Janini Gomes, por me acolher em sua casa e pela ajuda nos experimentos.

Aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Fisiologia e Desempenho Esportivo da UNESP/Bauru, em especial ao Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto, ao Willian Eiji e ao Elvis Souza Malta, pela ajuda durante as análises.

Aos membros do Laboratório de Biofisiofarmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em especial ao Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza, pelos ensinamentos transmitidos, pela boa convivência e atenção dispensada durante os experimentos.

À equipe do Biotério Central da UFMS, em especial à técnica em laboratório Tamy Ingrid Restel, pela boa convivência e ajuda no período experimental.

Ao Laboratório de Imagem do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFMS, em especial ao técnico Lucas Blanco, pela gentileza com que me ajudou durante as análises.

Aos colegas de curso, em especial à Priscilla Gois, pela ajuda durante o período experimental no Biotério; à Nayara Muzili, à Camila Moraes, ao Gabriel Ota e à Marianna Rabelo, pela ajuda na eutanásia dos animais, nos experimentos, nas análises e por sempre estarem dispostos a ensinar e aprender.

Aos amigos, em especial à Heloyse, pelos conselhos e incentivo, desde a graduação tem sido exemplo de lealdade à amizade; à Sara, pela leveza, bom humor e amizade construída nesses dois anos de curso; e ao Flávio, exemplo de dedicação à carreira acadêmica, agradeço pelo incentivo, pelas conversas, mesmo de longe nossa amizade se faz presente.

Aos amigos do meu namorado, que se tornaram meus amigos. Em especial ao Alysso, ao João Henrique, à Isabella e ao Patrick, pelos momentos de irmandade e descontração, pelas risadas e por tornarem a minha vida mais divertida!

Ao movimento trance, pelos encontros e amizades construídas, pelo contato com a natureza e por influenciar através da música, arte e cultura, tendo como valores universais o PLUR (*peace, love, unit, respect*).

À minha família, espalhada pelos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo, todo carinho e respeito à ancestralidade.

Aos meus futuros sogros, Luiz Carlos e Adriana, agradeço por me acolherem e por fazerem parte da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Max Wilson e Ana Paula, ao meu cunhado Júlio, à minha sobrinha Clara e ao já aguardado sobrinho, Caetano. – Vocês me trazem muitas alegrias, amo vocês!

Ao Renan, meu namorado e amigo, que soube compreender com amor esse momento de nossas vidas. Agradeço pelas conversas, por me incentivar em momentos difíceis e pela companhia até mesmo nas madrugadas de estudo. – Amo você e quero estar sempre ao seu lado.

Aos meus pais, Wilson e Adir, exemplos de caráter, perseverança e dedicação. Agradeço pelo apoio, incentivo e participação em cada etapa da minha vida. – A luta e o trabalho de vocês me fizeram chegar até aqui. Amo vocês!

RESUMO

OLIVEIRA, A. P. C. **Influência do exercício físico sobre a via da miostatina e o fenótipo muscular em ratos submetidos a alimentação intermitente.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

A alimentação intermitente (AI), alternativa à tradicional restrição calórica (RC), consiste em intervenção dietética envolvendo ciclos de jejum e alimentação. O principal efeito da RC tradicional sobre a musculatura esquelética é a redução do tamanho da fibra, a qual pode ser atenuada pelo exercício físico. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da AI sobre o fenótipo muscular e os mecanismos moleculares envolvidos. Neste sentido, a miostatina é um fator de crescimento que regula negativamente o crescimento de músculos esqueléticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do exercício físico sobre a via da miostatina e o fenótipo muscular de ratos submetidos a alimentação intermitente. Ratos Wistar machos (n=40) foram distribuídos em 4 grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermitente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermitente e Exercício Físico (AI-EF). Os grupos C-S e C-EF receberam ração normocalórica *ad libitum* diariamente; AI-S e AI-EF receberam a mesma ração, administrada *ad libitum* em dias alternados com dias de jejum total. Os grupos C-EF e AI-EF foram submetidos a protocolo de exercício em esteira rolante por 90 dias. A expressão proteica de miostatina e de sua antagonista follistatina foi avaliada por Western blot nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca). Exercício físico melhorou a tolerância ao esforço, avaliada por teste incremental em esteira. Em relação à musculatura esquelética, a massa do músculo sóleo foi menor no grupo AI-S que no C-S. A massa do músculo gastrocnêmio foi menor nos grupos AI-S e AI-EF em comparação ao C-S e C-EF, respectivamente, porém maior no grupo AI-EF que no AI-S. A área seccional transversa das fibras do músculo gastrocnêmio foi significativamente menor no grupo AI-S quando comparado ao grupo C-S e menor no grupo AI-EF em relação ao C-EF. No músculo sóleo, a área seccional transversa das fibras musculares foi significativamente menor no grupo AI-S quando comparado ao grupo C-S e maior no grupo AI-EF em relação ao AI-S. O fator exercício físico teve influência sobre a expressão proteica de miostatina no músculo gastrocnêmio; adicionalmente, a expressão de miostatina foi significativamente menor no grupo C-EF que no C-S. Não houve diferença significativa para a expressão de miostatina no músculo sóleo e de follistatina em ambos os músculos avaliados. Em conclusão, a alimentação intermitente promove redução da massa dos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos, a qual é prevenida pelo exercício físico em esteira rolante. A via da miostatina, apesar de ser modulada pelo exercício físico, não parece estar envolvida no processo de atrofia muscular associada à alimentação intermitente.

Palavras-chaves: alimentação intermitente, exercício físico, músculo esquelético, miostatina, restrição calórica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. P. C. **Influence of physical exercise on myostatin signaling and skeletal muscle phenotype in rats submitted to intermittent feeding.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

Intermittent feeding (IF) is a dietary intervention often used as an alternative to caloric restriction (CR) and characterized by cycles alternating *ad libitum* feeding and fasting. The main consequence of CR on skeletal muscle is fiber size reduction, which can be attenuated by physical exercise. However, the effects of IF on skeletal muscle phenotype and its related molecular mechanisms are not well studied. Myostatin is a growth factor that correlates negatively to muscle mass. The present study aimed to evaluate the influence of exercise on myostatin signaling and skeletal muscle phenotype in rats submitted to intermittent feeding. Male Wistar rats (n=40) were allocated into four groups: sedentary control (C-S), control + physical exercise (C-Ex), sedentary intermittent feeding (IF-S), and intermittent feeding + physical exercise (IF-Ex). The C-S and C-Ex groups were fed *ad libitum* (AL), and IF-S and IF-Ex groups had *ad libitum* access to food on alternating days. Rats from C-Ex and IF-Ex underwent into a treadmill-exercise protocol for 90 days. Myostatin and follistatin protein expression was assessed by Western blot in soleus and gastrocnemius (white portion) muscles. Exercise improved functional capacity, assessed by maximal exercise test on treadmill. Concerning skeletal muscle analysis, soleus muscle mass was lower in IF-S group than in C-S group. Gastrocnemius muscle mass was lower in IF-S and IF-Ex groups in comparison to C-S and C-Ex, respectively; however, it was higher in IF-Ex group than in IF-S. Gastrocnemius muscle fiber cross-sectional area was significantly lower in IF-S than in C-S, and lower in IF-Ex than in C-Ex group. In soleus muscle, fiber cross-sectional area was lower in IF-S than in C-S group, and higher in IF-Ex than in IF-S group. Exercise influenced myostatin protein expression in gastrocnemius muscle; additionally, myostatin was significantly lower in C-Ex group than in C-S. There was no significantly difference between the groups for myostatin expression in soleus muscle, and follistatin expression in both gastrocnemius and soleus muscle. In conclusion, intermittent feeding promotes a physical exercise-reversible atrophy in soleus and gastrocnemius muscles of rats. Although myostatin can be modulated by physical exercise, it does not seem to participate on intermittent feeding-induced muscle atrophy.

Keywords: caloric restriction, intermittent feeding, myostatin, physical exercise, skeletal muscle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis de composição corporal	26
Tabela 2 – Perfil bioquímico sérico	27
Tabela 3 – Expressão proteica de miostatina e folistatina avaliada por Western Blot	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distância percorrida (<i>A</i>) e tempo total de teste (<i>B</i>) incremental de tolerância ao exercício em esteira rolante	25
Figura 2 – Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio (<i>A</i>) e sóleo (<i>B</i>), corados com hematoxilina-eosina	29
Figura 3 – Área seccional transversa das fibras musculares esqueléticas. <i>A</i> : músculo gastrocnêmio (porção branca); <i>B</i> : músculo sóleo	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI – Alimentação Intermitente
Akt – Proteína quinase B
C – Controle
EF – Exercício Físico
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-8 – Fator de crescimento e diferenciação-8
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
MC – Massa corporal
Mstn – Miostatina
MuRF-1 – *Muscle Ring Fbox - 1*
MyoD – *Myogenic differentiation factor*
NF-kappaB – Fator nuclear kappaB
RC – Restrição Calórica
S – Sedentário
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Restrição Calórica	14
2.2 Alimentação Intermitente, Exercício Físico e Musculatura Esquelética	15
2.3 Miostatina	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Grupos experimentais e protocolo de exercício físico	19
4.2 Teste de tolerância ao exercício	20
4.3 Eutanásia dos animais e coleta de tecidos	20
4.4 Perfil bioquímico sérico	21
4.5 Análise histológica da musculatura esquelética	21
4.6 Análise da expressão de proteínas relacionadas à via da miostatina por Western blot	21
4.7 Análise estatística	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÕES	35
8 REFERÊNCIAS	36
9 ANEXO	42
9.1 ANEXO A – Certificado CEUA/UFMS	42

1 INTRODUÇÃO

A restrição calórica (RC), definida como redução na ingestão de calorias sem desnutrição (MATTISON et al., 2003; WEINDRUCH, SOHAL, 1997), tem sido associada ao aumento da longevidade (BORDONE, GUARENTE, 2005; WEINDRUCH, SOHAL, 1997) e à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tanto em humanos (GENARO et al., 2009; HURSTING et al., 2003) quanto em animais de experimentação (AHMET et al., 2005; AHMET et al., 2011; BORDONE, GUARENTE, 2005). A alimentação intermitente (AI), alternativa à tradicional RC e que consiste em intervenção dietética envolvendo ciclos de jejum e alimentação, também tem sido associada ao aumento da longevidade (GOODRICK et al., 1982, 1983) e à redução do risco para doenças crônicas, como distúrbios cardiovasculares (AHMET et al., 2005; AHMET et al., 2011; VARADY, HELLERSTEIN, 2007).

O principal efeito da RC sobre a musculatura esquelética descrito na literatura é a redução do tamanho da fibra, sendo que as fibras de contração rápida (tipo II) são mais suscetíveis às condições atroficas que as fibras de contração lenta (tipo I) (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000). Embora vários efeitos metabólicos e cardiovasculares já tenham sido estudados, pouco se sabe sobre a influência da AI sobre o fenótipo muscular.

Por sua vez, a prática regular de exercício físico é amplamente difundida como medida de prevenção e promoção de saúde em diversas condições (PAFFENBARGER, HALE, 1975; PAULSON et al., 1987). Sabe-se também que a perda de massa muscular induzida pela RC pode ser atenuada pelo exercício físico (BALLOR et al., 1990).

Os mecanismos moleculares envolvidos na atrofia induzida por RC também não estão completamente compreendidos. Neste sentido, a miostatina, proteína também conhecida como fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8), regula o crescimento de músculos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta (MCPHERRON et al., 1997). Estudos experimentais mostraram correlação negativa entre expressão de miostatina e massa muscular (LEE, 2004).

Não foram encontrados estudos avaliando o papel da via da miostatina no fenótipo muscular de ratos submetidos a AI e a influência do exercício físico sobre a

musculatura esquelética nessas condições. Dessa forma, foi levantada a hipótese que o exercício físico modula a via da miostatina e previne a atrofia muscular induzida pela AI em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Restrição Calórica

O estilo de vida da sociedade contemporânea tornou-se importante fator de risco na fisiopatologia de doenças crônicas, como desordens cardiovasculares, diabetes, câncer, obesidade, entre outras (KATZMARZYK et al., 2009; MENSAH et al., 2004; MONTEIRO et al., 1995; ROSAMOND et al., 1998). Estas afecções geralmente são acompanhadas de alterações na musculatura esquelética periférica, com possível impacto negativo sobre a aptidão para realização de exercício físico (HARRINGTON et al., 1997; JEBB, MOORE, 1999). Neste contexto, a influência de algumas formas de intervenção sobre indicadores de saúde, prevenção e tratamento de doenças crônicas vem sendo recentemente analisada em estudos clínicos e pesquisas com modelos animais, incluindo-se a restrição calórica (MEYER et al., 2006; OMEDEI, FONTANA, 2011; VARADY, HELLERSTEIN, 2007).

A restrição calórica (RC) pode ser definida como redução na ingestão de calorias sem desnutrição (MATTISON et al., 2003; WEINDRUCH, SOHAL, 1997). Este tipo de intervenção tem sido associada ao aumento da longevidade (BORDONE, GUARENTE, 2005; FONTANA et al., 2010; WEINDRUCH, SOHAL, 1997) e à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e doença renal, tanto em humanos (GENARO et al., 2009; HURSTING et al., 2003) quanto em animais de experimentação (AHMET et al., 2005; AHMET et al., 2011; BORDONE, GUARENTE, 2005). Há mais de sete décadas, um estudo também já havia relacionado a RC ao aumento da sobrevivência em roedores (MCCAY et., 1935).

Alternativa à tradicional RC, vários estudos têm aplicado a alimentação intermitente (AI), também denominada jejum intermitente ou alimentação em dias alternados, que consiste em intervenção dietética envolvendo ciclos de jejum e alimentação, geralmente, com duração de 24 horas cada (AHMET et al., 2005; AHMET et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2011). Na AI, a ingestão é ad libitum em períodos alternados, ou seja, a ingestão total de calorias não precisa ser limitada, mas sim a frequência de consumo de alimentos. A AI também tem sido associada ao aumento da longevidade (GOODRICK et al, 1982, 1983) e à redução do risco para

doenças crônicas, como distúrbios cardiovasculares (VARADY, HELLERSTEIN, 2007; AHMET et al., 2005; AHMET et al., 2011).

A AI recentemente atraiu mais atenção da comunidade científica porque estudos experimentais têm destacado o seu potencial para atenuar anormalidades metabólicas (ANSON et al., 2003).

Em humanos não obesos submetidos a protocolo de AI por período de três semanas, foram observados aumento da concentração sérica de HDL, redução da concentração de triglicérides, além de diminuição da massa corporal total e da massa adiposa e aumento da taxa de oxidação de gordura. Entretanto, não foi verificada alteração significativa na pressão arterial (HEILBRONN et al., 2005).

Em ratos submetidos a AI por longo período, ocorre redução da frequência cardíaca, da pressão arterial sistólica e diastólica (MAGER et al., 2006; WAN et al., 2003). Além disso, a magnitude do efeito sobre a frequência cardíaca e pressão arterial mostrou-se semelhante entre AI e RC, o que sugere que a AI pode ser tão benéfica quanto a RC na modulação destas variáveis (MAGER et al., 2006). Outro estudo ainda observou melhora do perfil lipídico, com redução das concentrações de colesterol e de triglicérides, após oito semanas de AI em ratos adultos (KRIZOVA, SIMEK, 1996). Também foi observado na RC experimental um aumento da sensibilidade à insulina, com consequente redução da glicemia e da insulinemia, resultando na melhora da tolerância à glicose (WAN et al., 2003).

2.2 Alimentação Intermitente, Exercício Físico e Musculatura Esquelética

Embora vários efeitos metabólicos e cardiovasculares já tenham sido estudados, pouco se sabe sobre a influência da AI sobre o fenótipo muscular. O crescimento muscular pode ser reduzido ou comprometido por alimentação inadequada ou redução no consumo de energia, o que resulta na diminuição de indicadores de crescimento muscular, incluindo o tamanho total do músculo e a área seccional transversal das fibras (LEWIS, SIECK, 1992), e características funcionais, tais como as propriedades de contração e de relaxamento (NISHIO, JEEJEEBHOY, 1991), capacidade aeróbia (LAYMAN et al., 1981) e a resistência à fadiga (BARCLAY, LOISELLE, 1992). O principal efeito da RC sobre a musculatura esquelética descrito na literatura é a redução do tamanho da fibra, sendo que as

fibras de contração rápida (tipo II) são mais suscetíveis às condições atroficas que as fibras de contração lenta (tipo I). Em ratos machos, a RC promoveu redução de proteína total e da massa do músculo plantar (rápido), alterações estas que não foram observadas no músculo sóleo (lento) (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000).

A perda de massa muscular induzida pela RC pode ser atenuada pelo exercício físico. Em um estudo, a redução do crescimento do músculo plantar em consequência da restrição calórica foi atenuada por sobrecarga funcional, induzida por ressecção do músculo gastrocnêmio em ratos (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000). Em ratos submetidos a exercício físico e RC, a área seccional dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos foi menor do que em ratos submetidos a exercício físico e dieta *ad libitum*, demonstrando que a RC previne a hipertrofia muscular induzida pelo exercício em esteira (MAXWELL et al., 1992).

Em estudo clínico, indivíduos obesos submetidos a AI e exercício físico apresentaram redução do peso corporal, circunferência da cintura, massa de gordura, associada a manutenção da massa magra. Além disso, foi observada diminuição da concentração sérica de LDL e aumento do HDL (BHUTANI et al., 2013).

2.3 Miostatina

A miostatina, proteína também conhecida como fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8), regula o crescimento de músculos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta (MCPHERRON et al., 1997). Estudos experimentais mostraram correlação negativa entre expressão de miostatina e massa muscular (LEE, 2004). Em modelos experimentais, a expressão de miostatina também foi associada à expressão de cadeias pesadas de miosina do tipo II em músculo esquelético (WHITTEMORE et al., 2003). A sinalização intracelular decorrente da estimulação da miostatina ocorre por meio de sua interação, principalmente, com receptores de activina IIB e, em menor intensidade, com receptores de activina IIA (LEE et al., 2005). Entretanto, a proteína follistatina pode se ligar à miostatina, agindo como sua antagonista e impedindo a interação da miostatina ao seu receptor (LEE, MCPHERRON, 2001).

O aumento da miostatina pode ser induzido pelo TNF- α por mecanismo dependente do NF-kappaB, em cultura de células musculares (ZHANG et al., 2011; SRIRAM et al., 2011). Além disso, alguns estudos apontam que a miostatina promove ativação do sistema ubiquitina-proteassoma, principalmente das proteínas MuRF-1 e atroquina-1, e reduz a ativação da proteína Akt, levando ao aumento da degradação e redução da síntese proteica (ZHANG et al., 2011, MCFARLANE et al., 2006). Adicionalmente, a miostatina também pode modular a função de células satélites, inibindo a expressão de fatores de regulação miogênica, como MyoD e miogenina (ZHANG et al., 2011) e contribuindo para o processo de atrofia.

Na literatura, vários estudos mostram que a perda de massa muscular, frequentemente observada em doenças crônicas, como câncer, insuficiência cardíaca, AIDS e doença pulmonar obstrutiva crônica, pode ser modulada pela miostatina (AVERSA et al., 2011; COSTELLI et al, 2008; GONZALEZ-CADAVID et al.,1998; LENK et al., 2009; LIMA et al., 2010; DAMATTO et al., 2013; DAMATTO, 2014). A participação da via da miostatina foi verificada em ratos caquéticos portadores de tumor no fígado (COSTELLI et al, 2008). Em humanos, dados recentes sugerem que alterações na expressão de miostatina também estão presentes em seres humanos afetados por câncer de estômago e de pulmão (AVERSA et al., 2011). Em modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, verificou-se aumento da expressão proteica de miostatina no músculo gastrocnêmio (LENK et al., 2009) e redução da expressão de folistatina no músculo sóleo de ratos (LIMA et al., 2010). Em pacientes infectados pelo HIV, foi detectado aumento nas concentrações séricas e intramusculares de proteína imunorreativa da miostatina. (GONZALEZ-CADAVID et al.,1998). Outros estudos têm demonstrado alterações na expressão da miostatina em pacientes com DPOC, tanto em músculos esqueléticos periféricos (MAN et al., 2010) quanto no diafragma (TESTELMANS et al., 2010).

Existe uma escassez de estudos que relacionam RC e a via da miostatina. Porém, um estudo avaliou a influência da RC sobre a musculatura esquelética de camundongos com deleção do gene da miostatina (*MSTN*^{-/-}), os quais apresentam aumento do número e tamanho das fibras musculares. Após período 5 semanas de RC, os autores observaram redução no tamanho das fibras, alteração na

composição dos tipos de fibras e nas propriedades contráteis de músculos esqueléticos destes camundongos (MATSAKAS et al., 2013).

Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando a relação entre AI, atrofia muscular e a via da miostatina e a influência do exercício físico sobre a musculatura esquelética nessas condições.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do exercício físico sobre a via da miostatina e o fenótipo muscular de ratos submetidos a alimentação intermitente.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do exercício físico e da alimentação intermitente sobre a tolerância ao exercício, composição corporal e perfil bioquímico sérico em ratos;
- Avaliar a morfologia geral e mensurar as áreas seccionais transversas das fibras musculares nos músculos gastrocnêmio (porção branca) e sóleo;
- Analisar proteínas relacionadas à via da miostatina na musculatura esquelética.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais e protocolo de exercício físico

Para a realização deste estudo, foram utilizados 40 ratos Wistar machos com 60 dias de idade, disponibilizados do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por caixa), ambiente com ciclos de iluminação de 12 horas e controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$). Para a realização da pesquisa, os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermitente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermitente e Exercício Físico (AI-EF). Todos os grupos experimentais foram tratados com dieta normocalórica (ração comercial padrão para roedores, Nuvilab®, Brasil), composta por 51,89% de carboidrato, 22,42% de proteína, 7,37% de lipídeos, 7,46% de cinzas, 10,86% de umidade e 3,64 kcal/g. Enquanto os grupos C-S e C-EF foram tratados diariamente com ração *ad libitum*, sem restrições, os animais dos grupos AI-S e AI-EF receberam a mesma ração padrão, administrada *ad libitum* em dias alternados com dias de jejum total. O consumo de ração foi controlado diariamente.

Os animais dos grupos C-EF e AI-EF foram submetidos a protocolo de corrida em esteira rolante, elaborado de acordo com estudos prévios (EMTER et al., 2005; PAGAN et al., 2015). Antes do início do protocolo de exercício, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação, durante o qual ocorreram cinco sessões de exercício em dias subsequentes com velocidade constante de 5 m/min e duração de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos da primeira até a quinta sessão, respectivamente.

Posteriormente, foi iniciado o protocolo composto por 5 sessões de exercício por semana durante 90 dias. A velocidade foi aumentada progressivamente ao longo das semanas, ao mesmo tempo em que a duração das sessões foi reduzida (1ª – 3ª semanas: 7,5 a 12 m/min, 60-40 min; 4ª – 6ª semanas: 15 m/min, 40 min; 7ª – 9ª semanas: 18 m/min; 35 min; 10ª – 12ª semanas: 19 m/min, 15-25 min).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “U. S. National

Institutes of Health" (COMMITTEE ON CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 1985). O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS (protocolo 615/ 2014).

4.2 Teste de tolerância ao exercício

Para verificar o comportamento da tolerância ao exercício, foi realizado teste de esforço, utilizando-se protocolo incremental para ratos previamente descrito (CARVALHO et al., 2005). O protocolo foi executado ao final do período experimental. Os animais C-S e AI-S também foram submetidos a um período de adaptação, conforme descrito anteriormente, para a familiarização com a manipulação envolvida no protocolo experimental. O teste foi iniciado com um aquecimento de 5 min em velocidade de 5 m/min. Após 1 min de recuperação passiva, o animal foi submetido a esforço progressivo, com velocidade inicial de 6 m/min e incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos. O protocolo foi finalizado quando o animal atingiu a exaustão, a qual foi definida como recusa à corrida, mesmo sob estimulação física por meio de leve toque no dorso do animal, ou quando a coordenação entre as passadas se apresentou dificultada.

A tolerância ao exercício foi avaliada pela distância percorrida (m) e pelo tempo total (min) do teste.

4.3 Eutanásia dos animais e coleta de tecidos

Os animais foram mantidos em jejum por um período de 12 horas, submetidos à anestesia intraperitoneal com cetamina (60 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado e, a seguir, centrifugado em temperatura ambiente a 3000 rpm, por 10 min, para obtenção de soro. Os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambos os membros posteriores foram dissecados, pesados, separados em amostras e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises. Posteriormente, foi executada laparotomia mediana para remoção de tecidos adiposos brancos dos compartimentos retroperitoneal e epididimal.

4.4 Perfil bioquímico sérico

A concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e frações (LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade), proteína total e albumina foi avaliada por método enzimático com kits específicos (Kovalent diagnosis, Kovalent do Brasil Ltda., Rio de Janeiro/RJ) (OLIVEIRA et al., 2010) e as leituras foram realizadas por espectrofotometria em sistema automatizado. A concentração sérica de VLDL (Lipoproteínas de muito baixa densidade) e a fração não-HDL foram obtidas por meio de cálculos ($VLDL = \text{triglicerídeos}/5$; $\text{não-HDL} = \text{colesterol total} - \text{HDL}$).

4.5 Análise histológica da musculatura esquelética

Fragmentos dos músculos gastrocnêmio (porção branca) e sóleo foram utilizados para obtenção de cortes histológicos transversais (espessura de 10 μm) em criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cortes corados pela técnica de hematoxilina e eosina foram utilizados para análise de morfologia geral e mensuração da área seccional transversa das fibras musculares. Foram analisadas, pelos menos, 200 fibras musculares por amostra muscular (DUBOWITZ, 1985). As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio *Leica* DM5500B (Wetzlar, Alemanha) acoplado ao sistema *Leica* Application Suite version 4.0.0 (Heerbrugg, Suíça) de análise de imagens computadorizado.

4.6 Análise da expressão de proteínas relacionadas à via da miostatina por Western blot

A expressão de proteínas relacionadas à via da miostatina (miostatina e folistatina) foi avaliada pela técnica de Western blot (DAMATTO et al., 2013; MARTINEZ et al., 2010; LIMA et al., 2014) no músculo gastrocnêmio (porção branca) e sóleo.

Fragmento muscular foi homogeneizado em tampão de extração (800 μL /100 mg tecido) contendo NaCl 100 mM, TritonX-100 1% (v/v), desoxicolato de sódio

0,5% (m/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 % (m/v), glicerol 10% (v/v) Tris 10 mM (ph 7,4), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA) 1mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (código P2714, Sigma-Aldrich). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, a 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a -80 °C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram acrescidas de tampão Laemmli (Sigma S3401), na proporção 1:1, e posteriormente aquecidas a 100 °C por 5 minutos em banho seco. Posteriormente, os extratos proteicos (50 µg) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 4 °C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmido por 90 min a 120 V, a 4 °C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 1 h (bloqueio) para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. A membrana foi, então, lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário específico para cada proteína. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, após incubação da membrana com *Luminata™ Classico Western HRP Substrate* (Millipore Corporation, Billerica, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana, foi obtida a autorradiografia.

Após obtenção do filme, a membrana foi incubada com *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário para a proteína constitutiva GAPDH. O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da autorradiografia.

Os filmes foram digitalizados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

Anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA): anti-miostatina (sc-6885-R); anti-folistatina (sc-30194); anti-GAPDH (sc-32233).

Anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA): goat anti-rabbit (sc-2004); goat anti-mouse (sc-2005).

4.7 Análise estatística

Os dados estão apresentados em medidas descritivas de posição e variabilidade. Para comparação entre os grupos, foi realizada análise de variância de duas vias (ANOVA) complementada com teste de Tukey (comparações de interesse: C-S x AI-S, C-S x C-EF, AI-S x AI-EF, C-EF x AI-EF), utilizando-se o programa Sigma Stat versão 3.5. O nível de significância considerado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Ao final do período experimental, a tolerância ao exercício foi avaliada por meio de teste de esforço incremental em esteira rolante. Entretanto, 5 animais dos grupos C-S, 3 do grupo AI-S e 1 do grupo AI-EF mostraram-se resistentes à realização do exercício e não completaram o teste. Na figura 1 (A e B), estão apresentadas as variáveis relacionadas ao teste de tolerância ao exercício. Considerando os animais que atingiram a exaustão durante o teste, a análise de variância de duas vias mostrou que houve influência do fator exercício físico sobre as variáveis distância percorrida (C-S: $238,8 \pm 134,8$; AI-S: $226,7 \pm 75,1$; C-EF: $364,8 \pm 137,1$; AI-EF: $356,3 \pm 150,2$ m; ANOVA fator dieta: $p=0,833$; fator EF: $p=0,014$; interação: $p=0,970$; figura 1A) e tempo total de teste (C-S: $17,2 \pm 5,8$; AI-S: $17,0 \pm 5,8$; C-EF: $22,5 \pm 4,7$; AI-EF: $22,0 \pm 5,8$ min; fator dieta: $p=0,853$; fator EF: $p=0,010$; interação: $p=0,937$; figura 1B), porém não foi detectada diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey.

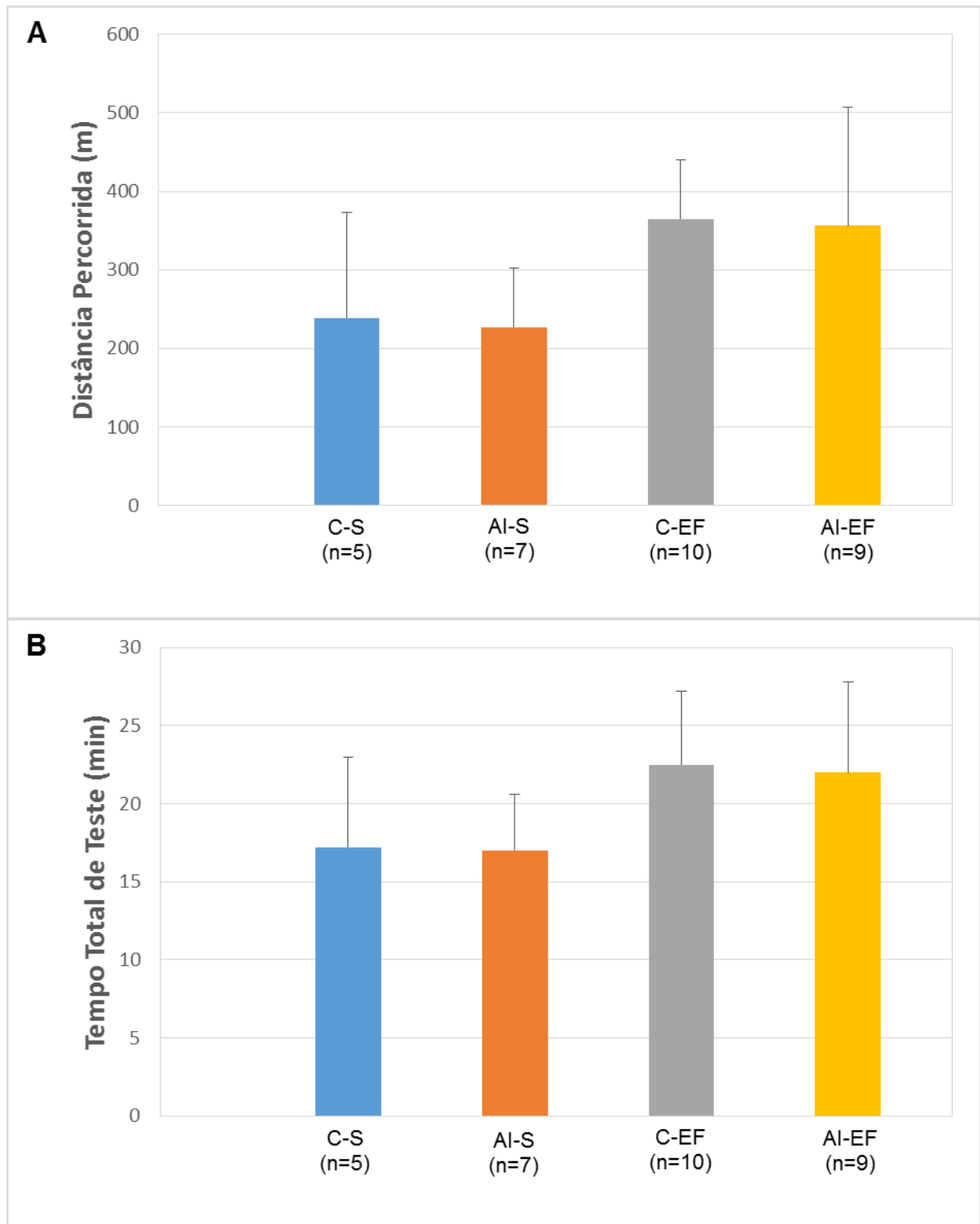


Figura 1 – Distância percorrida (A) e tempo total de teste (B) incremental de tolerância ao exercício em esteira rolante. Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermittente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermittente e Exercício Físico (AI-EF). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA de duas vias.

Na tabela 1, estão apresentadas as variáveis de composição corporal. A massa corporal foi menor no grupo AI-S quando comparado ao C-S e não houve diferença estatística nas demais comparações. Em relação aos depósitos de gordura, não houve diferença entre os grupos para a massa de gordura epididimal. No entanto, a massa de gordura retroperitoneal foi menor nos grupos exercitados (C-EF e AI-EF) em comparação aos seus respectivos controles sedentários (C-S e AI-S). No que concerne à musculatura esquelética, a massa do músculo gastrocnêmio, em valores absolutos, foi menor nos grupos submetidos à alimentação intermitente (AI-S e AI-EF) em comparação aos seus respectivos controles (C-S e C-EF), porém foi maior no grupo AI-EF que no grupo AI-S. Já em valores relativos, normalizados pelo comprimento da tíbia, a massa do músculo gastrocnêmio foi menor nos grupos submetidos à alimentação intermitente (AI-S e AI-EF) em comparação aos seus respectivos controles (C-S e C-EF) e não houve diferença significativa entre os grupos AI-EF e AI-S. A massa do músculo sóleo esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo comprimento da tíbia, foi menor no grupo AI-S que no grupo C-S e não houve diferença significativa para as demais comparações.

Tabela 1 – Variáveis de composição corporal

Variável	Grupos				Fatores (valor de <i>p</i>)		
	C-S (n=10)	AI-S (n=10)	C-EF (n=10)	AI-EF (n=10)	Dieta	EF	Interação
MC Final (g)	389±51	331±30*	384±33	357±23	<0,001	0,372	0,181
Gordura epididimal (g)	4,7±0,9	3,9±1,9	4,3±1,2	3,5±0,6	0,059	0,292	0,950
Gordura retroperitoneal (g)	3,0±0,7	2,4±1,1	2,0±0,9*	1,5±0,5#	0,047	0,002	0,853
Gastrocnêmio Esquerdo (g)	2,36±0,28	1,92±0,27*	2,35±0,17	2,12±0,13#†	<0,001	0,172	0,137
Gastrocnêmio/Tíbia (mg/mm)	59,37±6,16	49,43±6,11*	59,05±3,79	54,52±3,97#	<0,001	0,151	0,104
Sóleo Esquerdo (g)	0,18±0,03	0,14±0,02*	0,17±0,02	0,16±0,02	<0,001	0,802	0,045
Sóleo/Tíbia (mg/mm)	4,64±0,62	3,70±0,55*	4,30±0,39	4,12±0,53	0,002	0,814	0,031

MC: Massa corporal. Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermitente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermitente e Exercício Físico (AI-EF). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias e teste de Tukey; * *p* < 0,05 vs. Grupo C-S; # *p* < 0,05 vs. grupo AI-S; † *p* < 0,05 vs. C-EF.

Variáveis relacionadas ao perfil bioquímico sérico estão descritas na tabela 2. A concentração sérica de triglicérides foi maior nos grupos submetidos à alimentação intermitente (AI-S e AI-EF) em comparação aos seus respectivos controles (C-S e C-EF) e maior no grupo AI-EF em comparação ao grupo AI-S. Já o colesterol total foi menor no grupo AI-S quando comparado ao C-S e não houve diferença estatística nas demais comparações. No que concerne às frações de colesterol, não houve diferença significativa entre os grupos para os valores de HDL. O LDL foi menor no grupo AI-EF em relação ao C-EF e menor em C-EF e AI-S que no grupo C-S. Por sua vez, os valores de VLDL foram maiores nos grupos submetidos à alimentação intermitente (AI-S e AI-EF) em comparação aos seus respectivos controles (C-S e C-EF) e maior no grupo AI-EF maior que no AI-S. A fração não-HDL foi menor nos grupos AI-S e C-EF que no grupo C-S. O grupo AI-S apresentou menor concentração séria de proteína total que o grupo C-S e não houve diferença estatística entre os demais grupos. A concentração sérica de albumina foi maior no grupo AI-EF quando comparado ao grupo AI-S e não houve diferença estatística para demais comparações.

Tabela 2 – Perfil bioquímico sérico

Variável	Grupos				Fatores (valor de p)		
	C-S (n=10)	AI-S (n=10)	C-EF (n=10)	AI-EF (n=10)	Dieta	EF	Interação
Triglicérides (mg/dL)	37,5±11,5	50,8±10,6*	40,2±15,8	63,1±14,9#†	<0,001	0,086	0,263
Colesterol T (mg/dL)	60,9±5,0	52,1±8,7*	56,9±9,3	54,6±8,6	0,037	0,758	0,210
HDL (mg/dL)	25,0±1,8	26,2±3,4	26,4±3,8	28,4±2,4	0,093	0,065	0,708
LDL (mg/dL)	29,3±5,5	14,5±4,3*	21,4±4,9*	12,0±6,4†	<0,001	0,004	0,116
VLDL (mg/dL)	7,5±2,3	10,2±2,1*	8,0±3,2	12,6±3,0#†	<0,001	0,086	0,263
Não-HDL (mg/dL)	35,9±4,1	25,9±6,5*	28,7±2,6*	25,6±5,8	<0,001	0,021	0,035
Proteína T (g/dL)	5,5±0,2	5,3±0,2*	5,5±0,2	5,4±0,2	0,013	0,973	0,402
Albumina (g/dL)	3,1±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1	3,2±0,1#	0,075	0,007	0,885

T: Total; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade; HDL: Lipoproteína de Alta densidade; não-HDL: diferença entre a concentração de colesterol total e a concentração de HDL. Proteína T: proteína total. Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermitente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermitente e Exercício Físico (AI-EF). Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias e teste de Tukey; * p <0,05 vs. Grupo C-S; # p <0,05 vs. grupo AI-S; † p <0,05 vs. C-EF.

A mensuração das áreas seccionais transversas das fibras musculares dos músculos gastrocnêmio e sóleo foi realizada através de cortes histológicos transversais corados em hematoxilina e eosina (figura 2). A análise de variância de duas vias mostrou que houve influência do fator dieta sobre a área seccional transversa no músculo gastrocnêmio (C-S: 3792 ± 207 ; AI-S: 2956 ± 316 ; C-EF: 3596 ± 228 ; AI-EF: $3119,3 \pm 432 \mu\text{m}^2$; ANOVA fator dieta: $p < 0,001$; fator EF: $p = 0,889$; interação: $p = 0,137$; figura 3A). Pelo teste de Tukey, verificamos que a área seccional transversa das fibras do músculo gastrocnêmio foi significativamente menor no grupo AI-S quando comparado ao grupo C-S e menor no grupo AI-EF em relação ao C-EF; não houve diferença estatística para as demais comparações. Para o músculo sóleo, a análise de variância de duas vias mostrou que houve influência do fator dieta sobre a área seccional transversa das fibras musculares e interação significativa entre os fatores (C-S: 3878 ± 577 ; AI-S: 3194 ± 350 ; C-EF: 3650 ± 391 ; AI-EF: $3646 \pm 182 \mu\text{m}^2$; ANOVA fator dieta: $p = 0,032$; fator EF: $p = 0,466$; interação: $p = 0,034$; figura 3B). Pelo teste de Tukey, a área seccional transversa das fibras do músculo sóleo foi significativamente menor no grupo AI-S quando comparado ao grupo C-S e maior no grupo AI-EF em relação ao AI-S; não houve diferença estatística para as demais comparações.

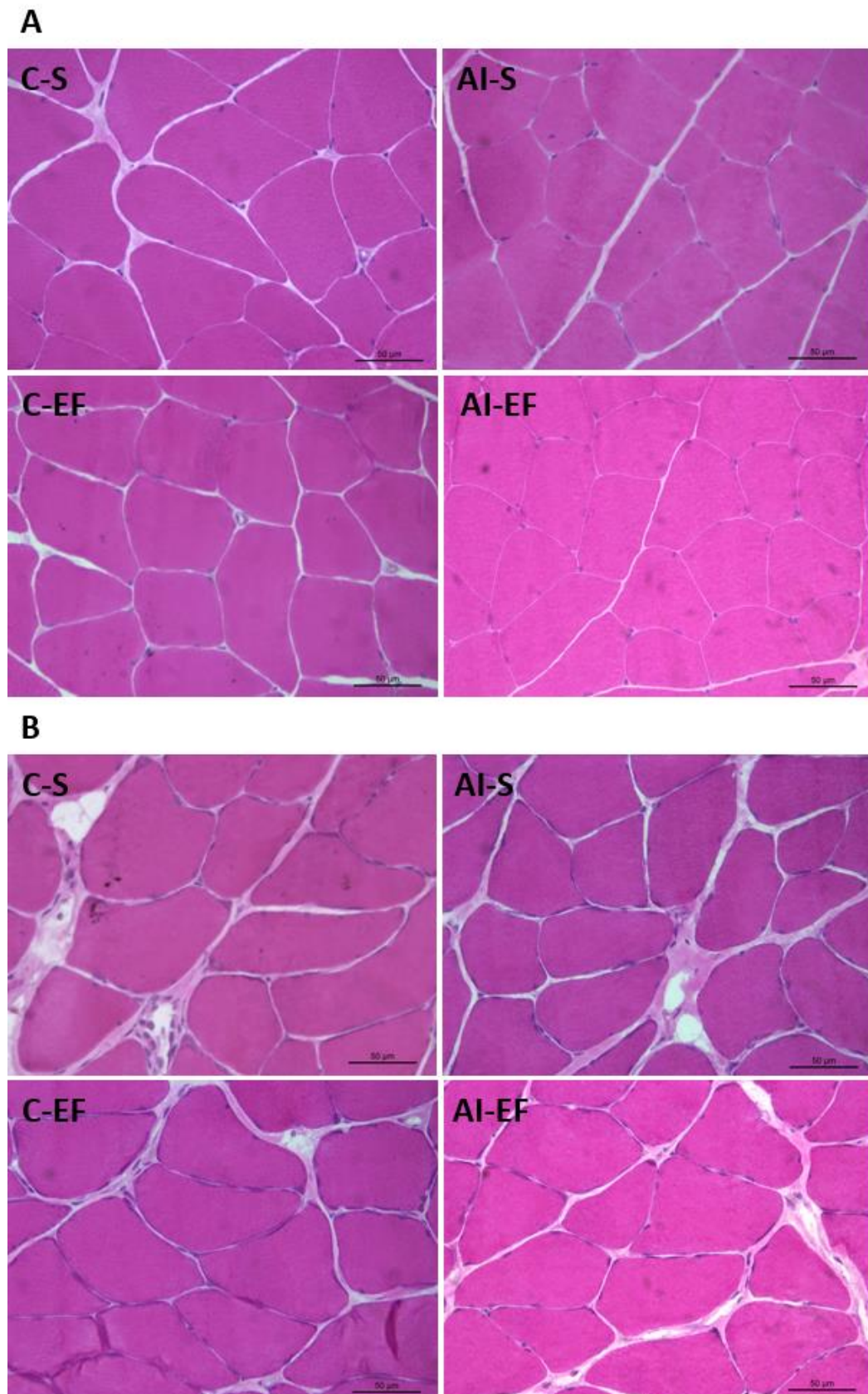


Figura 2 – Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio (A) e sóleo (B), corados com hematoxilina-eosina. Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermittente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermittente e Exercício Físico (AI-EF).

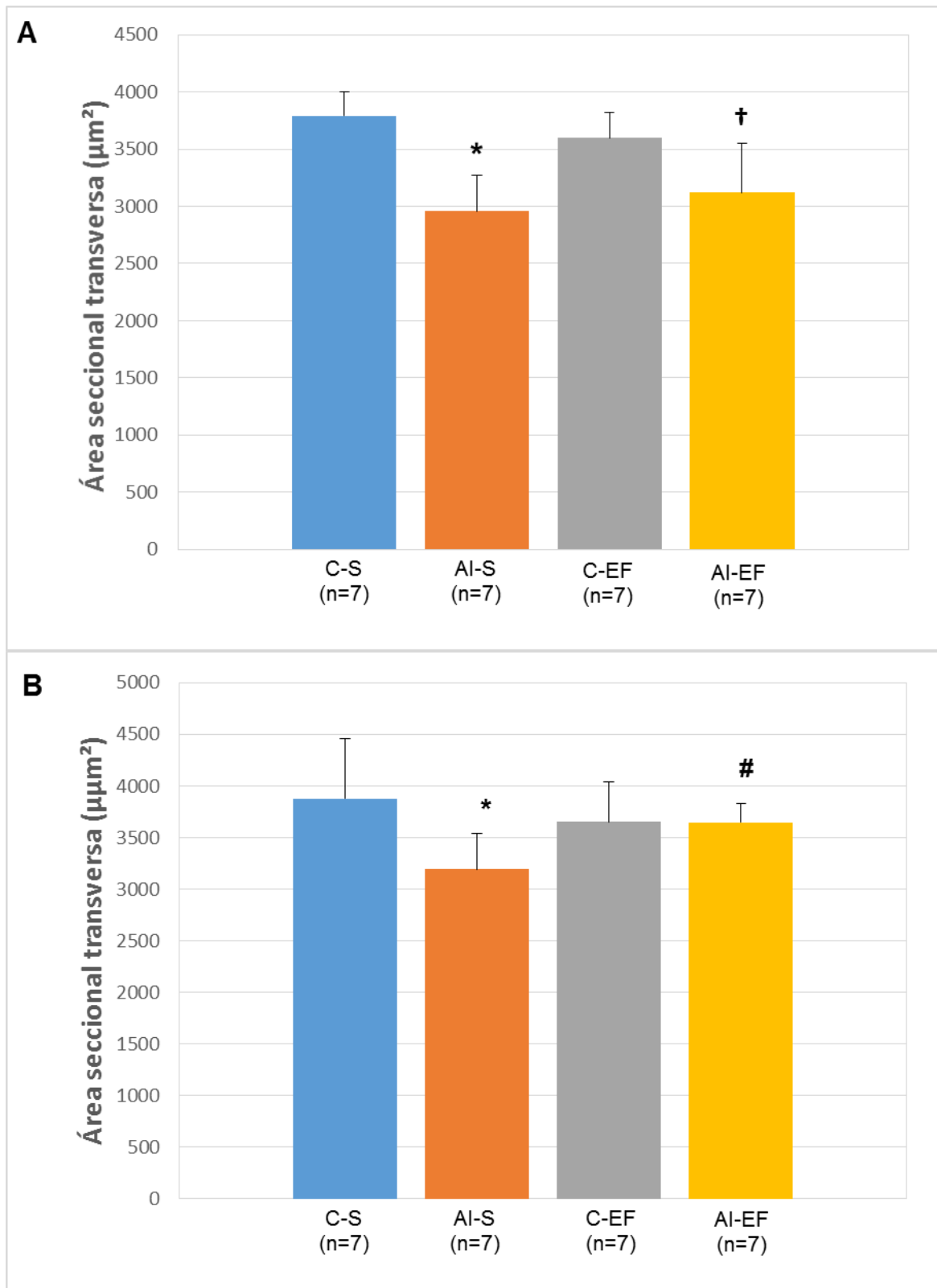


Figura 3 – Área seccional transversa das fibras musculares esqueléticas. A: músculo gastrocnêmio (porção branca); B: músculo sóleo. Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermittente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermittente e Exercício Físico (AI-EF). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA de duas vias e teste de Tukey; * $p < 0,05$ vs. Grupo C-S; # $p < 0,05$ vs. grupo AI-S; † $p < 0,05$ vs. C-EF.

A expressão proteica de miostatina e de sua antagonista folistatina foi avaliada pela técnica de Western blot (tabela 3). A análise de variância de duas vias mostrou que houve influência do fator exercício físico sobre a expressão proteica de miostatina no músculo gastrocnêmio. Pelo teste de Tukey, verificamos que a expressão de miostatina foi significativamente menor no grupo C-EF quando comparado ao grupo C-S e não houve diferença estatística para as demais comparações. Em relação à expressão de miostatina no músculo gastrocnêmio, os grupos foram semelhantes. No músculo sóleo, a expressão de miostatina e folistatina não diferiu entre os grupos.

Tabela 3 – Expressão proteica de miostatina e folistatina avaliada por Western Blot

Variável	Grupos				Fatores (valor-p)		
	C-S (n=9)	AI-S (n=9)	C-EF (n=9)	AI-EF (n=9)	Dieta	EF	Interação
Gastrocnêmio							
Miostatina/GAPDH	1,0±0,3	0,9±0,3	0,8±0,1*	0,8±0,1	0,243	0,013	0,300
Folistatina/GAPDH	1,0±0,2	0,9±0,2	0,9±0,2	0,8±0,2	0,125	0,109	0,589
Sóleo							
Miostatina/GAPDH	1,0±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1	0,105	0,730	0,223
Folistatina/GAPDH	1,0±0,3	1,0±0,3	0,9±0,2	0,9±0,3	0,766	0,195	0,856

Grupos: Controle Sedentário (C-S), Alimentação Intermitente Sedentário (AI-S), Controle Exercício Físico (C-EF) e Alimentação Intermitente e Exercício Físico (AI-EF). Valores expressos em média ± desvio padrão (unidades arbitrárias). ANOVA de duas vias e teste de Tukey; * p <0,05 vs. Grupo C-S.

6 DISCUSSÃO

Embora a literatura apresente relevantes trabalhos relacionados a exercício físico e AI, não foram encontrados trabalhos sobre a associação desses fatores e a via da miostatina na musculatura esquelética. Assim, no presente estudo, foi avaliada a influência do exercício físico sobre a via da miostatina e o fenótipo muscular de ratos submetidos a alimentação intermitente.

Inicialmente, a AI promoveu redução da massa corporal nos ratos. O exercício físico, por sua vez, reduziu a massa de gordura retroperitoneal, efeito potencializado pela AI. Em estudo clínico, indivíduos obesos submetidos a AI e exercício físico apresentaram redução do peso corporal, circunferência da cintura, massa de gordura, associada à manutenção da massa magra (BHUTANI et al., 2013). De forma semelhante, em humanos não obesos submetidos a protocolo de AI por período de três semanas, foi observada diminuição da massa corporal total e da massa adiposa (HEILBRONN et al., 2005).

Em relação ao perfil bioquímico sérico, no presente trabalho, a AI reduziu a concentração de colesterol total, as frações LDL e não-HDL e aumentou a concentração de triglicerídeos e de VLDL. O exercício físico também reduziu as frações LDL e não-HDL, porém potencializou o aumento de triglicerídeos quando associado a AI. Achados semelhantes foram encontrados em estudo clínico, em que indivíduos obesos submetidos a AI e exercício físico apresentaram diminuição da concentração sérica de LDL, além de aumento do HDL (BHUTANI et al., 2013). Outros autores observaram redução das concentrações de colesterol e também de triglicérides, após oito semanas de AI em ratos adultos (KRIZOVA, SIMEK, 1996). Uma das justificativas para os resultados divergentes em relação à concentração de triglicérides pode ser relacionada ao tempo de exposição à dieta, que foi maior no presente trabalho (12 semanas). Outros autores também verificaram que animais submetidos a AI por longo período (32 semanas) apresentaram alterações metabólicas sistêmicas (CERQUEIRA et al. 2011). Além disso, é possível que a AI, por meio da liberação de catecolaminas, tenha acentuando a lipólise, o que contribuiria para o aumento dos níveis circulantes de triglicérides (WAKI, TONTONNOZ, 2007), fundamentando os achados do presente estudo.

Os grupos submetidos à AI apresentaram menor concentração sérica de proteína total e a concentração sérica de albumina foi maior no grupo AI-EF quando comparado ao grupo AI-S. Os achados relacionados à proteína total assemelham-se a dados encontrados em estudo com ratos machos, em que a RC promoveu redução de proteína total (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000).

Concernente à capacidade funcional, os animais submetidos a protocolo de exercício físico apresentaram melhor desempenho no teste de tolerância ao esforço, considerando a distância percorrida e o tempo total de teste. Entretanto, a AI não teve influência sobre estas variáveis. Estes resultados são bastante consistentes e semelhantes a diversos trabalhos sobre exercício físico (DAMATTO et al., 2013, GOMES, 2015).

Em relação à musculatura esquelética, a AI reduziu a massa dos músculos sóleo e gastrocnêmio, porém, o exercício físico em esteira rolante atenuou ou reverteu a perda de massa muscular. Além disso, a AI promoveu redução da área seccional transversa das fibras musculares nos músculos sóleo e gastrocnêmio. Entretanto, o exercício em esteira rolante preveniu a atrofia das fibras apenas no músculo sóleo. O crescimento muscular pode ser reduzido ou comprometido por alimentação inadequada ou redução no consumo de energia, o que resulta na diminuição de indicadores de crescimento muscular (LEWIS, SIECK, 1992). Sabe-se que o principal efeito da RC sobre a musculatura esquelética é a redução do tamanho da fibra (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000). Em estudo conduzido por Ballor e col., a perda de massa muscular induzida por RC, assim como no presente trabalho, também foi atenuada pelo exercício físico (BALLOR et al., 1990). Em outro estudo, a redução do crescimento do músculo plantar em consequência da RC foi atenuada por sobrecarga funcional, induzida por ressecção do músculo gastrocnêmio em ratos (ALMURSHED, GRUNEWALD, 2000). Em ratos idosos, a RC preveniu a hipertrofia muscular induzida pelo exercício em esteira (MAXWELL et al., 1992). Nos trabalhos citados anteriormente, foi utilizada a RC tradicional e não o modelo de AI. Apesar desta diferença, os achados se assemelham aos resultados do presente estudo.

Por fim, o exercício físico parece ter efeito sobre a expressão proteica de miostatina no músculo gastrocnêmio. Verificamos que, no músculo gastrocnêmio, a expressão de miostatina foi significativamente menor no grupo C-EF quando

comparado ao grupo C-S. Já a expressão de folistatina não foi influenciada pela AI ou pelo exercício físico. Em um estudo com camundongos com deleção do gene da miostatina (*MSTN*^{-/-}), a RC, por período de cinco semanas, reduziu a massa muscular (MATSAKAS et al., 2013). Além disso, na literatura, vários estudos mostram que a perda de massa muscular, frequentemente observada em doenças crônicas, como câncer, insuficiência cardíaca, AIDS e doença pulmonar obstrutiva crônica, pode ser modulada pela miostatina (DAMATTO et al., 2013, DAMATTO, 2014, AVERSA et al., 2011, LENK et al., 2009, LIMA et al., 2010). Por outro lado, em modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, verificou-se redução da expressão proteica de miostatina no músculo gastrocnêmio em ratos submetidos a exercício físico (LENK et al., 2009), o que evidencia o potencial do exercício físico para modular a expressão de miostatina.

7 CONCLUSÕES

A alimentação intermitente promove atrofia dos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos, que pode ser prevenida pelo exercício físico em esteira rolante. A via da miostatina, apesar de ser modulada pelo exercício físico, não parece estar envolvida no processo de atrofia muscular associada à alimentação intermitente.

8 REFERÊNCIAS

Ahmet I, Tae H-J, Cabo R, Lakatta EG, Talan MI. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Aug;51(2):263-71.

Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by Intermittent Fasting in Rats. *Circulation.* 2005 Nov 15;112(20):3115-21.

Almurshed KS, Grunewald KK. Dietary protein does not affect overloaded skeletal muscle in rats. *J Nutr.* 2000 Jul;130(7):1743-8.

Anson RM, Guo Z, Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):6216-20.

Aversa Z, Bonetto A, Penna F, Costelli P, Rienzo G, Lacitignola A. Changes in Myostatin Signaling in Non-Weight-Losing Cancer Patients. *Ann Surg Oncol.* 2011 Apr 26:1-8.

Ballor DL, McCarthy JP, Wilterdink EJ. Exercise intensity does not affect the composition of diet- and exercise-induced body mass loss. *Am J Clin Nutr.* 1990 Feb;51(2):142-6.

Barclay CJ, Loiselle DS. Dependence of muscle fatigue on stimulation protocol: effect of hypocaloric diet. *Journal of Applied Physiology.* 1992;72:2278-84.

Bhutani S, Klempel MC, Kroeger CM, Trepanowski JF, Varady KA. Alternate Day Fasting and Endurance Exercise Combine to Reduce Body Weight and Favorably Alter Plasma Lipids in Obese Humans. *Obesity (Silver Spring).* 2013 Jul;21(7):1370-9.

Bordone I, Guarente I. Calorie restriction, sirt1 and metabolism: understanding longevity. *Nat rev mol cell biol.* 2005 Apr;6(4):298-305.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;140(4):409-13.

Cerqueira FM, Cunha FM, Silva CC, Chausse B, Romano RL, Garcia CCM, Colepicolo P, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Long-term intermittent feeding, but not

caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1;51(7):1454-60.

Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, Bonelli G, Doglietto GB, Baccino FM, Rossi Fanelli F. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*. 2008 Jul;38(7):531-8.

Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health, 1985.

Damatto RL. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a expressão da miostatina e o trofismo de músculos esqueléticos e cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista de Medicina de Botucatu (UNESP), 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/113869>>.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Junior AS, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatania BT, Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Cardiology*. 2013 Aug 10;167(3):698-703.

Dubowitz V. Muscle Biopsy: a Practical Approach. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.

Emter CA, Mccune SA, Sparagna GC, Radin MJ, Moore RL. Low intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2005 Nov;289(5):H2030-8.

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span – from yeast to humans. *Science*. 2010;328:321-6.

Genaro OS, Sarkis KS, Martini IA. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq bras endocrinol metab*. 2009 Jul;53(5):667-72.

Gomes MJ. Influência do exercício físico sobre o estresse oxidativo, as MAPK e o NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista de Medicina de Botucatu (UNESP), 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/132031>>.

Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and lifespan in rats allowed voluntary exercise. *Exp Aging Res*. 1983 Fall;9(3):203-9.

Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Effects of intermittent feeding upon growth and life span in rats. *Gerontology*. 1982;28(4):233-41.

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Shina-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. Organization of the

human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Dec 8;95(25):14938-43.

Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1758-64.

Heilbronn IK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E. Alternate-day fasting in non-obese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1):69-73.

Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu rev med*. 2003;54:131-52.

Jebb SA, Moore MS. Contribution of a sedentary lifestyle and inactivity to the etiology of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 1999 Nov;31(11):S534-41.

Katzmarzyk PT, Church TS, Craig CL, Bouchard C. Sitting Time and Mortality from All Causes, Cardiovascular Disease, and Cancer. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2009 May;41(5):998-1005.

Krizova E, Simek V. Influence of intermittent fasting and high-fat diet on morphological changes of the digestive system and on changes of lipid metabolism in the laboratory mouse. 1996;45(2):145-51.

Layman DK, Swan PB, Hegarty PVJ. The effect of acute dietary restriction on muscle fiber number in weanling rats. *Brit J Nutr*. 1981;45:475-81.

Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 31;98(16):9306-11.

Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Dec 13;102(50):18117-22.

Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:61-86.

Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, Schuler G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *Eur. J. Heart Fail*. 2009;11:342-48.

Lewis MI, Sieck GC. Effect of acute nutritional deprivation on diaphragm structure and function in adolescent rats. *J Appl Physiol*. 1992 Sep;73(3):974-8.

Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Oliveira SA Jr, Dal-Pai Silva M, Zornoff LA, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced diaphragm myopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(2):333-45.

Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr, SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol*. 2010 Feb;91(1):54-62.

Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, Mattson MP. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):631-7.

Man WDC, Nataneck SA, Riddoch-Contreras J, Lewis A, Marsig GS, Kemp PR, Polkey MI. Quadriceps myostatin expression in COPD. *Eur Resp J*. 2010 Sep;36(3):686-88.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Padovani CR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit*. 2010 Dec;16(12):BR374-83.

Matsakas A, Romanello V, Sartori R, Masiero E, Macharia R, Otto A. Food restriction reverses the hyper-muscular phenotype and force generation capacity deficit of the myostatin null mouse. *Int J Sports Med*. 2013 Mar;34(3):223-31.

Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK. Calorie restriction in rhesus monkeys. *Exp gerontol*. 2003 Jan-Feb;38(1-2):35-46.

Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem*. 2005 Mar;16(3):129-37.

Maxwell LC, Enwemeka CS, Fernandes G. Effects of exercises and food restriction on rat skeletal muscles. *Tissue Cell*. 1992;24(4):491-8.

McCay CM, Crowell MF, Maynard IA. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon ultimate body size. *J Nutr*. 1935;10:63-79.

McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006 Nov;209(2):501-14.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new tgf-beta superfamily member. *Nature*. 1997 May 1;387(6628):83-90.

Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KMV, Giles WH, Vinicor F, Deedwania PC. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin*. 2004 Nov;22(4):485-504.

Meyer TE, Kovacs SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Col Cardiol*. 2006 Jan 17;47(2):398-402.

Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*. 1995 Feb;49(2):105-13.

Nishio ML, Jeejeebhoy KN. Skeletal muscle relaxation rate after fasting or hypocaloric feeding. *J ournal of Applied Physiology*. 1991 July 1;71:204-9.

Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragona FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutrit Res*. 2002;22:1353-64.

Oliveira JR SA, Pai-silva MD, Martinez PF, Campos DHS, Lima-leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit*. 2010 Jul;16(7):BR208-17.

Oliveira JR SA, Pai-silva MD, Martinez PF, Lima-leopoldo AP, Campos DHS, Leopoldo AS, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit*. 2010 Dec;16(12):BR367-73.

Omedei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett*. 2011;1537-1542.

Paffenbarger RS, Hale WE. Work activity and coronary heart mortality. *The New England Journal Medicine*. 1975 Mar 13;292(11):545-50.

Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Bonomo C, Campos DHS, Gomes MJ, Martinez PF, Oliveira Junior SA, Gimenes R, Rosa CM, Guizoni DM, Moukbel YC, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:61-74.

Paulson DJ, Kopp SJ, Peace G, Tow JP. Myocardial adaptation to endurance exercise training in diabetic rats. *The American Journal of Physiology*. 1987 Jun;252(6 Pt 2):R1073-81.

Rosamond W, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, Wang CH, Heiss G. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med*. 1998;339:861-7.

Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, Kambadur R, Sharma M. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. *Aging Cell*. 2011 Dec;10(6):931-48.

Sugizaki MM, Leopoldo APL, Conde SJ, Campos DS, Damato R, Leopoldo AS, Nascimento AF, Oliveira SA Jr, Cicogna AC. Exercício e restrição alimentar aumentam o RNAm de proteínas do trânsito de Ca^{2+} miocárdico em ratos. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Fev;97(1):46-52.

Svedal K, Macintosh BR. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. *Can J Appl Physiol*. 2003 Apr;28(2):299-323.

Testelmans D, Crul T, Maes K, Agten A, Crombach M, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Atrophy and hypertrophy signalling in the diaphragm of patients with COPD. *Eur Resp Jour*. 2010; 35(3):467-9.

Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jul;86(1):7-13.

Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *J Nutr*. 2003 Jun;133(6):1921-9.

Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:31-56.

Weindruch R, Sohal RS. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center: Caloric intake and aging. *New Engl J Med*. 1997 Oct 2;337(14):986-94.

Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 24;300(4):965-71.

Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X, Du J, Mitch WE. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J*. 2011 May;25(5):1653-63.

9 ANEXO

9.1 ANEXO A – Certificado CEUA/UFMS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 615/2014 do Pesquisador **Silvio Assis de Oliveira Júnior**, referente ao projeto de pesquisa “Influência do exercício físico sobre a remodelação e a resistência à insulina no miocárdio de ratos sob dieta intermitente”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 27 de novembro de 2014.

Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 27 de novembro de 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

<http://www.propp.ufms.br/ceua>

ceua.2000@gmail.com

fone (67) 3345-7186