



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO



NAÍS LIRA SOARES

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO TREINAMENTO  
AERÓBICO SOBRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

João Pessoa

2021

**NAÍS LIRA SOARES**

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO TREINAMENTO  
AERÓBICO SOBRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Jailane de Souza Aquino

João Pessoa

2021

S676e Soares, Naís Lira.

Efeito do jejum intermitente associado ao treinamento aeróbico sobre o eixo intestino-cérebro de ratos wistar / Naís Lira Soares. - João Pessoa, 2021.

89 f. : il.

Orientação: Jailane de Souza Aquino.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Nutrição - jejum intermitente (JI). 2. Treinamento aeróbico. 3. Ansiedade. 4. Bactérias intestinais. 5. Cólon. 6. Depressão. 7. Modulação intestinal. I. Aquino, Jailane de Souza. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 612.39(043)

NAÍS LIRA SOARES

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO TREINAMENTO  
AERÓBICO SOBRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

Dissertação \_\_\_\_\_ Aprovada \_\_\_\_\_ em 20 / 04 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino  
DN/CCS/UFPB  
Presidente da banca examinadora



---

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira  
DN/CCS/UFPB  
Examinadora interna



---

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Departamento de tecnologia de alimentos/CTDR/UFPB  
Examinadora externa

---

Profa. Dra. Marciane Magnani  
Departamento de engenharia de alimentos/CT/UFPB  
Examinadora suplente interna

---

Profa. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori  
Departamento de psicologia/CCHLA/UFPB  
Examinadora suplente externa

A Deus, que me concede o fôlego de vida  
e coragem para lutar pelos meus objetivos,  
aos meus pais e irmãos, por serem meus  
maiores exemplos e incentivadores.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha gratidão e apreço a todos àqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram a concluir mais essa etapa da minha vida acadêmica.

A Deus, que diariamente me mostra que há um tempo determinado para todo propósito debaixo do céu.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Francisca Véra, e irmãos, Taís, Laís, Pedro e Assis Lira, por sonharem meus sonhos e me apoiarem em todas as etapas da minha vida. Aos meus sobrinhos, Júlia e Kaio Lira, que mesmo sem saberem me incentivam a ser uma pessoa melhor todos os dias.

À minha orientadora, professora Dra. Jailane de Souza Aquino, que me acompanha desde o início da graduação, meu exemplo de profissional íntegra e ética.

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio e Profa. Dra. Mirian Graciela Salvadori, avaliadoras externas, Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes e Profa. Dra. Marciane Magnani, avaliadoras internas, pela disponibilidade e por todas as contribuições sugeridas, de modo a melhorar minha dissertação e artigo e por todo apoio que me deram durante todo o mestrado.

Aos professores parceiros, que das mais diversas formas contribuíram com minha pesquisa, Dr. Adriano Francisco Alves, Dr. Alexandre Sérgio Silva, Dr. Marcos dos Santos.

À toda equipe LANEX, por todo apoio e parceria, em especial Victor Dorand, meu braço direito na realização da pesquisa, MsC. Hassler Clementino, por todo auxílio e diversas sugestões, às doutorandas Kamila Sabino e Maria Luiza, às técnicas Daniele Melo e Dra. Rosianne Tsujisaki, ao aluno de iniciação científica João Victor Gama, que foram essenciais nas mais diversas fases da minha dissertação e ao Sr. Lindemberg do Nascimento pela ajuda na manutenção do bem-estar dos animais. Não se faz ciência sozinho e sem vocês seria impossível a realização dessa pesquisa.

Às doutorandas Poliane da Silva do Laboratório de Psicofarmacologia e Maiara da Costa do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, que me auxiliaram em etapas das minhas análises. Aos colegas do Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde, Eder Jackson, Eduardo

Amorim, Mateus Duarte e Matheus Silveira, pelo auxílio em meu experimento e conhecimentos compartilhados.

Às minhas companheiras do mestrado, Julia Caju, Karina Fernandes, Karine Aquino e Larissa Ramalho, que me apoiaram, me incentivaram e tornaram-se verdadeiras amigas.

A todos os meus amigos que sempre me apoiam, compreendem meus sumiços e me incentivam a ir mais longe, em especial aqueles que me auxiliaram em alguma fase do meu mestrado, Jader Carvalho, Maria de Lourdes, Mônica Maciel e Thaís Nascimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, tornando possível o financiamento e dedicação à pesquisa. À BIOCLIN, que por meio do programa Bioclin Educar forneceu os kits para realização das análises bioquímicas do projeto como um todo.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

“Não tenha medo do caminho, tenha medo  
de não caminhar”.

Augusto Cury

## RESUMO

O jejum intermitente (JI) tem sido estudado em associação com o treinamento aeróbico. Ambas as intervenções demonstram efeitos benéficos na composição da microbiota intestinal, separadamente, mas pouco se sabe sobre os benefícios para o cérebro por meio do eixo intestino-cérebro. O presente estudo teve como objetivo avaliar parâmetros relacionados ao eixo intestino-cérebro de ratos Wistar submetidos ao JI associado ao treinamento aeróbico. Foram utilizados 40 ratos Wistar com  $\pm 140$  dias de idade e peso médio de  $380,80 \pm 23,04$  g, randomizados em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT) e grupos experimentais submetidos ao JI: sedentário (JS) e treinado (JT). O protocolo de jejum utilizado foi o de tempo restrito e os grupos submetidos ao exercício aeróbico realizaram treinamento em esteira 5 vezes por semana, durante 30 min. Ambas as intervenções foram realizadas durante as 4 semanas de experimento. Foram avaliados o consumo, parâmetro somáticos, contagem de bactérias fecais, quantificação de ácidos orgânicos nas fezes e intestino, avaliação dos comportamentos do tipo ansioso e depressivo, além de histologia cerebral e intestinal. O índice de adiposidade foi semelhante entre os grupos CT ( $2,15 \pm 0,43\%$ ), JS ( $1,98 \pm 0,69\%$ ) e JT ( $1,86 \pm 0,51\%$ ), os quais diferiram de CS ( $2,98 \pm 0,80\%$ ). JT apresentou menores contagens de bactérias ácido láticas, enquanto JS apresentou maior contagem de *Bifidobacterium* ( $10,91 \pm 0,04$  UFC/g) e *Enterococcus* ( $8,85 \pm 1,36$  UFC/g). JT teve a maior quantidade de ácido fórmico nas fezes ( $44,44 \pm 2,40$   $\mu\text{mol/g}$ ), enquanto JS teve o maior teor de ácido propiônico nas fezes ( $802,80 \pm 00,33$   $\mu\text{mol/g}$ ), seguido por JT ( $573,60 \pm 2,67$   $\mu\text{mol/g}$ ). No intestino de JT detectou-se a menor quantidade de ácido succínico ( $0,38 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$ ), enquanto JS teve o menor teor de ácido láctico ( $0,85 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$ ). JT demonstrou tendência ao efeito ansiolítico, e JS e JT tendência ao efeito antidepressivo. O jejum ocasionou diferentes lesões cerebrais e intestinais, independentemente do exercício. Nossos resultados demonstram que o JI e o exercício aeróbico, associados ou não podem modular parâmetros relacionados ao eixo intestino-cérebro de ratos Wistar, demonstrando benefícios que podem estar relacionados com os teores de ácidos orgânicos, contudo também apresentam resultados negativos na histologia cerebral e intestinal.

**Palavras-chave:** Ansiedade. Bactérias intestinais. Cólon. Depressão. Hipocampo. Modulação intestinal.

## ABSTRACT

Intermittent fasting (JI) has been studied in association with aerobic training. Both interventions demonstrate beneficial effects on the composition of the intestinal microbiota, separately, but little is known about the benefits to the brain through the gut-brain axis. The present study aimed to evaluate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats submitted to IF associated with aerobic training. Forty Wistar rats were used with  $\pm 140$  days of age and an average weight of  $380.80 \pm 23.04$  g, randomized in 4 groups: sedentary control (SC), trained control (TC) and experimental groups submitted to JI: sedentary (SIF) and trained (TIF). The fasting protocol used was time-restricted and the groups submitted to aerobic exercise underwent training on a treadmill 5 times a week, for 30 min. Both interventions were performed during the 4 weeks of the experiment. Consumption, somatic parameters, fecal bacteria count, quantification of organic acids in the faeces and gut, evaluation of anxious and depressive behaviors, as well as cerebral and intestinal histology were evaluated. The adiposity index was similar between the TC ( $2.15 \pm 0.43\%$ ), SIF ( $1.98 \pm 0.69\%$ ) and TIF ( $1.86 \pm 0.51\%$ ) groups, which differed from SC ( $2.98 \pm 0.80\%$ ). TIF had a lower counts of lactic acid bacteria, while SIF had a higher count of *Bifidobacterium* ( $10.91 \pm 0.04$  CFU/g) and *Enterococcus* ( $8.85 \pm 1.36$  CFU/g). TIF had the highest amount of formic acid in the faeces ( $44.44 \pm 2.40$   $\mu\text{mol/g}$ ), while SIF had the highest propionic acid content in the faeces ( $802.80 \pm 00.33$   $\mu\text{mol/g}$ ), followed by TIF ( $573.60 \pm 2.67$   $\mu\text{mol/g}$ ), in the gut of TIF had the lowest amount of succinic acid ( $0.38 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$ ), while SIF had the lowest content of lactic acid ( $0.85 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$ ). TIF demonstrated a tendency towards the anxiolytic effect and SIF and TIF potential antidepressant effect. Fasting caused different brain and gut injuries, regardless of exercise. Our results demonstrate that IF and aerobic exercise, associated or not, can modulate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats, demonstrating benefits that may be related to the levels of organic acids, however they also present negative results in the cerebral and intestinal histology.

**Keywords:** Anxiety. Intestinal bacteria. Colon. Depression. Hippocampus. Intestinal modulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Esteira desenvolvida para uso humano e adaptada para ratos. .... | 21 |
| <b>Figura 2</b> - Mecanismos de interação do eixo intestino-cérebro. ....          | 29 |
| <b>Figura 3</b> - Gaiolas coletivas equipadas com grades no assoalho. ....         | 31 |
| <b>Figura 4</b> - Delineamento experimental. ....                                  | 32 |
| <b>Figura 5</b> - Aparatos para aferição de peso. ....                             | 34 |
| <b>Figura 6</b> - Aparato para o teste de Campo Aberto. ....                       | 36 |
| <b>Figura 7</b> - Aparato para o Labirinto em Cruz Elevado. ....                   | 37 |
| <b>Figura 8</b> - Aparato para teste de nado forçado. ....                         | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Coleta de material biológico e respectivas análises. ....        | 39 |

### FIGURAS DO ARTIGO

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graphical abstract</b> .....                                                                                                                                          | 83 |
| <b>Fig. S1</b> - Food intake and somatic parameters of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training .....                                          | 84 |
| <b>Fig. 1</b> - Behavioural parameters evaluated in the open field test of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. ....                      | 85 |
| <b>Fig. 2</b> - Behavioural parameters evaluated in the elevated plus maze test of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. ....              | 86 |
| <b>Fig. 3</b> - Behavioural parameters evaluated in the splash test and forced swimming test of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. .... | 87 |
| <b>Fig. 4</b> - Histological analyses of the brain and gut of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. ....                                   | 88 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### QUADROS DA DISSERTAÇÃO

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Protocolos de exercício aeróbico em roedores..... | 22 |
|---------------------------------------------------------------------|----|

### TABELAS DO ARTIGO

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> - Bacteria count in faeces and quantification of organic acids in gut and faeces of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training ..... | 82 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |                                                             |
|---------------------|-------------------------------------------------------------|
| AGCC                | Ácidos graxos de cadeia curta                               |
| CAPES               | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CCS                 | Centro de Ciências da Saúde                                 |
| CEUA                | Comissão de Ética no Uso de Animais                         |
| CONCEA              | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal      |
| CS                  | Controle sedentário                                         |
| CT                  | Controle treinado                                           |
| DN                  | Departamento de Nutrição                                    |
| ETS                 | Escola Técnica de Saúde                                     |
| GPR                 | Receptores acoplados à proteína                             |
| GT                  | Gordura total                                               |
| CLAE                | Cromatografia líquida de alta eficiência                    |
| IFPE                | Instituto Federal do Sertão de Pernambuco                   |
| IL-1 $\beta$        | Interleucina 1 $\beta$                                      |
| IMC                 | Índice de Massa Corporal                                    |
| JI                  | Jejum intermitente                                          |
| JS                  | Jejum sedentário                                            |
| JT                  | Jejum treinado                                              |
| LANEX               | Laboratório de Nutrição Experimental                        |
| LDHP                | Laboratório de Diagnósticos Histopatológicos                |
| LPMA                | Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos           |
| OMS                 | Organização Mundial da Saúde                                |
| PT                  | Peso total                                                  |
| SHR                 | Ratos espontaneamente hipertensivos                         |
| TEM                 | Teste de esforço máximo                                     |
| UFC                 | Unidade formadora de colônias                               |
| UFPB                | Universidade Federal da Paraíba                             |
| UFPE                | Universidade Federal de Pernambuco                          |
| VO <sub>2</sub> max | Volume de oxigênio máximo                                   |
| WKY                 | Wistar Kyoto                                                |

## SUMÁRIO

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                          | 14 |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>                                                                 | 16 |
| 2.1 JEJUM INTERMITENTE (JI)                                                                  | 16 |
| 2.2 EXERCÍCIO AERÓBICO                                                                       | 19 |
| <b>2.2.1 Protocolos de exercício aeróbico em roedores</b>                                    | 20 |
| 2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E SAÚDE DO HOSPEDEIRO                                              | 24 |
| 2.4 MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE O INTESTINO E O CÉREBRO                                    | 26 |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                 | 30 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO                                                                           | 30 |
| 3.2 LOCAL DE PESQUISA                                                                        | 30 |
| 3.3 ASPECTOS ÉTICOS                                                                          | 30 |
| 3.4 ANIMAIS, DIETAS E PROTOCOLO DE JEJUM INTERMITENTE (JI)                                   | 31 |
| 3.5 PROTOCOLO DE TREINAMENTO                                                                 | 33 |
| 3.6 CONSUMO ALIMENTAR E CALÓRICO                                                             | 33 |
| 3.7 CONTAGEM DE BACTÉRIAS FECAIS E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO INTESTINO E EM FEZES | 34 |
| 3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS                                                                   | 36 |
| <b>3.8.1 Comportamento do tipo ansioso</b>                                                   | 36 |
| <b>3.8.2 Comportamento do tipo depressivo</b>                                                | 38 |
| 3.9 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO                                                 | 39 |
| 3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA                                                                     | 40 |
| 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA                                                                     | 40 |
| <b>4 RESULTADOS</b>                                                                          | 41 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                           | 42 |
| <b>APÊNDICE A – ARTIGO</b>                                                                   | 55 |
| <b>ANEXO A – CERTIDÃO DA CEUA</b>                                                            | 89 |

## 1 INTRODUÇÃO

O jejum intermitente (JI) é considerado uma estratégia dietética promissora na prática clínica, voltada para o aumento da expectativa de vida (MITCHELL et al., 2019), além de proteger contra condições patológicas, como obesidade (VAN DER MERWE et al., 2020) e diabetes (WEI et al., 2018). Nessa estratégia nutricional, o indivíduo alterna entre períodos de abstenção de alimentos e períodos de ingestão alimentar normal, podendo a intervenção dietética ter diferentes características, a depender do protocolo a se seguir (WILSON et al., 2018), dentre eles citam-se o jejum em dias alternados (LI et al., 2017), o protocolo de alimentação com tempo restrito (WANG et al., 2018), o protocolo 5:2 (MURPHY; DIAS; THURET, 2014) e o de uma refeição por dia (PARK et al., 2017). Os mais utilizados em modelos animais são os protocolos de dias alternados e de tempo de alimentação restrita (MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017).

O exercício aeróbico tem sido bastante utilizado em associação com o JI, principalmente como estratégia para perda de peso e aumento da oxidação de gordura durante o exercício (DE LIMA et al., 2015; MORAES et al., 2017), além de cronicamente promover adaptações fisiológicas benéficas à saúde (VIEIRA et al., 2016). Isoladamente, tanto o JI (CIGNARELLA et al., 2018; LI et al., 2017), quanto o exercício aeróbico (BRESSA et al., 2017; PETRIZ et al., 2014) têm demonstrado melhora na manutenção da microbiota intestinal saudável.

A microbiota intestinal, por sua vez, tem grande influência na homeostase metabólica, de forma que desequilíbrios em sua composição estão diretamente associados a diversas doenças, dentre estas têm-se aquelas relacionadas à saúde mental, como ansiedade e depressão. Essa ligação se dá devido ao eixo intestino-cérebro (DURGAN et al., 2019; LIU et al., 2019b). Essa comunicação dá-se através de diferentes mecanismos, dentre estes, a microbiota intestinal pode estimular ou gerar metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que através do sistema circulatório, chegam ao cérebro e são capazes de modular a função de neurônios, astrócitos, micróglia e barreira hematoencefálica. Além disso, hormônios, como a serotonina, que é liberada na camada epitelial do intestino pelas células enteroendócrinas podem ativar o nervo vago, que através de suas fibras aferentes faz

a sinalização do intestino para o cérebro (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018; DURGAN et al., 2019).

Apesar da existência de diversas publicações, em diferentes níveis de evidência científica acerca do JI, com ou sem associação do exercício aeróbico, os estudos sobre o eixo intestino-cérebro envolvendo essa temática, ainda são escassos. Além disso, ainda não se tem um consenso quanto à utilização do JI como estratégia nutricional, devido a resultados controversos (CERQUEIRA et al., 2011; MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017; MITCHELL et al., 2019; WEI et al., 2018). Ademais, a maioria dos estudos encontrados na literatura referem-se ao jejum associado a alguma doença crônica (CIGNARELLA et al., 2018; WEI et al., 2018; WILSON et al., 2018); no entanto, atualmente, na prática clínica, há uma grande adesão a essa intervenção dietética por indivíduos saudáveis. Frente ao exposto, há uma lacuna na investigação sobre o eixo intestino-cérebro de indivíduos saudáveis submetidos ao JI associado ao exercício aeróbico, necessitando de estudos que venham elucidar essa prática em indivíduos saudáveis para embasamento científico.

Considerando os aspectos supracitados, o desenvolvimento desta dissertação teve como objetivo geral avaliar parâmetros relacionados ao eixo intestino-cérebro de ratos Wistar submetidos ao jejum intermitente associado ao treinamento aeróbico. Objetivando-se especificamente avaliar o consumo alimentar e calórico, bem como índices de massa corporal e adiposidade, determinar a contagem de *Enterobactérias*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; identificar e quantificar ácidos orgânicos nas fezes e intestino; avaliar o comportamento tipo ansioso e depressivo e analisar histologicamente o cérebro e o intestino de ratos Wistar submetidos ao jejum intermitente associado ou não com o treinamento aeróbico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 JEJUM INTERMITENTE (JI)

O JI é uma intervenção dietética que abrange diferentes protocolos onde o indivíduo, de forma voluntária, alterna entre períodos de privação ou diminuição significativa da ingestão alimentar, e períodos de ingestão alimentar normal. O tempo do jejum irá variar de acordo com o protocolo previamente estabelecido (CATTERSON et al., 2018; GOTTHARDT; BELLO, 2017; MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017; WILSON et al., 2018).

Essa estratégia nutricional ganhou popularidade recentemente, contudo há estudos acerca do jejum desde a década de 1970, quando se iniciaram as investigações acerca do jejum praticado como ato religioso no Ramadã, onde os indivíduos, durante um mês, passam aproximadamente 12 h em jejum, quando fazem apenas duas refeições por dia, sendo uma ao amanhecer e outra após o pôr do sol (GUMAA et al., 1978; LI et al., 2017; LONGO; MATTSON, 2014; PATTERSON et al., 2015).

Além do jejum de caráter religioso, numerosos protocolos de jejum têm sido estudados nos últimos anos, sendo os protocolos jejum em dias alternados e o de tempo de alimentação restrito os mais utilizados em modelos animais, possivelmente devido aos ciclos constantes de jejum/alimentação estimularem um grande número de vias de sinalização, neuroendócrinas e metabólicas, impulsionando os ritmos diários e regulando a homeostase dos nutrientes (HATORI et al., 2012), além de manter um ritmo de alimentação mais natural (CHAIX; ZARRINPAR, 2015). Em estudos clínicos o mais utilizado foi o protocolo de 70% de restrição calórica em dias alternados, considerado um protocolo de jejum modificado do protocolo de jejum em dias alternados (MATTSON; LONGO; HARVIE, 2017), sendo também de grande importância os protocolos uma refeição por dia e o protocolo de 5:2, os quais serão descritos a seguir:

- Tempo de alimentação restrito: permite a ingestão de alimentos durante uma janela de tempo diária, seguida do restante do dia em jejum (WANG et al.,

2018), por exemplo, 15 h em restrição alimentar e as 9 h seguintes em estado alimentado (BELKACEMI et al., 2012);

- Jejum em dias alternados: consiste em 24 h de restrição alimentar total, seguido por 24 h de ingestão alimentar normal (LI et al., 2017);
- Protocolo de jejum modificado: admitem a ingestão de até 20 – 25% das necessidades calóricas diárias nos dias de jejum (PATTERSON et al., 2015);
- Uma refeição por dia: permite apenas uma refeição diária, durante um intervalo de tempo de 3 h (PARK et al., 2017);
- Protocolo 5:2: Durante a semana o indivíduo passará por 2 dias, consecutivos ou não, de restrição energética e os demais 5 dias comendo normalmente (HEADLAND et al., 2016).

Apesar dos diversos estudos acerca do JI, tanto em modelos animais como em ensaios clínicos, não há uma unanimidade sobre sua recomendação, devido aos desenhos de estudos serem muito heterogêneos e apresentarem divergências em seus resultados (CATTERSON et al., 2018).

O JI demonstrou ser uma boa estratégia para perda de peso, tanto em roedores, quando realizado por 4 ou 32 semanas (CERQUEIRA et al., 2011), quanto em humanos, realizado durante 8 semanas, e não foi associado ao reganho de peso após 6 meses da intervenção (CATENACCI et al., 2016). Contudo, Munhoz e colaboradores (2020) observaram que apesar da diminuição no ganho de peso em ratas Wistar jovens (4 semanas de idade) que foram submetidas ao JI durante 12 semanas, houve aumento da massa gorda.

O JI foi capaz de preservar a massa magra em camundongos obesos (GOTTHARDT et al., 2016), e melhorar a força muscular, quando associado ao exercício em humanos (MORO et al., 2016; TINSLEY et al., 2016). Quanto à diminuição da gordura visceral os dados são divergentes, estudos em roedores demonstram tanto sua diminuição (GOTTHARDT et al., 2016), assim como também relatam que o JI, apesar de reduzir o peso corporal, não diminuiu a gordura visceral em ratos saudáveis (CERQUEIRA et al., 2011).

O JI foi capaz de promover melhoras no perfil lipídico, diminuindo níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade e aumentando a lipoproteína de alta densidade em animais obesos (WILSON et al., 2018) e em mulheres obesas através

da diminuição dos níveis de colesterol total sérico, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (VARADY et al., 2015). Também foi capaz de reduzir a frequência cardíaca em repouso, mediada pelo aumento do tônus parassimpático em camundongos (WAN et al., 2014), além de reduzir os níveis circulantes de homocisteína em mulheres obesas. Quando esses parâmetros são associados indicam uma diminuição do risco cardiovascular (KLEMPPEL et al., 2012).

No metabolismo glicídico apresentou diminuição nos níveis circulantes de glicose e insulina (KLEMPPEL et al., 2012), diminuição na resistência à insulina em humanos (SEIMON et al., 2015) e melhora na tolerância a glicose (GOTTHARDT et al., 2016), além de promover regeneração das células  $\beta$  pancreáticas em modelos animais (CHENG et al., 2017). Contudo, quando realizado a longo prazo, foi associado com intolerância à glicose e inativação do receptor de insulina oxidativa em ratos saudáveis, quando realizado por 32 semanas (CERQUEIRA et al., 2011) e hiperinsulinemia, quando realizado por 12 semanas (MUNHOZ et al., 2020).

Adicionalmente, em roedores melhorou a função cognitiva (LI; WANG; ZUO, 2013) e preservou a função sensorio-motora durante o envelhecimento (SINGH et al., 2015), além de ser eficaz em diminuir déficits de memória (VASCONCELOS et al., 2014). Contudo, os efeitos no comportamento são controversos, uma vez que o estudo realizado por Cabral-Costa e colaboradores (2018) demonstra que o JI diminuiu os parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevado e aumentou os parâmetros de ansiedade no teste de campo aberto em camundongos haploinsuficientes em fosfatase homóloga à tensina. O estudo de Liu e colaboradores (2019a) demonstra que camundongos mutantes na proteína precursora da amiloide demonstram comportamento ansioso, quando ainda não adaptados ao JI (primeiras 24 h), contudo apresentam diminuição no comportamento ansioso após adaptados ao JI (1 mês). Quanto ao comportamento depressivo, os estudos envolvendo JI são escassos, o estudo de Hussin; Shahar; Das (2013) demonstra que o JI não apresentou diferenças em parâmetros relacionados à depressão em homens idosos.

Uma grande preocupação quanto à prática do JI seria a possibilidade de que esse possa levar a compulsão alimentar (COLLIER, 2013), contudo, estudos tem demonstrado que o JI não parece levar a um consumo excessivo compensatório nos dias sem dieta em mulheres com sobrepeso (HARVIE et al., 2013, 2011).

Além da divergência entre os resultados e da maioria dos estudos em animais estudarem o JI em ratos com alguma doença, uma outra dificuldade da extrapolação desses resultados para humanos é relacionada a idade em que a intervenção é aplicada nesses animais, uma vez que estudos em humanos geralmente utilizam uma faixa média de 18 - 60 anos de idade (CHENG et al., 2017; CIGNARELLA et al., 2018; PATTERSON et al., 2015), enquanto diversos estudos em animais utilizam idade entre 5 a 8 semanas (LI et al., 2017; PARK et al., 2017; WEI et al., 2018; WILSON et al., 2018), o que em equivalência para humanos seria em média de 8 a 13 anos de idade, não havendo uma mimetização correta das idades entre roedores e humanos que realizam a prática de JI.

O JI tem sido estudado em associação com o exercício aeróbico, pois quando associados promovem adaptações fisiológicas benéficas à saúde (CHERIF et al., 2017; VIEIRA et al., 2016; WILSON et al., 2018).

## 2.2 EXERCÍCIO AERÓBICO

Caracterizado por uma baixa (28-39% do volume de oxigênio máximo -  $VO_2$  max) ou média (40-59% do  $VO_2$  max) intensidade e longa duração (VANHEES et al., 2012), o exercício aeróbico é a atividade em que os grandes músculos do corpo são movidos de forma rítmica, utilizando o oxigênio como sua principal via metabólica, promovendo a melhora na capacidade cardiorrespiratória (MANN; BEEDIE; JIMENEZ, 2014; WHO, 2020) e envolve exercícios como caminhada, corrida, ciclismo e natação (VANHEES et al., 2012). A organização mundial da saúde (OMS, 2020) recomenda de 150 a 300 min de exercício aeróbico moderado por semana para que se adquira seus benefícios à saúde.

O JI tem sido utilizado como uma estratégia para aumentar a oxidação da gordura devido a sua capacidade de mobilizar triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres no plasma, que serão utilizados como fonte energética durante o exercício. Esse mecanismo ocorre devido aos baixos níveis de insulina e glicogênio hepático que ocorrem no estado de jejum, associados ao aumento dos níveis de adrenalina e potencialização da diminuição da concentração de insulina causados pelo exercício (NAHARUDIN; YUSOF, 2018; VIEIRA et al., 2016).

E cronicamente pode promover benefícios adicionais, como a redução de gordura corporal, pois além de aumentar a oxidação de gordura durante o exercício, também aumenta a oxidação da gordura em repouso, até 24 h após o exercício. Além de ser capaz de melhorar a sensibilidade à insulina (VIEIRA et al., 2016). Contudo, uma grande preocupação quanto a realização de exercícios aeróbicos no estado de jejum é a queda no desempenho, que de fato é causada de forma aguda, contudo, no estudo realizado por Naharudin e Yusof (2018), foi demonstrado que quando praticado por 10 dias o organismo se adapta, demonstrando desempenho similar ao do exercício realizado após a ingestão alimentar.

Contudo, os estudos que avaliam a associação entre o exercício aeróbico e o JI focam prioritariamente na composição corporal e perfil lipídico (MORAES et al., 2017; SMYERS et al., 2021; WILSON et al., 2018), ou avaliam períodos inferiores a 10 dias de protocolo (CHERIF et al., 2017; NAHARUDIN; YUSOF, 2018). Sendo necessários estudos que avaliem outros aspectos que podem ser alterados com a associação dessas intervenções.

### **2.2.1 Protocolos de exercício aeróbico em roedores**

Para mimetizar o exercício aeróbico em roedores normalmente utiliza-se protocolos de corrida (CONTI et al., 2015; MACÊDO et al., 2017) ou natação (WANG et al., 2017; WU; XIAO, 2017). A corrida é mimetizada nos animais através da utilização de esteiras, que podem ser de dois tipos, a esteira para roedores, fabricada propriamente para esse fim, que pode ser equipada com uma grade de choque, que irá estimular os animais a correrem (SWENSON et al., 2019). Uma esteira também pode ser adaptada para roedores (Figura 1), que é quando se utiliza a esteira de humanos, adicionando baias para que delimite o espaço onde cada animal vai correr, respeitando-se as dimensões de altura, comprimento e largura por baia (FERREIRA-JUNIOR et al., 2019; LI et al., 2018).

**Figura 1** - Esteira desenvolvida para uso humano e adaptada para ratos.



**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Os protocolos de exercício podem diferir entre si em relação a velocidade, inclinação da esteira, o tempo de duração de cada sessão, quantas sessões serão realizadas por semana e tempo total do experimento. Essas diferenças estão resumidas no Quadro 1, com a inserção de estudos encontrados no portal periódicos CAPES ao combinar os descritores *aerobic training*, *treadmill* e *rats*. Foram incluídos no Quadro 1, todos os artigos recentes (últimos 5 anos) que tivessem a descrição completa do treinamento e que tivessem duração e tempo de velocidade contínuos durante todo o protocolo experimental. Não foram incluídos protocolos de treinamento intervalado ou de resistência.

O protocolo escolhido para o presente estudo foi baseado na recomendação mínima da OMS (2020) de 150 min de exercício aeróbico moderado por semana e de acordo com os estudo citados no Quadro 1.

**Quadro 1** - Protocolos de exercício aeróbico em roedores.

| <b>Autor</b>                 | <b>Animal</b>  | <b>Idade<br/>(semanas)</b> | <b>Velocidade<br/>(m/min)</b> | <b>Inclinação<br/>(°)</b> | <b>Tempo/ sessão<br/>(min)</b> | <b>Sessões/<br/>semana</b> | <b>Tempo do<br/>experimento<br/>(Semanas)</b> |
|------------------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|
| Assis et al., 2018           | Ratos Wistar   | 6                          | 16                            | 0                         | 50                             | 3                          | 8                                             |
| Ferreira-Junior et al., 2019 | Ratos SHR      | 8                          | 50-60%                        | 0                         | 60                             | 5                          | 4                                             |
|                              | Ratos WKY      |                            | do TEM                        |                           |                                |                            |                                               |
| Grisé et al., 2016;          | Ratos          | 8                          | 27                            | 6                         | 60                             | 5                          | 10                                            |
|                              | Sprague-Dawley |                            |                               |                           |                                |                            |                                               |
| Groussard et al., 2019       | Ratos Zucker   | 8                          | 12                            | 0                         | 51                             | 5                          | 10                                            |
| Kaux et al., 2017            | Ratos          | 8                          | 17                            | -15                       | 60                             | 3                          | 5                                             |
|                              | Sprague-Dawley |                            |                               | (descida)                 |                                |                            |                                               |
| Li et al., 2018              | Ratos Wistar   | 18                         | 55-65% do<br>TEM              | 0                         | 60                             | 5                          | 12                                            |
| Mankhong et al., 2020        | Ratos          | 8                          | 20                            | 0                         | 30                             | 5                          | 12                                            |
|                              | Sprague-Dawley |                            |                               |                           |                                |                            |                                               |
| McDonald et al., 2019        | Ratos          | 8                          | 27                            | 6                         | 60                             | 5                          | 12                                            |
|                              | Sprague-Dawley |                            |                               |                           |                                |                            |                                               |
| Melo et al., 2019            | Ratos Lewis    | 32                         | 50%                           | 0                         | 40                             | 5                          | 6                                             |
|                              |                | 36                         | do TEM                        |                           |                                |                            |                                               |
| Pagan et al., 2019           | Ratos Wistar   | 48                         | 17                            | 0                         | 45                             | 5                          | 16                                            |
|                              | Ratos SHR      |                            |                               |                           |                                |                            |                                               |

**Quadro 1** - Protocolos de exercício aeróbico em roedores (cont.).

| Autor                | Animal                  | Idade<br>(semanas) | Velocidade<br>(m/min) | Inclinação<br>(°) | Tempo/ sessão<br>(min) | Sessões/<br>semana | Tempo do<br>experimento<br>(Semanas) |
|----------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Pinto et al., 2018   | Camundongos<br>C57BL/6J | 12                 | 15                    | 0                 | 30                     | 5                  | 6                                    |
| Qu et al., 2020      | Camundongos<br>C57BL/6J | 8                  | 10                    | 0                 | 60                     | 6                  | 8                                    |
| Sabouri et al., 2020 | Ratos Wistar            | 12                 | 60-65%<br>do VO2 max  | 15                | 40                     | 5                  | 8                                    |
| Schaun et al., 2017  | Ratos SHR               | 12                 | 50-70%<br>do TEM      | 0                 | 60                     | 5                  | 10                                   |
| Seo et al., 2020     | Ratos<br>Sprague-Dawley | 8                  | 20                    | 0                 | 60                     | 5                  | 12                                   |

**Legenda:** TEM: Teste de esforço máximo; VO2 max: volume de oxigênio máximo; SHR: espontaneamente hipertensivos; WKY: Wistar Kyoto

O exercício aeróbico é recomendado por diversos benefícios à saúde, dentre eles diminuir o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares (SAINT-MAURICE et al., 2018), bem como diminuir o comportamento do tipo ansioso (LEBOUTHILLIER; ASMUNDSON, 2017; MORGAN et al., 2018; UYSAL et al., 2018) e depressivo (MOON et al., 2012; SADEGHI et al., 2016), além de modular a microbiota intestinal, independente da dieta (HUANG et al., 2019).

## 2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E SAÚDE DO HOSPEDEIRO

É denominada microbiota a comunidade de micro-organismos que habitam no corpo dos seres vivos, sendo as bactérias um importante grupo dessa microbiota, que em sua maioria residem no trato gastrointestinal (OCHOA-REPÁRAZ; KASPER, 2016). As bactérias intestinais mantêm uma grande quantidade de atividades fisiológicas codependentes com seu hospedeiro, denominada simbiose, onde o hospedeiro oferece um habitat rico em nutrientes para a sua sobrevivência e multiplicação e em contrapartida, essas contribuem para a saúde e bem-estar do hospedeiro, através da produção de metabólitos, como vitaminas essenciais e AGCC; além de auxiliar nas respostas imunológicas, contribuindo para a maturação dos tecidos linfoides associados ao intestino e reforçando a função da barreira epitelial intestinal; e homeostase metabólica, auxiliando no metabolismo dos carboidratos complexos (DURGAN et al., 2019; MATSUOKA; KANAI, 2015; OCHOA-REPÁRAZ; KASPER, 2016; SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2019).

A microbiota intestinal começa a ser formada já no útero, por meio do cordão umbilical e placenta. No nascimento a colonização adicional sofrerá interferência pelo tipo de parto (BASSON; LAM; COMINELLI, 2017). Subsequentemente, poderá sofrer variações por diversos fatores endógenos ou exógenos, como: idade, genética, dieta, estrutura da parede intestinal, estresse e infecções (OCHOA-REPÁRAZ; KASPER, 2016; SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2019; TIDJANI ALOU; LAGIER; RAOULT, 2016). Uma microbiota saudável é representada por sete filos bacterianos, principalmente Firmicutes (cerca de 65%) e Bacteroidetes (cerca de 25%) e em menor proporção por Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobacteria, Fusobacteria e Cyanobacteria (BASSON; LAM; COMINELLI, 2017; TIDJANI ALOU; LAGIER; RAOULT, 2016).

Em um indivíduo saudável, a diversidade e abundância relativamente altas da microbiota estão associada a saúde metabólica (SONNENBURG; BÄCKHED, 2016). O fator que tem maior influência sobre a modulação da microbiota intestinal é a dieta, podendo levar a mudanças transitórias na diversidade e abundância frente aos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) consumidos e podem

ser aumentadas por substâncias prebióticas (como inulina, frutooligossacarídeos, fenólicos) e pelo aumento do consumo de fibras associado a uma redução na ingestão calórica (SINGH et al., 2017; SONNENBURG; BÄCKHED, 2016; TIDJANI ALOU; LAGIER; RAOULT, 2016).

Dentre as intervenções dietéticas capazes de modular a microbiota intestinal, tem-se o JI, que tem demonstrado melhorar o equilíbrio na microbiota intestinal em estudos experimentais em animais doentes, como por exemplo, em camundongos obesos o JI foi capaz de aumentar a abundância da Unidade Taxonômica Operacional de *Firmicutes*, enquanto diminuiu a maioria dos outros filos (LI et al., 2017). Em camundongos fêmeas induzidas a encefalomielite autoimune experimental, que é a doença que mimetiza a esclerose múltipla de humanos, observou-se uma maior diversidade e alterações da composição da microbiota intestinal, caracterizada pelo aumento da abundância das famílias Bacteroidaceae, Lactobacillaceae e Prevotellaceae (CIGNARELLA et al., 2018).

Adicionalmente, o exercício físico de alta intensidade (DENOUE et al., 2016) ou de baixa a moderada intensidade, quando realizado de forma contínua (RIBEIRO et al., 2019), pode modular a microbiota intestinal, de forma dependente da intensidade, sendo que quando iniciado no período de desenvolvimento têm maiores impactos do que iniciado na vida adulta (MIKA; FLESHNER, 2016). O exercício aeróbico pode aumentar a diversidade microbiana, independente da dieta (HUANG et al., 2019), aumenta a abundância de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em roedores (QUEIPO-ORTUÑO et al., 2013), além de alterar o trânsito intestinal, proporcionando uma maior entrega de nutrientes ao ceco e cólon, dessa forma favorecendo a produção de AGCC no cólon (EVANS et al., 2014). Em camundongos diabéticos, o exercício aeróbico restaurou o declínio dos AGCC nas fezes e plasma (YANG et al., 2020). Contudo, deve-se ter cautela quanto à intensidade do treinamento, pois o exercício extenuante prolongado pode afetar a permeabilidade intestinal, provocar diarreia e até mesmo promover translocação bacteriana para a corrente sanguínea (CODELLA; LUZI; TERRUZZI, 2018).

Por outro lado, dietas ricas em lipídios podem causar um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal (ZARRINPAR et al., 2014), além disso, doenças como obesidade e doença inflamatória intestinal estão associadas com

menor diversidade bacteriana e mudanças na proporção de Bacteroidetes e Firmicutes (LUCAS LÓPEZ et al., 2017; SINGH et al., 2017; SONNENBURG; BÄCKHED, 2016). Prejudicando a fermentação bacteriana e diminuindo a síntese de AGCC (GORKIEWICZ; MOSCHEN, 2018). Os desequilíbrios e modificações na função da microbiota intestinal são conhecidos como disbiose que tem sido relacionada com diversas doenças, como inflamação intestinal (SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2019), síndrome do intestino irritável (TAKAJO et al., 2019), síndrome metabólica (SOMMER et al., 2017), desordens neurológicas, como doença de Parkinson (HOUSER; TANSEY, 2017), esclerose múltipla (JANGI et al., 2016), transtorno do espectro autista (FRYE et al., 2015), ansiedade e depressão (LIU et al., 2019b).

A relação entre a microbiota intestinal, seus metabólitos, doenças neurológicas e saúde mental pode ser explicada através da comunicação existente entre o intestino e o cérebro, conhecida como eixo intestino-cérebro (OCHOA-REPÁRAZ; KASPER, 2016). Com base nesta relação, compreender os mecanismos de interação entre cérebro e intestino se faz pertinente.

## 2.4 MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE O INTESTINO E O CÉREBRO

A parede intestinal pode ser estimulada diretamente pelas vias nervosas simpáticas e parassimpáticas, ou de forma indireta através da estimulação do sistema nervoso entérico, de forma a influenciar a motilidade e permeabilidade intestinal, bem como a composição da microbiota intestinal e ativação das células imunes (DURGAN et al., 2019). Além disso, o nervo vago, através de suas fibras eferentes, pode indiretamente modificar a permeabilidade do intestino e sua microbiota, através do seu efeito anti-inflamatório, ao inibir macrófagos pró-inflamatórios do tipo M1 (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018).

O intestino pode se comunicar com o cérebro através da geração de neuroinflamação, que pode ocorrer indiretamente através da ativação das células imunes periféricas, que migrarão para o cérebro, ou diretamente pelas endotoxinas imunogênicas da microbiota, como o lipopolissacarídeo (DURGAN et al., 2019), que ativa os macrófagos pró-inflamatórios M1 residentes do cérebro, que por sua vez

produzem citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), propagando a neuroinflamação (LALANCETTE-HÉBERT et al., 2017; YIN et al., 2018; ZHOU et al., 2019). Outro mecanismo é através da geração ou estimulação de metabólitos da microbiota intestinal que, através da circulação sanguínea, vão para o cérebro e são capazes de modular a função da barreira hematoencefálica, bem como dos neurônios, micróglia e astrócitos (DURGAN et al., 2019).

Os principais metabólitos produzidos pela atividade fermentativa da microbiota intestinal são os AGCC, principalmente os ácidos butírico, acético e propiônico (KOH et al., 2016), que podem ser produzidos por diversos gêneros de bactérias, como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (KELLY et al., 2015).

Dentre suas funções, eles podem regular a abundância de diferentes micro-organismos (ZHAO et al., 2019), atuam como moléculas de sinalização no intestino (KOBLYIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2015) e cérebro (HU et al., 2018), por serem capazes de permear a barreira hematoencefálica ao se ligarem com os transportadores de monocarboxilato (HU et al., 2018; KOH et al., 2016). Os AGCC também podem regular a permeabilidade da barreira hematoencefálica (KOH et al., 2016), através da diminuição da expressão de proteínas de junção (DURGAN et al., 2019) e são uma fonte secundária de nutrientes e energia, fornecendo cerca de 60 – 70% das necessidades energéticas do cólon, principalmente o ácido butírico, que é a fonte de energia preferencial dos colonócitos (ARORA; SHARMA; FROST, 2011; LAYDEN et al., 2012). Além disso, os receptores acoplados à proteína G (GPR), como o GPR41, que é expresso no sistema nervoso entérico e periférico, também funcionam como ligantes dos AGCC, a ativação de GPR41 pelos AGCC induzem a liberação de noradrenalina, dessa forma levando à ativação simpática (KOH et al., 2016).

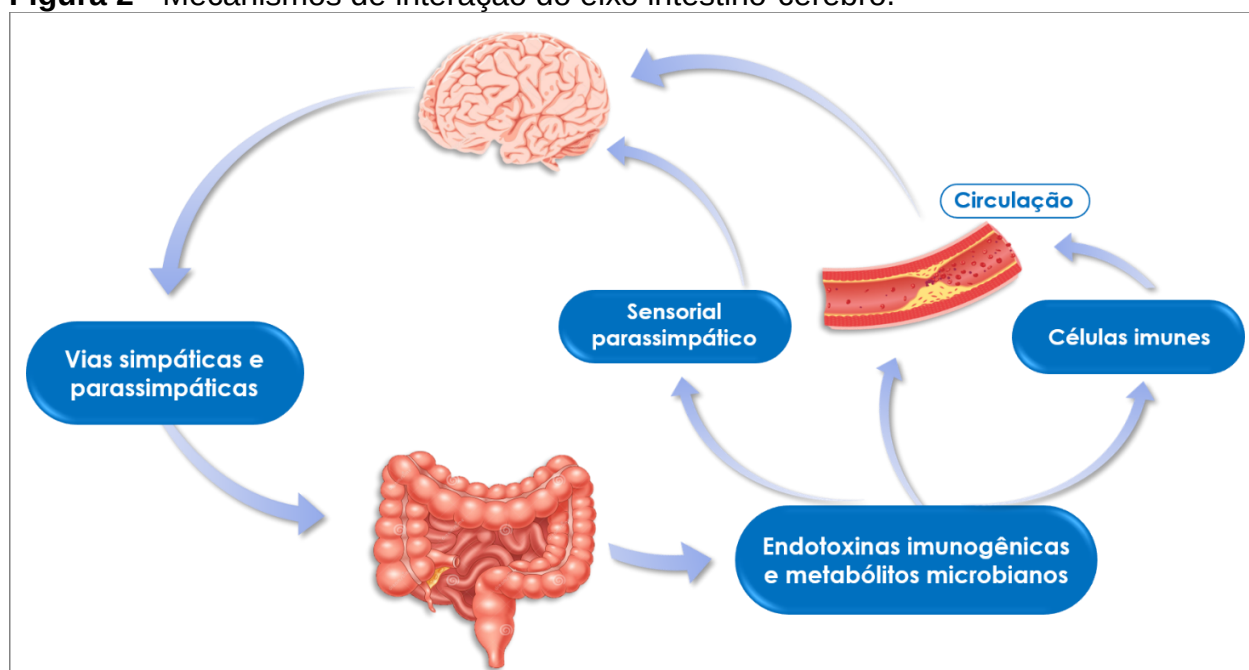
Além dos AGCC, os ácidos láctico e succínico, que são ácidos orgânicos considerados intermediários, também são sintetizados através da microbiota intestinal (KOH et al., 2016). O ácido láctico é uma importante fonte de energia para os neurônios (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2016) e o ácido succínico é o principal precursor de ácido propiônico (ZHAO et al., 2019) e ambos também podem atuar como moléculas de sinalização (KOH et al., 2016). Dentre os metabólitos

produzidos pela microbiota que podem interferir na função cerebral têm-se também os neurotransmissores, como noradrenalina, produzida por *Escherichia*, *Bacillus* e *Saccharomyces* spp., serotonina, produzida por *Enterococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus* spp., e dopamina, produzida por *Bacillus* (DINAN; CRYAN, 2017).

Esses neurotransmissores são moduladores de diversas funções do sistema nervoso central, ao influenciar a sinalização neuronal, além de modularem diferentes sintomas emocionais (FAN et al., 2016; RAMSAY, 2016; VUORENPÄÄ et al., 2016). Noradrenalina é responsável pelos estados de alerta, excitação e concentração, levando a comportamentos de despertar, vigília, ansiedade e resposta ao estresse (GRINCHII; DREMENCOV, 2020; VITRAC; BENOIT-MARAND, 2017). Dopamina é responsável pelas vias de recompensa e motivação, além de estar envolvida nos processos de tomada de decisão, aprendizado por reforço e execução motora (GRINCHII; DREMENCOV, 2020; PATRIARCHI et al., 2018; VITRAC; BENOIT-MARAND, 2017). Serotonina promove adaptações no comportamento, dependendo do contexto ambiental, modulando emoções, aprendizagem, memória, apetite e sono (CHEN et al., 2017; VITRAC; BENOIT-MARAND, 2017).

Por fim, as fibras aferentes do nervo vago, que são distribuídas por todas as camadas da parede digestiva podem ser ativadas através dos metabólitos microbianos, a exemplo da serotonina, iniciando a sinalização para o cérebro (DURGAN et al., 2019). Na Figura 2 estão resumidos os mecanismos descritos de interação entre o intestino e o cérebro.

**Figura 2** - Mecanismos de interação do eixo intestino-cérebro.



**Fonte:** adaptado de Durgan et al., 2019.

Baseado no exposto, existe uma lacuna na literatura acerca do eixo intestino-cérebro em indivíduos saudáveis submetidos ao JI associado ao exercício aeróbico, fazendo-se necessário a elucidação para embasamento científico, levando-se em consideração também a idade dos animais, para que haja uma correta mimetização das idades entre roedores e humanos que realizam esses protocolos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo refere-se a uma pesquisa de caráter experimental, ensaio não-clínico, realizado a partir da administração de uma dieta padrão para roedores, com protocolo de JI associado ou não ao treinamento aeróbico em modelo animal.

#### 3.2 LOCAL DE PESQUISA

Os ratos foram provenientes da colônia do Biotério José Paulino localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE) e foram aclimatizados por uma semana para posterior ensaio biológico no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), localizado no Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (DN/CCS/UFPB).

As análises dos materiais biológicos provenientes dos ratos foram realizadas nos seguintes laboratórios:

- Análises microbiológicas: Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA/Centro de Tecnologia/ UFPB);
- Análise histológica: Laboratório de Diagnósticos Histopatológicos (LDHP) da Escola Técnica de Saúde (ETS/CCS/UFPB);
- Identificação e quantificação de ácidos orgânicos nas fezes e intestino: LANEX/CCS/UFPB e Laboratório de Tecnologia em Alimentos/Instituto Federal do Sertão de Pernambuco (IFPE-Sertão/ Petrolina);

#### 3.3 ASPECTOS ÉTICOS

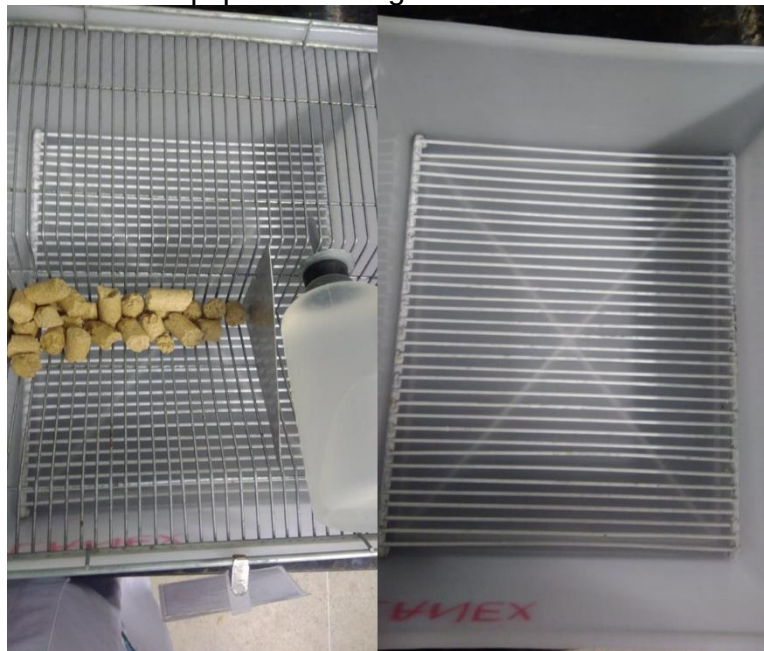
O protocolo experimental com ratos Wistar foi aprovado sob o número 5028031219 (Anexo a – Certidão da CEUA) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB). Todos os experimentos seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal (CONCEA) e de acordo com as diretrizes *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* – ARRIVE guidelines (DU SERT et al., 2020).

### 3.4 ANIMAIS, DIETAS E PROTOCOLO DE JEJUM INTERMITENTE (JI)

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar com  $\pm 140$  dias de idade e peso inicial médio de  $380,80 \pm 23,04$  g, mantidos sob condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12h) com início do ciclo claro às 08:00h, temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 5\%$ ). Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos/gaiola), onde receberam água potável e ração comercial. As gaiolas de todos os grupos de ratos foram equipadas com grades em seu assoalho (medindo 36 cm x 31 cm, 2,5 cm de profundidade, com espaço de 1 cm entre cada barra) (Figura 3) para servir de barreira e evitar que os ratos consumissem maravalha e fezes durante o protocolo de JI. Estas modificações nas gaiolas foram definidas em estudo piloto realizado previamente ao experimento.

**Figura 3** - Gaiolas coletivas equipadas com grades no assoalho.



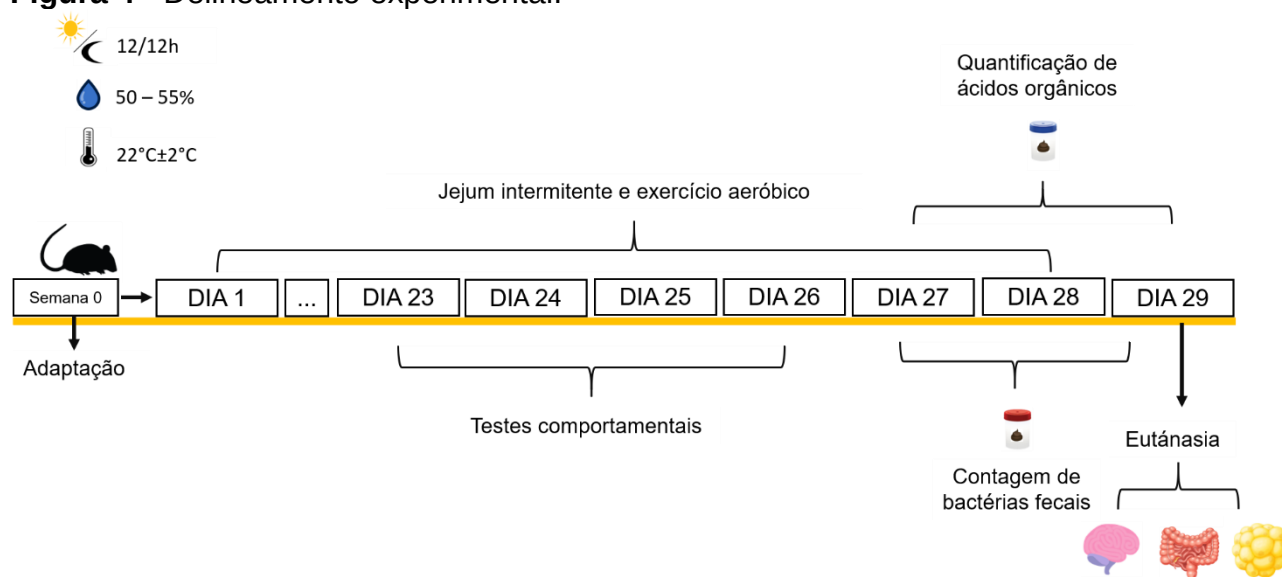
**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Os ratos foram randomizados em 4 grupos, assim descritos:

- Grupo controle sedentário (CS; n = 10): ratos sedentários com acesso à ração *ad libitum*;
- Grupo controle treinado (CT; n = 10): ratos treinados com acesso à ração *ad libitum*;
- Grupo submetido a jejum intermitente e sedentário (JS; n = 10);
- Grupo submetido a jejum intermitente e treinado (JT; n = 10).

A dieta ofertada a todos os grupos foi a dieta comercial Nuvilab (Colombo, Paraná, Brasil) que fornece 311 kcal, 57% de carboidratos, 28% de proteínas e 14% de lipídios por 100 g de ração. O protocolo de jejum intermitente utilizado foi o de tempo restrito, onde os ratos passaram 4 semanas (28 dias), sob restrição de ração por 15 h (17:00 – 8:00h) e oferta *ad libitum* de ração por 9 h (8:00 – 17:00h) (BELKACEMI et al., 2012). Este protocolo foi selecionado com base em estudos clínicos (DOMASZEWSKI et al., 2020; JAMSHED et al., 2019) e estudos com roedores (BELKACEMI et al., 2012; VAN DER MERWE et al., 2020; ZHANG et al., 2020), considerando que o protocolo de tempo restrito tem sido bastante usado também na prática clínica, por prevenir doenças metabólicas sem alterar a ingestão calórica (DOMASZEWSKI et al., 2020). O estudo seguiu o delineamento experimental apresentado na Figura 4.

**Figura 4** - Delineamento experimental.



Fonte: autoral.

### 3.5 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Na semana antecedente ao período de treinamento, os ratos foram submetidos ao período de adaptação à corrida em esteira, por 10 min durante 3 dias alternados na semana em uma velocidade de 15 m/min em uma esteira (Athletic advanced 2, Santa Catarina, Brasil) adaptada com baias (C: 30 cm x L: 7,7 cm x A: 15 cm). O desempenho dos ratos foi classificado de acordo com a escala de treinabilidade descrita por Lira et al. (2010), onde os ratos recebem nota de 1 a 5, de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 - Recusou-se a correr;
- 2 - Corredor abaixo da média (corre e para; corre na direção errada);
- 3 - Corredor médio;
- 4 - Corredor acima da média (corre constantemente, ocasionalmente correndo abaixo da velocidade da esteira);
- 5 - Bom corredor (consistentemente acima da velocidade da esteira).

Os ratos com classificação igual ou acima de 3 foram incluídos nos grupos treinados, os demais foram excluídos do experimento (dados não mostrados).

O protocolo de exercício foi realizado durante as 4 semanas de experimento, ao final do ciclo escuro, devido ao hábito noturno dos roedores. O protocolo consistiu em sessões de 30 min, por 5 vezes na semana, em uma velocidade de 15 m/min, sem inclinação (PINTO et al., 2018). O protocolo foi escolhido com base na recomendação da OMS (2020) e em estudos com roedores (CHEN et al., 2018; MANKHONG et al., 2020; PINTO et al., 2018).

### 3.6 CONSUMO ALIMENTAR E CALÓRICO

O acompanhamento do consumo alimentar foi realizado semanalmente, utilizando-se balança eletrônica digital (Modelo: PrixIII, Marca: Toledo, São Paulo, Brasil), com capacidade máxima 15 kg (menor divisão 0,1 kg) (Figura 5).

A determinação do consumo alimentar total foi realizada pela equação 1:

$$\text{Consumo final} - \text{consumo inicial} \text{ (Eq.: 1)}$$

A ingestão calórica foi obtida multiplicando-se o consumo total de ração por seu valor calórico. A quantidade de calorias consumidas e os percentuais de carboidratos, proteínas e lipídios foram calculados de acordo com a composição nutricional observada no rótulo da ração.

**Figura 5** - Aparatos para aferição de peso.



**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

### 3.7 CONTAGEM DE BACTÉRIAS FECAIS E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO INTESTINO E EM FEZES

Para a contagem de bactérias em amostras fecais foram utilizadas fezes frescas, coletadas por 3 dias consecutivos até a eutanásia. Para tanto, as fezes foram homogeneizadas em água peptonada (100 mg/mL) e em seguida diluídas (1:9) de forma seriada ( $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ ). Alíquotas de 20  $\mu$ L das respectivas diluições foram inoculadas pela técnica de microgota (MILES; MISRA; IRWIN, 1938) em placas de Petri estéreis contendo ágar para contagem de Enterobactérias (ágar MacConkey, HiMedia, Índia), *Enterococcus* (ágar Bile Esculin, HiMedia, Índia), *Escherichia* (ágar Eosin Methylene Blue, HiMedia, Índia), *Lactobacillus* (ágar de Man, Rogosa and Sharpe - MRS, HiMedia, Índia), *Bifidobacterium* (ágar Bifidobacterium, HiMedia, Índia). As placas de cultura de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram incubadas em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) durante 48 h e as de culturas de Enterobactérias,

*Enterococcus* e *Escherichia* em aerobiose a 37°C durante 24 h. Após a incubação, as colônias características nos meios de cultura seletivos foram contadas e os números de células viáveis (Unidades Formadoras de Colônias - UFC) foram expressos em Log<sub>10</sub> UFC/g de fezes (DA SILVA et al., 2013; TAVARES et al., 2021).

Para a quantificação de ácidos orgânicos em amostras fecais foram utilizadas fezes coletadas diretamente da gaiola do rato, coletadas por 3 dias consecutivos até a eutanásia. A quantificação de ácidos orgânicos também foi realizada no intestino, coletado após a eutanásia dos ratos. Os ácidos orgânicos (acético, fórmico, láctico, propiônico e succínico) de fezes e intestino foram quantificados a partir da extração com 1 g de amostra que foi diluída em 5 mL de ácido sulfúrico a 4,0 mM/L, em seguida solubilizada com auxílio de agitador de tubos e centrifugada a 5.8136 x *g* por 10 min. Então, o sobrenadante foi coletado utilizando agulha acoplada a seringa e filtrado com filtro de seringa (Millex Milipore, Barueri, SP, Brasil) de 0,45 µm diretamente em microtubo de 1,5 mL.

O sobrenadante foi analisado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com um sistema LC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento de coluna termostato (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B) acoplado a um detector de matriz de diodo (modelo G1315D) e detector de índice de refração (modelo G1362A). Durante a análise a coluna Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com tamanho de partícula de 8,0 µm e coluna de guarda PL Hi-Plex H (5 x 3 mm) (Agilent Technologies) foram mantidas a 50°C, o volume de injeção foi de 10 µL, vazão de 0,5 mL/min, fase móvel 4,0 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em água ultrapura e corrida de 20 min. Os dados obtidos foram processados usando OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies).

Os picos das amostras de CLAE foram identificados comparando seus tempos de retenção com aqueles dos padrões de ácido orgânico. Foram realizadas injeções em duplicado e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação. Os dados obtidos foram processados usando OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies) e expressos em µmol/g (BATISTA et al., 2018; COELHO et al., 2018). Os padrões de ácidos acético, butírico,

propilônico, succínico e láctico foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o padrão de ácido fórmico foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), todos com uma pureza de  $\geq 99\%$ .

### 3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes foram realizados por 2 avaliadores treinados e também filmados, utilizando uma câmera IP (marca D-Link, modelo IP2P Wireless, Shenzhen, China) acoplada a suporte instalado em cada um dos aparatos. Antes e depois da exposição de cada animal, os aparatos foram adequadamente higienizados com álcool etílico a 10%.

#### 3.8.1 Comportamento do tipo ansioso

O comportamento do tipo ansioso nos ratos foi avaliado nos 23º e 24º dias de experimento, através dos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

O teste de campo aberto consiste em uma arena circular feita de acrílico, com 1 m de diâmetro, parede lateral com 50 cm de altura e piso pintado de branco com linhas pretas, estas consistindo em dois círculos concêntricos divididos por linhas radiais formando áreas de 20 cm<sup>2</sup> (Figura 6).

**Figura 6** - Aparato para o teste de Campo Aberto.



**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Cada animal foi posicionado no centro do aparato e observado durante 5 min para os comportamentos: ambulação (registrada pelo número de segmentos atravessados pelo animal com as 4 patas), tempo de congelamento (animal estático, apenas com movimentos da respiração e vibrissas), tempo de autolimpeza (limpeza do nariz/face e do corpo), número de exploração de pé (comportamento em que o animal equilibra-se apenas sobre as patas traseiras, sem tocar nas paredes) e defecação (número de bolos fecais presentes no aparelho, após observação de cada animal) (PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976). Nesse teste, a diminuição da exploração é considerado um comportamento associado à ansiedade (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018).

O labirinto em cruz elevado consiste de dois braços abertos e opostos, medindo 50 x 10 cm, e dois fechados em suas três faces externas por paredes de 40 cm de altura, e as plataformas com a mesma medida dos braços abertos, cruzando-os perpendicularmente, o que delimita uma área central de 10 cm<sup>2</sup> (Figura 7) (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993).

**Figura 7** - Aparato para o Labirinto em Cruz Elevado.



**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Cada animal foi posicionado na plataforma central de frente para um dos braços abertos e observado durante 5 min para os comportamentos: número de entradas nos braços abertos, fechados e centro; tempo de permanência nos braços abertos, fechados e centro. Quando um rato é exposto ao labirinto em cruz elevado

pela primeira vez, eles apresentam sinais de conflito, esquiva e fuga, sendo que o animal considerado mais “ansioso” vai menos vezes e permanece por menos tempo nos braços abertos. (GRUNDMANN et al., 2007; PELLOW et al., 1985).

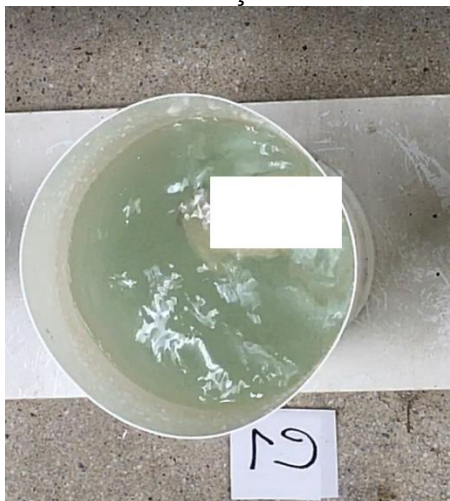
### 3.8.2 Comportamento do tipo depressivo

O comportamento do tipo depressivo dos ratos foi avaliado no 25° e 26° dia de experimento, através dos testes do esguicho e do nado forçado.

O teste do esguicho consiste em esguichar uma solução de sacarose a 10% no focinho do animal, e registrar o tempo de latência e a atividade de autolimpeza (limpeza do nariz/ face e do corpo) durante 5 min. Este teste é utilizado para avaliar os déficits motivacionais e as dificuldades de autocuidado como sintomas de depressão em roedores (AIT BALI; BA-MHAMED; BENNIS, 2017; BIRMANN et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Para o teste de nado forçado foi utilizado um cilindro (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), com água na profundidade de 30 cm e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 8).

**Figura 8** - Aparato para teste de nado forçado.



**Fonte:** Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Os ratos foram colocados, individualmente, no cilindro de água e submetidos ao teste por 5 min, em uma única sessão, sendo avaliado o tempo de nado (movimentos ativos, com o animal nadando – movimentos horizontais das patas

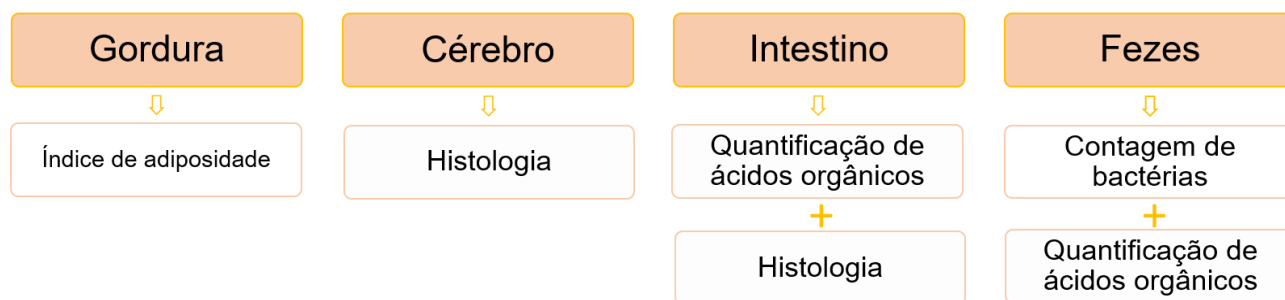
dianteiras ou mergulhando – movimentos verticais das patas dianteiras), tempo de imobilidade (animal flutua, realizando apenas movimentos necessários para manter a cabeça acima da água) e tempo de latência para imobilidade (tempo decorrido até o primeiro comportamento de imobilidade). Nesse teste, o aumento da imobilidade é considerado como comportamento depressivo (COSTA et al., 2013; FOUAD, 2020; MARTÍNEZ-MOTA et al., 2011; SLATTERY; CRYAN, 2012). Após a saída de cada animal foi realizada a troca de água e limpeza do aparato com álcool etílico a 10%.

### 3.9 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Antes da eutanásia foram avaliados o peso e comprimento naso-anal para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), o peso corporal (g) foi dividido pelo comprimento ao quadrado (cm<sup>2</sup>).

Ao final do experimento, todos os animais jejuaram por 6 h e então foram eutanasiados via decapitação por guilhotina (EB271, Insights, Ribeirão Preto, Brasil), de acordo com a resolução normativa nº 13 de 2013 do CONCEA para coleta de sangue e órgãos para as análises de interesse (Figura 9).

**Figura 9** - Coleta de material biológico e respectivas análises.



**Fonte:** Autoral.

Após a eutanásia, foram coletadas as gorduras visceral, gonadal e subcutânea, caracterizando a gordura total, que foram pesadas e descartadas. O índice de adiposidade foi calculado pela equação 2 (NASCIMENTO et al., 2011).

$$\frac{GT}{PT} * 100 \text{ (Eq.: 2)}$$

Onde, GT= gordura corporal total e PT= peso corporal total.

### 3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Fragmentos do cérebro (hipocampo) e intestino (cólon) foram retirados, lavados em solução salina (NaCl a 0,9%), fixados em formol tamponado a 10% por 48 h e em seguida submetidos ao protocolo de processamento histológico. Para tal, as amostras foram submetidas aos processos de desidratação em soluções crescentes de etanol, diafanização em xilol, inclusão em parafina e após isso seccionadas em micrótomos obtendo cortes na espessura de 3-4 micras. As lâminas obtidas foram coradas por hematoxilina-eosina e então submetidas à análise em microscópio óptico comum (Motic BA 200, Santa Monica, EUA), em objetivas crescentes de 4, 10, 20 e 40x. Após o procedimento, as lâminas foram fotografadas e avaliados a arquitetura estrutural dos órgãos (BATISTA et al., 2018).

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados de consumo alimentar, calórico e de macronutriente, parâmetros somáticos, contagem de bactérias fecais e teor de ácidos orgânicos no intestino e fezes foram analisados por Análise de Variância de uma via (*One Way ANOVA*), seguido pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e os resultados expressos como média e desvio-padrão. Já os dados dos parâmetros comportamentais foram analisados em pares, via teste *t de Student*, com exceção dos parâmetros de número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados, do teste de labirinto em cruz elevado, que foram analisados via Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), todos os resultados dos testes comportamentais foram expressos como média, mediana e percentis 25 e 75%. Utilizou-se o pacote GraphPadPrism 8® (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

A partir dos resultados foi elaborado o artigo apresentado no apêndice A intitulado “Intermittent fasting associated with aerobic training can influence parameters related to the gut-brain axis of wistar rats?” que aborda a avaliação de parâmetros relacionados ao eixo intestino-cérebro de ratos Wistar submetidos ao jejum intermitente associado ao treinamento aeróbico. Os resultados demonstram o menor consumo pelo grupo JS, comparado ao grupo CT. O grupo CT apresentou o menor IMC entre os grupos, contudo o índice de adiposidade foi semelhante entre CT, JS e JT. JT apresentou menor contagem de bactérias ácido lácticas, enquanto JS apresentou maior contagem de *Bifidobacterium* (comparado ao grupo CT) e *Enterococcus* comparado aos demais grupos. O grupo JT apresentou efeito ansiolítico e os grupos submetidos ao jejum tiveram efeito antidepressivo, esses resultados podem ter relação com os teores de ácidos orgânicos nas fezes e intestino desses grupos. Contudo, o jejum ocasionou diferentes lesões cerebrais e intestinais, independentemente do exercício.

## REFERÊNCIAS

AIT BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 1–12, 2017.

ARORA, T.; SHARMA, R.; FROST, G. Propionate . Anti-obesity and satiety enhancing factor ? **Appetite**, v. 56, n. 2, p. 511–515, 2011.

ASSIS, L. et al. Interleukin-10 and collagen type II immunoexpression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in an experimental model of osteoarthritis. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 9, p. 1875–1882, 2018.

BASSON, A. R.; LAM, M.; COMINELLI, F. Complementary and Alternative Medicine Strategies for Therapeutic Gut Microbiota Modulation in Inflammatory Bowel Disease and their Next-Generation Approaches. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 689–729, 2017.

BATISTA, K. S. et al. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 30–41, 2018.

BELKACEMI, L. et al. Intermittent Fasting Modulation of the Diabetic Syndrome in Streptozotocin-Injected Rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

BIRMANN, P. T. et al. 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 126–133, 2019.

BONAZ, B.; BAZIN, T.; PELLISSIER, S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1–9, 2018.

BRASIL. **RESOLUÇÃO NORMATIVA No 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013. Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2013.

BRESSA, C. et al. Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–21, 2017.

CABRAL-COSTA, J. V. et al. Intermittent fasting uncovers and rescues cognitive phenotypes in PTEN neuronal haploinsufficient mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CATENACCI, V. A. et al. A randomized pilot study comparing zero-calorie

alternate-day fasting to daily caloric restriction in adults with obesity. **Obesity**, v. 24, n. 9, p. 1874–1883, 2016.

CATTERSON, J. H. et al. Short-Term, Intermittent Fasting Induces Long-Lasting Gut Health and TOR-Independent Lifespan Extension. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. 1714–1724.e4, 2018.

CERQUEIRA, F. M. et al. Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1454–1460, 2011.

CHAIX, A.; ZARRINPAR, A. The effects of time-restricted feeding on lipid metabolism and adiposity. **Adipocyte**, v. 4, n. 4, p. 319–324, 2015.

CHEN, K. et al. Altered gene expression in early postnatal monoamine oxidase A knockout mice. **Brain Research**, v. 1669, p. 18–26, 2017.

CHEN, Z. et al. Effect of Aerobic Exercise on Treg and Th17 of Rats with Ischemic Cardiomyopathy. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 11, n. 3, p. 230–235, 2018.

CHENG, C.-W. et al. Fasting-Mimicking Diet Promotes Ngn3-Driven  $\beta$ -Cell Regeneration to Reverse Diabetes. **Cell**, v. 168, n. 5, p. 775–788.e12, 2017.

CHERIF, A. et al. Three days of intermittent fasting: Repeated-sprint performance decreased by vertical-stiffness impairment. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 12, n. 3, p. 287–294, 2017.

CIGNARELLA, F. et al. Clinical and Translational Report Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota Clinical and Translational Report Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1222–1235.e6, 2018.

CODELLA, R.; LUZI, L.; TERRUZZI, I. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 4, p. 331–341, 2018.

COELHO, E. M. et al. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160–167, 2018.

COLLIER, R. Intermittent fasting: the science of going without. **Canadian Medical Association journal**, v. 185, n. 9, p. 363–364, 2013.

CONTI, F. F. et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: Autonomic, inflammatory, and oxidative

stress evaluations. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p. R1532–R1539, 2015.

COSTA, A. P. R. et al. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150–155, 2013.

DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882–890, 2013.

DE LIMA, F. D. et al. Acute metabolic response to fasted and postprandial exercise. **International Journal of General Medicine**, v. 8, p. 255–260, 2015.

DENOU, E. et al. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 11, p. E982–E993, 2016.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 489–503, 2017.

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**, v. 17, n. 11, p. 1–9, 2020.

DU SERT, N. P. et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. 1–12, 2020.

DURGAN, D. J. et al. Examining the Role of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Stroke. **Stroke**, v. 50, n. 8, p. 2270–2277, 2019.

EVANS, C. C. et al. Exercise Prevents Weight Gain and Alters the Gut Microbiota in a Mouse Model of High Fat Diet-Induced Obesity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92193, 2014.

FAN, Q.-Y. et al. Antidepressant-like Effects of ZBH2012001, a Novel Potent Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitor. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, n. 8, p. 700–706, 2016.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Exercise training increases GAD65 expression, restores the depressed GABAA receptor function within the PVN and reduces sympathetic modulation in hypertension. **Physiological Reports**, v. 7, n. 13, p. 1–15, 2019.

FOUAD, G. I. Combination of Omega 3 and Coenzyme Q10 Exerts

Neuroprotective Potential Against Hypercholesterolemia-Induced Alzheimer's-Like Disease in Rats. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 5, p. 1142–1155, 2020.

FRYE, R. E. et al. Gastrointestinal dysfunction in autism spectrum disorder: the role of the mitochondria and the enteric microbiome. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 1, p. 1–17, 2015.

GORKIEWICZ, G.; MOSCHEN, A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 1, p. 159–172, 2018.

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.

GOTTHARDT, J. D.; BELLO, N. T. Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding. **Physiology and Behavior**, v. 174, p. 49–56, 2017.

GRINCHII, D.; DREMENCIOV, E. Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs in Mood Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9532, 2020.

GRISÉ, K. N. et al. High Intensity Aerobic Exercise Training Improves Deficits of Cardiovascular Autonomic Function in a Rat Model of Type 1 Diabetes Mellitus with Moderate Hyperglycemia. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

GROUSSARD, C. et al. Tissue-Specific Oxidative Stress Modulation by Exercise: A Comparison between MICT and HIIT in an Obese Rat Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–11, 2019.

GRUNDMANN, O. et al. Anti-anxiety effects of Apocynum venetum L. in the elevated plus maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 406–411, 2007.

GUMAA, K. A. et al. The effects of fasting in Ramadan. **British Journal of Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 573–581, 1978.

HARVIE, M. et al. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v . daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 8, p. 1534–1547, 2013.

HARVIE, M. N. et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: A randomized trial in young overweight women. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 5, p. 714–727, 2011.

HATORI, M. et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 848–860, 2012.

HEADLAND, M. et al. Weight-loss outcomes: A systematic review and meta-analysis of intermittent energy restriction trials lasting a minimum of 6 months. **Nutrients**, v. 8, n. 6, p. 354, 2016.

HOUSER, M. C.; TANSEY, M. G. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? **npj Parkinson's Disease**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.

HU, J. et al. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 1243–1249, 2018.

HUANG, W. C. et al. Investigation of the effects of microbiota on exercise physiological adaption, performance, and energy utilization using a gnotobiotic animal model. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–13, 2019.

HUSSIN, N. M. et al. Efficacy of Fasting and Calorie Restriction (FCR) on mood and depression among ageing men. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 17, n. 8, p. 674–680, 2013.

JAMSHED, H. et al. Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 3–5, 2019.

JANGI, S. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12015, 2016.

KAUX, J. F. et al. Eccentric Training for Tendon Healing after Acute Lesion: A Rat Model. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 6, p. 1440–1446, 2017.

KELLY, J. R. et al. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 392, 2015.

KLEMPPEL, M. C. et al. Intermittent fasting combined with calorie restriction is effective for weight loss and cardio-protection in obese women. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2012.

KOBYLIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 43, 2015.

KOH, A. et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016.

LALANCETTE-HÉBERT, M. et al. Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 65, p. 312–327, 2017.

LAYDEN, B. T. et al. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. **Translational Research**, v. 161, n. 3, p. 131–140, 2012.

LEBOUTHILLIER, D. M.; ASMUNDSON, G. J. G. The efficacy of aerobic exercise and resistance training as transdiagnostic interventions for anxiety-related disorders and constructs: A randomized controlled trial. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 52, p. 43–52, 2017.

LI, G. et al. Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 672– 685.e4, 2017.

LI, H.-B. et al. Exercise Training Attenuates Proinflammatory Cytokines, Oxidative Stress and Modulates Neurotransmitters in the Rostral Ventrolateral Medulla of Salt-Induced Hypertensive Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 1369–1381, 2018.

LI, L.; WANG, Z.; ZUO, Z. Chronic Intermittent Fasting Improves Cognitive Functions and Brain Structures in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66069, 2013.

LIRA, F. S. et al. Inflammation and adipose tissue: Effects of progressive load training in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1–10, 2010.

LIU, Y. et al. SIRT3 mediates hippocampal synaptic adaptations to intermittent fasting and ameliorates deficits in APP mutant mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019a.

LIU, Y. W. et al. Lactobacillus fermentum PS150 showed psychotropic properties by altering serotonergic pathway during stress. **Journal of Functional Foods**, v. 59, p. 352–361, 2019b.

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 181–192, 2014.

LUCAS LÓPEZ, R. et al. The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. **Apmis**, v. 125, n. 1, p. 3–10, 2017.

MACÊDO, P. F. C. DE et al. Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 5, p. 503–510, 2017.

MANKHONG, S. et al. Effects of aerobic exercise on tau and related proteins in rats with the middle cerebral artery occlusion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–12, 2020.

MANN, S.; BEEDIE, C.; JIMENEZ, A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. **Sports Medicine**, v. 44, n. 2, p. 211–221, 2014.

MARTÍNEZ-MOTA, L. et al. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 5, p. 900–905, 2011.

MATSUOKA, K.; KANAI, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 1, p. 47–55, 2015.

MATTSON, M. P.; LONGO, V. D.; HARVIE, M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. **Ageing Research Reviews**, v. 39, p. 46–58, 2017.

MCDONALD, M. W. et al. Aerobic exercise training improves insulin-induced vasorelaxation in a vessel-specific manner in rats with insulin-treated experimental diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 16, n. 1, p. 77–86, 2019.

MELO, K. P. et al. Mild Exercise Differently Affects Proteostasis and Oxidative Stress on Motor Areas During Neurodegeneration: A Comparative Study of Three Treadmill Running Protocols. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 2, p. 410–420, 2019.

MIKA, A.; FLESHNER, M. Early-life exercise may promote lasting brain and metabolic health through gut bacterial metabolites. **Immunology and Cell Biology**, v. 94, n. 2, p. 151–157, 2016.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732–749, 1938.

MITCHELL, S. J. et al. Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 221–228.e3, 2019.

MOON, H. Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor mediates the antidepressant actions of voluntary exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, p. 13094–13099, 2012.

MORAES, R. C. M. DE et al. Effects of intermittent fasting and chronic swimming exercise on body composition and lipid metabolism. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 12, p. 1341–1346, 2017.

MORGAN, J. A. et al. The effects of aerobic exercise on depression-like, anxiety-like, and cognition-like behaviours over the healthy adult lifespan of C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 337, p. 193–203, 2018.

MORO, T. et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2016.

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, p. 1029, 9 abr. 2020.

MURPHY, T.; DIAS, G. P.; THURET, S. Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies: Mind the Gap. **Neural Plasticity**, v. 2014, p. 1–32, 2014.

NAHARUDIN, M. N. BIN; YUSOF, A. The effect of 10 days of intermittent fasting on Wingate anaerobic power and prolonged high-intensity time-to-exhaustion cycling performance. **European Journal of Sport Science**, v. 18, n. 5, p. 667–676, 2018.

NASCIMENTO, A. F. et al. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. **Life Sciences**, v. 88, n. 23–24, p. 1031–1038, 2011.

OCHOA-REPÁRAZ, J.; KASPER, L. H. The Second Brain: Is the Gut Microbiota a Link Between Obesity and Central Nervous System Disorders? **Current Obesity Reports**, v. 5, n. 1, p. 51–64, 2016.

PAGAN, L. U. et al. Low-intensity aerobic exercise improves cardiac remodelling of adult spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 9, p. 6504–6507, 2019.

PARK, S. et al. Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 40, p. 14–22, 2017.

PATRIARCHI, T. et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. **Science**, v. 360, n. 6396, p. eaat4422, 2018.

PATTERSON, R. E. et al. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 115, n. 8, p. 1203–1212, 2015.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.

14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PETRIZ, B. A. et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2014.

PINTO, P. R. et al. Exercise training favorably modulates gene and protein expression that regulate arterial cholesterol content in CETP transgenic mice. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

QU, H. et al. Aerobic exercise inhibits CUMS-depressed mice hippocampal inflammatory response via activating hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF- $\kappa$ B pathway. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 8, p. 1–17, 2020.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I. et al. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e65465, 2013.

RAMSAY, R. R. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Molecular aspects of monoamine oxidase B. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 69, p. 81–89, 2016.

RIBEIRO, F. M. et al. Limited effects of low-to-moderate aerobic exercise on the gut microbiota of mice subjected to a high-fat diet. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 149, 2019.

SABOURI, M. et al. Comparing High-Intensity Interval Training (HIIT) and Continuous Training on Apelin, APJ, NO, and Cardiotrophin-1 in Cardiac Tissue of Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, p. 1–7, 2020.

SADEGHI, K. et al. A Comparative Study of the Efficacy of Cognitive Group Therapy and Aerobic Exercise in the Treatment of Depression among the Students. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 10, p. 54171, 2016.

SAINT-MAURICE, P. F. et al. Moderate-to-Vigorous Physical Activity and All-Cause Mortality: Do Bouts Matter? **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 6, p. 2003–2006, 2018.

SCHAUN, M. I. et al. Aerobic training prior to myocardial infarction increases cardiac GLUT4 and partially preserves heart function in spontaneously hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 42, n. 3, p. 334–337, 2017.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy

metabolism: the cellular perspective. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 6, p. 943–954, 2016.

SEIMON, R. V. et al. Do intermittent diets provide physiological benefits over continuous diets for weight loss? A systematic review of clinical trials. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 153–172, 2015.

SEO, D. Y. et al. Exercise-induced circulating irisin level is correlated with improved cardiac function in rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 1–11, 2020.

SERRA, D.; ALMEIDA, L. M.; DINIS, T. C. P. The Impact of Chronic Intestinal Inflammation on Brain Disorders: the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 10, p. 6941–6951, 2019.

SINGH, R. et al. Middle age onset short-term intermittent fasting dietary restriction prevents brain function impairments in male Wistar rats. **Biogerontology**, v. 16, n. 6, p. 775–788, 2015.

SINGH, R. K. et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2017.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

SMYERS, M. E. et al. Enhanced weight and fat loss from long-term intermittent fasting in obesity-prone, low-fitness rats. **Physiology and Behavior**, v. 230, p. 113280, 2021.

SOMMER, F. et al. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630–638, 2017.

SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56–64, 2016.

STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443–452, 2018.

SWENSON, S. et al. Chronic aerobic exercise: Lack of effect on brain CB1 receptor levels in adult rats. **Life Sciences**, v. 230, p. 84–88, 2019.

TAKAJO, T. et al. Depression Promotes the Onset of Irritable Bowel Syndrome through Unique Dysbiosis in Rats. **Gut and liver**, v. 13, n. 3, p. 325–332, 2019.

TAVARES, R. L. et al. Mucuna pruriens treatment shows anti-obesity and intestinal health effects on obese rats. **Food & Function**, 2021.

TIDJANI ALOU, M.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. **Human Microbiome Journal**, v. 1, p. 3–11, 2016.

TINSLEY, G. M. et al. Time-restricted feeding in young men performing resistance training: A randomized controlled trial. **European Journal of Sport Science**, v. 17, n. 2, p. 200–207, 2016.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 463–469, 1993.

UYSAL, N. et al. Regular aerobic exercise correlates with reduced anxiety and increased levels of irisin in brain and white adipose tissue. **Neuroscience Letters**, v. 676, p. 92–97, 2018.

VAN DER MERWE, M. et al. Time of feeding alters obesity-associated parameters and gut bacterial communities, but not fungal populations, in C57BL/6 male mice. **Current Developments in Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2020.

VANHEES, L. et al. Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in the management of cardiovascular health in individuals with cardiovascular risk factors: recommendations from the EACPR (Part II). **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 19, n. 5, p. 1005–1033, 2012.

VARADY, K. A. et al. Effects of weight loss via high fat vs. low fat alternate day fasting diets on free fatty acid profiles. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–7, 2015.

VASCONCELOS, A. R. et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 1–14, 2014.

VIEIRA, A. F. et al. Effects of aerobic exercise performed in fasted v. fed state on fat and carbohydrate metabolism in adults: A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 7, p. 1153–1164, 2016.

VITRAC, C.; BENOIT-MARAND, M. Monoaminergic Modulation of Motor Cortex Function. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, p. 1–21, 2017.

VUORENPÄÄ, A. et al. A kinome wide screen identifies novel kinases involved in regulation of monoamine transporter function. **Neurochemistry International**, v. 98, p. 103–114, 2016.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WAN, R. et al. Evidence that BDNF regulates heart rate by a mechanism involving increased brainstem parasympathetic neuron excitability. **Journal of Neurochemistry**, v. 129, n. 4, p. 573–580, 2014.

WANG, B. et al. Aerobic exercise protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via  $\beta$ 3-AR-nNOS-NO activation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–24, 2017.

WANG, H. BIN et al. Time-restricted feeding improves circadian dysfunction as well as motor symptoms in the Q175 mouse model of huntington's disease. **eNeuro**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2018.

WEI, S. et al. Intermittent administration of a fasting-mimicking diet intervenes in diabetes progression, restores  $\beta$  cells and reconstructs gut microbiota in mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2018.

WHO. **WHO Guidelines on physical activity and sedentary behaviour**. 2020.

WILSON, R. A. et al. Intermittent fasting with or without exercise prevents weight gain and improves lipids in diet-induced obese mice. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 346, 2018.

WU, H. B.; XIAO, D. S. Regulation of trace elements and redox status in striatum of adult rats by long-term aerobic exercise depends on iron uptakes. **Neuroscience Letters**, v. 642, p. 66–70, 2017.

YANG, L. et al. Exercise ameliorates insulin resistance of type 2 diabetes through motivating short-chain fatty acid-mediated skeletal muscle cell autophagy. **Biology**, v. 9, n. 8, p. 1–18, 2020.

YIN, L. et al. Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to promote neuronal death. **NeuroToxicology**, v. 64, p. 195–203, 2018.

ZARRINPAR, A. et al. 803 Diet and Time Restricted Feeding Modulate Cyclical Changes in the Gut Microbiome and Can Affect Metabolic Homeostasis Through Bile Acid Signaling. **Gastroenterology**, v. 146, n. 5, p. S-140, 2014.

ZHANG, K. et al. Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 674–683, 2016.

ZHANG, X. et al. Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. **Redox Biology**, v. 32, p. 101535, 2020.

ZHAO, C. et al. Discovery of potential genes contributing to the biosynthesis of short-chain fatty acids and lactate in gut microbiota from systematic investigation in *E. coli*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2019.

ZHOU, Z. L. et al. Neuroprotection of Fasting Mimicking Diet on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice via Gut Microbiota and Metabolites.

**Neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 741–760, 2019.

## APÊNDICE A – ARTIGO:

**PERIÓDICO:** Journal of Affective Disorders

**ISSN:** 0165-0327

**QUALIS:** A2

**FATOR DE IMPACTO:** 3,892

### INTERMITTENT FASTING ASSOCIATED WITH AEROBIC TRAINING CAN INFLUENCE PARAMETERS RELATED TO THE GUT-BRAIN AXIS OF WISTAR RATS?

#### ABSTRACT

*Background:* Intermittent fasting (IF) has been studied in association with aerobic exercise, both interventions demonstrate beneficial effects on the balance of the intestinal microbiota, making it necessary to assess whether these changes in the microbiota will bring benefits to the brain through the gut-brain axis. Therefore, the present study aimed to evaluate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats submitted to IF associated with aerobic training. *Methods:* the rats were randomized into 4 groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary fasting (SIF) and trained fasting (TIF), the interventions were performed during the 4 weeks of the experiment. *Results:* The adiposity index was similar between the TC ( $2.15 \pm 0.43\%$ ), SIF ( $1.98 \pm 0.69\%$ ) and TIF ( $1.86 \pm 0.51\%$ ) groups, differing from SC ( $2.98 \pm 0.80\%$ ). TIF had a lower count of lactic acid bacteria, while SIF had a higher count of *Bifidobacterium* and *Enterococcus* TIF had the highest amount of formic acid ( $44.44 \pm 2.40 \mu\text{mol/g}$ ), while SIF had the highest propionic acid content in the faeces ( $802.80 \pm 00.33 \mu\text{mol/g}$ ), followed by TIF ( $573.60 \pm 2.67 \mu\text{mol/g}$ ), in the gut TIF had the lowest amount of succinic acid ( $0.38 \pm 0.00 \mu\text{mol/g}$ ), while SIF had the lowest content of lactic acid ( $0.85 \pm 0.00 \mu\text{mol/g}$ ). TIF demonstrated an anxiolytic effect and SIF and TIF antidepressant effect. However, IF caused different brain and intestinal injuries, regardless of exercise. *Conclusion:* IF and aerobic exercise,

associated or not, can modulate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats and some benefits may be related to the levels of organic acids.

*Keywords:* Anxiety; Colon; Depression; Hippocampus; Lactic acid bacteria.

## 1 Introduction

Intermittent fasting (IF) is a dietary intervention that covers different protocols where the individual, on a voluntary basis, alternates between periods of deprivation or significant decrease in food intake, and periods of normal food intake (Mattson et al., 2017). One of the most widely used IF protocols is time-restricted, as constant fasting/feeding cycles stimulate a many number of signalling, neuroendocrine and metabolic pathways, boosting daily rhythms and regulating nutrient homeostasis (Hatori et al., 2012), in addition to maintaining a more natural eating rhythm (Chaix and Zarrinpar, 2015). This protocol consists of eating food during a daily time window, followed by the rest of the fasting day (Wang et al., 2018), where the individual eats food for less than 10 h and abstains from food for a period of at least 14 h (Jamshed et al., 2019).

The practice of IF has been studied in association with aerobic exercise, however, these studies focus primarily on body composition and lipid profile (Moraes et al., 2017; Smyers et al., 2021; Wilson et al., 2018). Both the IF (Cignarella et al., 2018; Li et al., 2017), and the aerobic exercise (Bressa et al., 2017; Petriz et al., 2014) demonstrate modulating the intestinal microbiota separately.

Aerobic exercise is also able to decrease anxiety-like behaviour (Morgan et al., 2018; Uysal et al., 2018) and is used as a non-pharmacological treatment for depression in animals (Moon et al., 2012) and humans (Sadeghi et al., 2016). However, in IF the effects on anxious behaviour are controversial (Cabral-Costa et al., 2018; Liu et al., 2019) and on depressive behaviour are scarce (Hussin et al., 2013). Besides, there are also few studies evaluating the gut-brain axis in IF.

The gut-brain axis establishes a relationship between the microbiota, its metabolites, neurological diseases and mental health (Ochoa-Repáraz and Kasper, 2016). Among the interaction mechanisms existing between these organs, one of

great importance is through the generation of several metabolites by the intestinal microbiota that, through the blood circulation, go to the brain and can modulate the function of the blood-brain barrier, as well as neurons, microglia and astrocytes (Durgan et al., 2019).

The main products of the intestinal microbiota are organic acids, including short-chain fatty acids (SCFA) - acetic, propionic, formic and butyric acids and intermediate fatty acids - succinic and lactic acids (Koh et al., 2016; Park et al., 2020), which act as ligands for G protein-coupled receptors (GPR), such as GPR41, which is expressed in the enteric and peripheral nervous system, and its activation induces the release of norepinephrine (Koh et al., 2016), the neurotransmitter responsible for the states of alertness, excitement and concentration, leading to awakening, waking, anxiety and stress response behaviours (Grinchii and Dremencov, 2020; Vitrac and Benoit-Marand, 2017).

In addition to organic acids, the intestinal microbiota is also capable of producing neurotransmitters, such as serotonin, a neurotransmitter responsible for promoting adaptations in behaviour (Vitrac and Benoit-Marand, 2017) and can activate the afferent fibres of the vagus nerve, which are distributed over all layers of the digestive wall and thus acting in signalling from the gut to the brain (Durgan et al., 2019).

Considering the aspects, we aim to evaluate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats submitted to intermittent fasting associated with aerobic training. And we hypothesize that IF and aerobic exercise can modulate parameters related to the gut-brain axis and when associated, this modulation can be synergistic.

## **2 Materials and methods**

### *2.1 Animals*

Forty Wistar rats with approximately 140 days of age and an average initial weight of  $380.80 \pm 23.04$  g were used, from the colony of Bioterium José Paulino (Federal University of Pernambuco - UFPE, Pernambuco, Brazil). The rats were

kept under standard conditions of lighting (light/dark cycle, 12/12h), temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $55\pm 5\%$ ), allocated in collective cages (five rats per cage), where they received drinking water and commercial feed. The cages of all groups were equipped with crates on their floor (measuring 36 cm x 31 cm, 2.5 cm deep, with a space of 1 cm between each bar) to serve as a barrier and prevent the rats from consuming wood shavings and faeces during the IF protocol. These modifications in the cages were defined in a pilot study carried out before the experiment.

The experiments were carried out at the Experimental Nutrition Laboratory (LANEX - Federal University of Paraíba - UFPB, Paraíba, Brazil), with prior approval from the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Paraíba - CEUA/UFPB under protocol no. 5028031219, according to the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments - ARRIVE guidelines (du Sert et al., 2020).

## *2.2 Study design and intermittent fasting protocol (IF)*

The rats were randomized into four groups: Sedentary control group (SC; n = 10): sedentary rats with access to feed ad libitum; Trained control group (TC; n = 10): trained rats with access to feed ad libitum; Group submitted to intermittent fasting and sedentary (SIF; n = 10); Group submitted to intermittent fasting and trained (TIF; n = 10).

All groups received a commercial Nuvilab diet (Colombo, Paraná, Brazil) which provides 311 kcal, 57% carbohydrates, 28% proteins and 14% lipids per 100 g of feed. The IF protocol used was time-restricted, where the rats spent four weeks (28 days), underfeed restriction for 15 h (17:00 - 8:00h) and ad libitum offer of feed for nine h (8:00 - 17:00h) (Belkacemi et al., 2012). This protocol was selected based on clinical studies (Domaszewski et al., 2020; Jamshed et al., 2019) and studies with rodents (Belkacemi et al., 2012; Van Der Merwe et al., 2020; Zhang et al., 2020), considering that the protocol time-restricted has also been widely used in clinical practice, as it prevents metabolic diseases without altering caloric intake (Domaszewski et al., 2020).

Food consumption was performed weekly to determine food intake (g), calculate caloric intake (kcal) and percentages of macronutrients consumed.

### *2.3 Training protocol*

In the week before the training period, the rats were submitted to the adaptation period to running on a treadmill, for 10 min for three alternate days a week at a speed of 15 m/min (Athletic advanced 2, Santa Catarina, Brazil) adapted with stalls (L: 30 cm x W: 7.7 cm x H: 15 cm).

The rats performance was classified according to the training scale described by Lira et al. (2010), where the rats receive a score from 1 to 5, according to the following parameters: 1 - Refused to run; 2 - Runner below average (runs and stops; runs in the wrong direction); 3 - Medium runner; 4 - Above average runner (runs constantly, occasionally running below the speed of the treadmill); 5 - Good runner (consistently above the speed of the treadmill). The rats with a rating equal to or above 3 were included in the trained groups, the rest were excluded from the experiment (data not shown).

The exercise protocol was performed during the four weeks of the experiment, at the end of the dark cycle, due to the nocturnal habit of the rodents. The protocol consisted of 30 min sessions, five times a week, at a speed of 15 m/min, without inclination (Pinto et al., 2018). The protocol was chosen based on the WHO recommendation (WHO, 2020) and studies with rodents (Chen et al., 2018; Mankhong et al., 2020).

### *2.4 Bacteria count in faeces*

For the counting of bacteria in faecal samples, fresh faeces were used, collected for 3 consecutive days before euthanasia. The faeces were homogenized in peptone water (100 mg/mL) and then diluted (1:9) in a serial manner ( $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ ). Aliquots of 20  $\mu$ L of the respective dilutions were inoculated by the micro drop technique (Miles et al., 1938) in sterile Petri dishes containing agar for counting *Enterobacteriaceae* (MacConkey agar, HiMedia, India), *Enterococcus* (Bile Esculin

agar, HiMedia, India), *Escherichia* (Eosin Methylene Blue agar, HiMedia, India), *Lactobacillus* (Man's agar, Rogosa and Sharpe - MRS, HiMedia, India), *Bifidobacterium* (Bifidobacterium agar, HiMedia, India). The culture plates of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were incubated in anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) for 48 h and those of cultures of *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* and *Escherichia* in aerobiosis at 37°C for 24 h. After incubation, the characteristic colonies in the selective culture media were counted and the numbers of viable cells (Colony Forming Units - CFU) were expressed in Log<sub>10</sub> CFU/g of faeces (da Silva et al., 2013; Tavares et al., 2021).

### 2.5 Quantification of organic acids in the gut and faeces

For the quantification of organic acids, faeces were collected directly in the rat cage for 3 consecutive days before euthanasia. This quantification was also performed in the gut, collected after the euthanasia of the rats. The extraction of acids was carried out from 1 g of the sample that was diluted in 5 mL of 4.0 mM/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then solubilized with the aid of a tube shaker and centrifuged at 5,8136 g for 10 min. Then, the supernatant was collected using a needle attached to a syringe and filtered with a 0.45 µm syringe filter (Millex Millipore, Barueri, SP, Brazil) in a 1.5 mL microtube.

The organic acids (acetic, formic, lactic, propionic and succinic) of gut and faeces were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a 1260 Infinity LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) coupled to a PDA detector (G1315D; Agilent Technologies). For analysis, an Agilent Hi-Plax H (300×7.7mm) column with 8.0 µm particle size was used; the column was protected with a PL Hi-Plax H (5×3mm) guard column (Agilent Technologies). Column temperatures were maintained at 50 °C. Each sample was diluted in ultrapure water filtered through a 0.45-µm-pore membrane, with an injection volume of 10 µL, at a flow rate of 0.5mL/min and a runtime of 20 min. The phase was 4.0mm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) in ultrapure water (Scientific Mars System, São Paulo, SP, Brazil). Obtained data were processed using Open LAB CDS Cessation Edition (Agilent Technologies).

HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of organic acid standards. Duplicate injections were performed, and average peak areas were used for quantification. The data obtained were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies) and expressed in  $\mu\text{mol/g}$  (Batista et al., 2018; Coelho et al., 2018). The acetic, butyric, propionic, citric, lactic and malic acids standards were acquired from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and the formic acid standard was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), all with a purity of  $\geq 99\%$ .

## *2.6 Behavioural tests*

The tests were carried out in the last week of the experiment by two trained evaluators. The experiments were filmed, using an IP camera (D-Link brand, IP2P Wireless model, Shenzhen, China) attached to support installed in each of the devices. Before and after the exposure of each animal, the devices were adequately cleaned with ethyl alcohol 10%. Anxious behaviour was performed using open field and elevated plus maze tests, and depressive behaviour using splash test and forced swimming tests.

The open field test was performed in a circular acrylic arena, 1 m in diameter, 50 cm high sidewall and white floor with black lines, these consisting of two concentric circles divided by radial lines forming areas of  $20\text{ cm}^2$ . Each animal was positioned in the centre of the apparatus and observed for five min for behaviours: ambulation (recorded by the number of segments crossed by the animal with four legs), freezing time (static animal, only with breathing movements and vibrissae), grooming time (cleaning of the nose/ face and body), rearing number (behaviour in which the animal balances itself only on the hind legs, without touching the walls) and defecation (number of faecal cakes present in the appliance, after observation of each animal) (Pruet and Belzung, 2003; Walsh and Cummins, 1976).

The elevated plus-maze test was performed on an apparatus consisting of two open and opposite arms, measuring  $50 \times 10\text{ cm}$ , and two closed on their three external faces by walls 40 cm high, and platforms with the same measure with open arms, crossing them perpendicularly, which delimits a central area of  $10\text{ cm}^2$  (Treit

et al., 1993). Each animal was positioned on the central platform facing one of the open arms and observed for five min for behaviours: number of entries in the open and closed arms and centre; time spent in the open and closed arms and centre (Grundmann et al., 2007; Pellow et al., 1985).

The splash test consists of squirting a 10% sucrose solution on the animal snout and recording the latency time and grooming activity (cleaning the nose/ face and body) for five min (Ait Bali et al., 2017; Birmann et al., 2019; Zhang et al., 2016).

For the forced swim test, a cylinder (30 cm in diameter and 50 cm in height) was used, with water at a depth of 30 cm and a temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The rats were placed individually, in the water cylinder and subjected to the test for five min, in a single session, being evaluated the swimming time (active movements, with the animal swimming or diving), immobility time (animal floats, performing only movements necessary to keep the head above water) and latency time for immobility (time elapsed until the first immobility behaviour) (Costa et al., 2013; Fouad, 2020; Martínez-Mota et al., 2011; Slattery and Cryan, 2012). After leaving each animal, the water was changed and the apparatus was cleaned with ethyl alcohol.

## *2.7 Euthanasia and collection of biological material*

Before euthanasia, weight and naso-anal length were evaluated to calculate the Body Mass Index (BMI).

At the end of the experiment, the rats fasted for 6 h and then they were euthanized by beheading using guillotine (EB271, Insights, Ribeirão Preto, Brazil) to collect blood and organs for analysis of interest. Visceral, gonadal and subcutaneous fats were collected, characterizing the total fat, which were weighed and discarded. The adiposity index was calculated using equation 1 (Nascimento et al., 2011):

(Equation 1)  $TF/TW * 100$

Where, TF = total body fat and TW = total body weight

## *2.8 Histological analysis*

Fragments of the brain (hippocampus) and gut (colon) were removed, washed in saline solution (0.9% NaCl), fixed in 10% buffered formaldehyde for 48 h and then submitted to the histological processing protocol. For this, the samples were subjected to dehydration processes in growing solutions of ethanol, diaphanization in xylol, inclusion in paraffin and after that sectioned in microtomes obtaining cuts in the thickness of 3-4 microns. The slides obtained were stained with hematoxylin-eosin and then subjected to analysis under a common optical microscope (Motic BA 200, Santa Monica, USA), with increasing objectives of 4, 10, 20 and 40x. After the procedure, the slides were photographed and the structural architecture of the organs was evaluated (Batista et al., 2018).

## *2.9 Statistical analysis*

The data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. The data of food consumption, somatic parameters, faecal bacteria count and organic acid content in the gut and faeces were analyzed via One Way ANOVA, followed by the Tukey post-test with a significance of 5% ( $p \leq 0.05$ ) and the results expressed as mean and standard deviation. The behavioural parameters data were analyzed in pairs, via Student's t test, except for the parameters of number of entries and time spent in the open and closed arms, of the elevated plus maze test, which were analyzed via Mann-Whitney, with a significance of 5% ( $p \leq 0.05$ ). All behavioural test results were expressed as mean, median and 25% and 75% percentiles. The GraphPadPrism 8® package (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) was used.

### 3 Results

#### 3.1 Effects of intermittent fasting and aerobic exercise on food consumption and somatic parameters

SIF showed the lowest consumption ( $p \leq 0.05$ ) in grams, kcal, carbohydrates, proteins and lipids compared to the TC group, which in turn did not differ from the other groups ( $p > 0.05$ ). Although TC showed the lowest BMI compared to the other groups ( $p \leq 0.05$ ), the adiposity index was similar ( $p > 0.05$ ) between TC, SIF and TIF which in turn differed from SC, which had the greater adiposity ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. S1).

#### 3.2 Effects of intermittent fasting and aerobic exercise on Bacteria count in faeces and quantification of organic acids in the gut and faeces

TIF showed a lower count of lactic acid bacteria (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*) compared to the other groups ( $p \leq 0.05$ ). However, a higher *Bifidobacterium* count was observed in SIF when compared to the TC group ( $p \leq 0.05$ ). SIF had the highest *Streptococcus* count compared to the other groups ( $p \leq 0.05$ ) and the *Enterobacteriaceae* and *Escherichia* counts were similar between all groups ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

TIF showed a lower amount of succinic acid in the gut, compared to the other groups ( $p \leq 0.05$ ), however, there was no significant difference in the content of this same acid in the faeces ( $p > 0.05$ ). SIF showed a lower amount of lactic acid in the gut and faeces ( $p \leq 0.05$ ). TIF had the highest amount of formic acid in the faeces and in the gut differed only from the SIF group ( $p \leq 0.05$ ). SIF had the highest propionic acid content in the faeces, however, in the gut TC it had the highest amount, compared to sedentary groups ( $p \leq 0.05$ ). SIF and TIF had the lowest levels of acetic acid in the faeces, followed by TC ( $p \leq 0.05$ ) (Table 1).

#### 3.3 Effects of intermittent fasting and aerobic exercise on anxious behaviour

In the open field, the groups did not differ in the parameters of ambulation,

freezing and grooming ( $p>0.05$ ). TIF had the highest number of faeces expelled compared to the other groups ( $p\leq 0.05$ ). The TIF group spent more time in rearing behaviour, compared to the SIF group ( $p\leq 0.05$ ) and the other groups were similar with their peers ( $p>0.05$ ) (Fig. 1).

In the elevated plus-maze test, TIF had the lowest number of entries in the closed arms, compared to the TC and SIF groups ( $p\leq 0.05$ ). ( $p\leq 0.05$ ). As for the time spent in the centre, TIF had a lower permeation, compared to the TC group ( $p\leq 0.05$ ), and the other groups were similar to their peers ( $p>0.05$ ) (Fig. 2).

### *3.4 Effects of intermittent fasting and aerobic exercise on depressive behaviour*

In the splash test, there was no statistical difference in the latency and grooming parameters ( $p>0.05$ ). In the forced swim test, SIF differed from the SC group in the parameters of swimming time, latency and immobility ( $p\leq 0.05$ ) and the TIF group differed from the TC group in the parameters of swimming and immobility ( $p\leq 0.05$ ), there was no difference in the latency to start swimming ( $p>0.05$ ). The groups submitted to fasting were similar to each other in all parameters ( $p>0.05$ ) (Fig. 3).

### *3.5 Effects of intermittent fasting and aerobic exercise on histological analyses*

The histological sections of the hippocampus stained in hematoxylin and eosin (HE) of the SC (Fig. 4A) and TC (Fig. 4B) groups show preserved neurons in all their regions, especially in the dentate gyrus (represented region), compatible with tissue healthy nervous. However, SIF rats (Fig. 4C) presented ischemic neurons characterized by cells of broad cytoplasm, hypereosinophilic and with hypertrophic and hyper-coloured nucleus (\*). The TIF rats (Fig. 4D), exhibited the same lesions present in the SIF group with the addition of neuronal death, in this group small cell bodies with formation of pericellular halo are observed, compatible with apoptosis (▼) in various regions of the hippocampus.

In the histological sections of the colon stained in HE of the SC (Fig. 4E) and TC (Fig. 4F) groups, preserved villi are observed, with a regular distribution pattern

of the goblet cells and a lamellar lamina propria, compatible with a healthy organ. However, the colon of SIF (Fig. 4G) and TIF (Fig. 4H) rats showed an increase in the number of mononuclear type inflammatory cells, especially macrophages and lymphocytes in the own blade (#), in addition to the reduction of villi width and distribution of goblet cells, compatible with atrophy (↘).

## 4 Discussion

Our results demonstrated how IF and aerobic exercise, associated or not, can modulate parameters related to the gut-brain axis such as improvement in somatic, behavioural parameters of anxiety and depression and quantification of organic acids in the gut and faeces, but they do not necessarily act synergistically as one might hypothesize from the results of previous studies that evaluated the IF protocols (Cabral-Costa et al., 2018; Li et al., 2017; Liu et al., 2019, 2020) and aerobic exercise (Petriz et al., 2014; Ribeiro et al., 2019; Uysal et al., 2018; Yang et al., 2020) alone in rodents.

SIF consumed less amount of feed, macronutrients and calories than the TC group, demonstrating that fasting did not cause compensatory excessive consumption. This result may be related to the fact that SIF had a higher content of formic and propionic acids in the faeces when compared to the TC group. Formic and propionic acids can act by binding to GPR41, and increase the production of the YY peptide, anorectic hormone, causing the lowest food consumption (Kobyliak et al., 2015; Koh et al., 2016).

The TC group had the lowest BMI among the groups, however, the adiposity index was similar between TC, SIF and TIF, which may indicate that the fasting protocols inhibit the loss of lean mass. Previous studies show that IF maintains lean mass in rodents (Gotthardt et al., 2016) and humans (Moro et al., 2016), this is because in the fasting state there is a decrease in glucose metabolism and consequent degradation of fatty acids. During  $\beta$  oxidation of fatty acids in the mitochondria, acetyl-CoA is released, which will be used to produce ketone bodies (Sakakibara et al., 2009). Elevated levels of ketone bodies preserve lean mass when used as an energy source (Choi et al., 2018; Jamshed et al., 2019).

Although previous studies have shown that IF (Chaix and Zarrinpar, 2015; Van Der Merwe et al., 2020) and the practice of aerobic exercise (Souza Cordeiro et al., 2019) promote less adiposity, when we combine both treatments, reduction in the adiposity index was not potentiated, differing in parts of previous studies, where the IF associated with aerobic exercise potentiated the reduction of fat mass considering the body composition (Smyers et al., 2021; Wilson et al., 2018).

In the elevated plus-maze test, TIF had fewer entries in the closed arms and less permanence in the centre, compared to SIF. In this test, the behaviour of the anxious type would be demonstrated by a greater preference for the closed arms, compared to the open arm (Lamontagne et al., 2016). In the open field test, the decrease in exploration would be a behaviour associated with anxiety (Sturman et al., 2018), our results demonstrate an increase in the rearing of TIF rats compared to SIF.

Together, the results of the open field test and the elevated plus-maze test demonstrate the anxiolytic effect of the IF associated with aerobic training. By stimulating lipolysis, IF and aerobic exercise induce an increase in free plasma tryptophan, a precursor to serotonin, which in turn is considered a neurotransmitter that has a role in regulating mood, thereby inducing anxiolytic (Liu et al., 2020; Otsuka et al., 2016).

Defecation was also increased in the TIF group in the open field, however, this parameter can be justified by the concentrations of propionic acid in the gut and faeces, as it can also be related to the practice of exercise, since both factors can increase motility stimulation colon muscle, leading to a reduction in intestinal transit time, thus leading to a higher frequency of defecation (Hou et al., 2004; Koh et al., 2016; Van Nieuwenhoven et al., 2004). Such a result may have been beneficial, since by increasing the speed of transit of the small gut, the delivery of nutrients to the cecum and colon is also increased (Evans et al., 2014).

The practice of fasting had an antidepressant action analyzed in the forced swimming test, regardless of whether it was associated with exercise or not, evidenced by the longer swimming time and shorter immobility time of the SIF and TIF groups, in addition to a longer SIF latency time, when compared to your controls.

It is important to note that there is a gap in the literature regarding the effects of IF in parameters related to depression.

These results may also have been influenced by the levels of SCFA, such as formic and propionic acids in the faeces that stood out in these groups. SCFA reach the circulation and directly affect the brain, being able to permeate the blood-brain barrier, through monocarboxylate transporters, functioning as signalling molecules, promoting beneficial effects on behaviour (Hu et al., 2018; Koh et al., 2016). Besides, in SIF rats there was also a higher *Bifidobacterium* count that is associated with improved brain health in humans (Ma et al., 2021) and antidepressant effect in mice of the ICR strain induced to chronic stress (Guo et al., 2019).

Based on the anxiolytic and antidepressant capacity demonstrated in our results, benefits in cerebral histology were expected, since the hippocampus is involved in the expression of emotions, such as anxiety (Ajayi and Mills, 2019). However, our results demonstrate ischemic neurons in the SIF and TIF groups, in addition to neuronal death in the TIF group. Conflicting with other studies where the IF demonstrated neuronal protection, by decreasing oxidative stress and inflammatory response (factors that lead to ischemic damage and neuronal death) (Sim et al., 2021), either by decreasing the production and release of reactive species of oxygen (Fann et al., 2017), increased antioxidant enzymes (Hu et al., 2019) or decreased pro-inflammatory cytokines (Arumugam et al., 2010).

Also, the SIF and TIF groups showed a reduction in villus width, goblet cell atrophy and an increase in the number of inflammatory cells in the gut, results that corroborate the lower lactic bacteria count in the TIF group. However, it was expected that both interventions would cause significant beneficial changes in the faecal bacteria count, and when associated, that this effect would be enhanced since both the IF (Cignarella et al., 2018; Li et al., 2017) and the practice of aerobic exercise (Bressa et al., 2017; Petriz et al., 2014) have associations of their benefits because of the modulation of the microbiota.

A previous study demonstrated that cognitive benefits of IF in diabetic mice were eliminated after removal of the intestinal microbiota by treatment with antibiotics (Liu et al., 2020) and on the other hand, healthy mice undergoing IF transferred their benefits to mice induced by autoimmune encephalomyelitis

experimental, through microbiota transplantation (Cignarella et al., 2018). Just as aerobic exercise has also been shown to modulate the intestinal microbiota in healthy rodents (Huang et al., 2019; Queipo-Ortuño et al., 2013).

On the other hand, our results demonstrate that the SIF group had a higher *Bifidobacterium* and *Streptococcus* count, the TC group had no difference from the SC group and unexpectedly the TIF group had lower *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* counts, corroborating with studies that demonstrate that exercise may not contribute to significant changes in the microbiota, both in healthy rodents (Lamoureux et al., 2017), and in rodents that received a high-fat diet (Ribeiro et al., 2019), which may be related to the low intensity of exercise, since high-intensity exercises demonstrate improvement in microbial diversity (Denou et al., 2016). Additionally, studies show that the greatest potential to promote modulation of the microbiota occurs when exercise begins in the development period and not in adulthood (Cronin et al., 2018; Ribeiro et al., 2019).

*Bifidobacterium* and *Streptococcus* are acetic acid producers (Koh et al., 2016) and were highlighted in SIF, however, the levels of this SCFA were lower in the faeces of the SIF and TIF groups, which may have been used as fuel during fasting (Schönfeld and Wojtczak, 2016), in addition to being an energy supplier for astrocytes in the brain (Hu et al., 2018).

Lactic acid is the main product of fermenting bacteria, such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (Schönfeld and Wojtczak, 2016); however, although the SIF group had a higher *Bifidobacterium* count compared to TC and SIF and a higher *Lactobacillus* count compared to TIF, the lactic acid content in the SIF was lower than in the other groups. This result can be justified by the fact that this organic acid is used for the synthesis of propionic acid which had the highest concentration in the faeces of the SIF group. Propionic acid can also be synthesized through succinic acid, also contributing to its contents in faeces (Louis et al., 2014). Butyric acid, in turn, was not detected in the faeces and gut, regardless of treatment, since it is quickly absorbed by colonocytes and consumed as an energy source (Batista et al., 2018; Koh et al., 2016).

As a study limitation, we identified the non-existence of a group with high intensity of exercise, which allowed to identify if the limited changes in the microbiota

would be related to the intensity of the training, in addition to the lack of groups with other IF protocols, allowing the direct comparison between these protocols and whether the benefits caused would be influenced by the same mechanisms.

## **5 Conclusion**

The results of the present study showed that intermittent fasting and aerobic exercise associated or not can modulate parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats, especially the behavioural parameters of anxiety and depression, histological alterations in gut-brain and the quantification of faecal bacteria. These results seem to have a close relationship with the quantified organic acids in the faeces and in the gut of rats, which may direct future studies to elucidate the mechanisms of action of these in the face of interventions with intermittent fasting and aerobic exercise.

## **Funding**

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES, Brazil) for a scholarship awarded to N.L. Soares (Grant number 001).

## **Declaration of Competing Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr Alexandre Sérgio Silva (Department of Physical Education, UFPB) for guidance regarding procedures related to aerobic training.

## References

- Ait Bali, Y., Ba-Mhamed, S., Bennis, M., 2017. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00146>
- Ajayi, I.E., Mills, P.C., 2019. Effects of the hippocampus on the motor expression of augmented breaths. *PLoS One* 14, 1–15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220760>
- Arumugam, T. V., Phillips, T.M., Cheng, A., Morrell, C.H., Mattson, M.P., Wan, R., 2010. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann. Neurol.* 67, 41–52. <https://doi.org/10.1002/ana.21798>
- Batista, K.S., Alves, A.F., Lima, M.D.S., Da Silva, L.A., Lins, P.P., De Sousa Gomes, J.A., Silva, A.S., Toscano, L.T., De Albuquerque Meireles, B.R.L., De Magalhães Cordeiro, A.M.T., Da Conceição, M.L., De Souza, E.L., Aquino, J.D.S., 2018. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 119, 30–41. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003282>
- Belkacemi, L., Selselet-Attou, G., Hupkens, E., Nguidjoe, E., Louchami, K., Sener, A., Malaisse, W.J., 2012. Intermittent Fasting Modulation of the Diabetic Syndrome in Streptozotocin-Injected Rats. *Int. J. Endocrinol.* 2012, 1–12.  
<https://doi.org/10.1155/2012/962012>
- Birmann, P.T., Sousa, F.S.S., Domingues, M., Brüning, C.A., Vieira, B.M., Lenardão, E.J., Savegnago, L., 2019. 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.04.014>
- Bressa, C., Bailén-Andrino, M., Pérez-Santiago, J., González-Soltero, R., Pérez, M., Montalvo-Lominchar, M.G., Maté-Muñoz, J.L., Domínguez, R., Moreno, D., Larrosa, M., 2017. Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS One* 12, 1–21.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171352>

- Cabral-Costa, J. V., Andreotti, D.Z., Mello, N.P., Scavone, C., Camandola, S., Kawamoto, E.M., 2018. Intermittent fasting uncovers and rescues cognitive phenotypes in PTEN neuronal haploinsufficient mice. *Sci. Rep.* 8, 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26814-6>
- Chaix, A., Zarrinpar, A., 2015. The effects of time-restricted feeding on lipid metabolism and adiposity. *Adipocyte* 4, 319–324.  
<https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1025184>
- Chen, Z., Yan, W., Mao, Y., Ni, Y., Zhou, L., Song, H., Xu, W., Wang, L., Shen, Y., 2018. Effect of Aerobic Exercise on Treg and Th17 of Rats with Ischemic Cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 11, 230–235.  
<https://doi.org/10.1007/s12265-018-9794-0>
- Choi, H.R., Kim, J., Lim, H., Park, Y.K., 2018. Two-week exclusive supplementation of modified ketogenic nutrition drink reserves lean body mass and improves blood lipid profile in obese adults: A randomized clinical trial. *Nutrients* 10, 1895. <https://doi.org/10.3390/nu10121895>
- Cignarella, F., Cantoni, C., Ghezzi, L., Cross, A.H., Zhou, Y., Piccio, L., Cignarella, F., Cantoni, C., Ghezzi, L., Salter, A., Dorsett, Y., Chen, L., Phillips, D., 2018. Clinical and Translational Report Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota Clinical and Translational Report Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 27, 1222-1235.e6.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.006>
- Coelho, E.M., da Silva Padilha, C.V., Miskinis, G.A., de Sá, A.G.B., Pereira, G.E., de Azevêdo, L.C., dos Santos Lima, M., 2018. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *J. Food Compos. Anal.* 66, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Costa, A.P.R., Vieira, C., Bohner, L.O.L., Silva, C.F., Santos, E.C. da S., De Lima, T.C.M., Lino-de-Oliveira, C., 2013. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 45, 150–155.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.002>
- Cronin, O., Barton, W., Skuse, P., Penney, N.C., Garcia-Perez, I., Murphy, E.F.,

- Woods, T., Nugent, H., Fanning, A., Melgar, S., Falvey, E.C., Holmes, E., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., Molloy, M.G., Shanahan, F., 2018. A Prospective Metagenomic and Metabolomic Analysis of the Impact of Exercise and/or Whey Protein Supplementation on the Gut Microbiome of Sedentary Adults. *mSystems* 3, 1–17. <https://doi.org/10.1128/msystems.00044-18>
- da Silva, J.K., Cazarin, C.B.B., Colomeu, T.C., Batista, Â.G., Meletti, L.M.M., Paschoal, J.A.R., Bogusz Júnior, S., Furlan, M.F., Reyes, F.G.R., Augusto, F., Maróstica Júnior, M.R., de Lima Zollner, R., 2013. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food Res. Int.* 53, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043>
- Denou, E., Marcinko, K., Surette, M.G., Steinberg, G.R., Schertzer, J.D., 2016. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 310, E982–E993. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00537.2015>
- Domaszewski, P., Konieczny, M., Pakosz, P., Baczkowicz, D., Sadowska-Krępa, E., 2020. Effect of a six-week intermittent fasting intervention program on the composition of the human body in women over 60 years of age. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1–9. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114138>
- du Sert, N.P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Durgan, D.J., Lee, J., McCullough, L.D., Bryan, R.M., 2019. Examining the Role of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Stroke. *Stroke* 50, 2270–2277. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.119.025140>
- Evans, C.C., LePard, K.J., Kwak, J.W., Stancukas, M.C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D.A., Smith, D., Chang, E.B., Ciancio, M.J., 2014. Exercise Prevents Weight Gain and Alters the Gut Microbiota in a Mouse Model of High Fat Diet-Induced Obesity.

- PLoS One 9, e92193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092193>
- Fann, D.Y.W., Ng, G.Y.Q., Poh, L., Arumugam, T. V., 2017. Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke. *Exp. Gerontol.* 89, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.014>
- Fouad, G.I., 2020. Combination of Omega 3 and Coenzyme Q10 Exerts Neuroprotective Potential Against Hypercholesterolemia-Induced Alzheimer's-Like Disease in Rats. *Neurochem. Res.* 45, 1142–1155. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02996-2>
- 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>
- Grinchii, D., Dremencov, E., 2020. Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs in Mood Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9532. <https://doi.org/10.3390/ijms21249532>
- Grundmann, O., Nakajima, J.I., Seo, S., Butterweck, V., 2007. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J. Ethnopharmacol.* 110, 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.035>
- Guo, Y., Xie, J.P., Deng, K., Li, X., Yuan, Y., Xuan, Q., Xie, J., He, X.M., Wang, Q., Li, J.J., Luo, H.R., 2019. Prophylactic effects of *Bifidobacterium adolescentis* on anxiety and depression-like phenotypes after chronic stress: A role of the gut microbiota-inflammation axis. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 126. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00126>
- Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E.A., Gill, S., Leblanc, M., Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J.A.J., Ellisman, M.H., Panda, S., 2012. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 15, 848–860. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>
- Hou, L., Ji, B.T., Blair, A., Dai, Q., Gao, Y.T., Chow, W.H., 2004. Commuting physical activity and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Am. J. Epidemiol.* 160, 860–867. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh301>

- Hu, J., Lin, S., Zheng, B., Cheung, P.C.K., 2018. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 1243–1249.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1245650>
- Hu, Y., Zhang, M., Chen, Y., Yang, Y., Zhang, J.J., 2019. Postoperative intermittent fasting prevents hippocampal oxidative stress and memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Eur. J. Nutr.* 58, 423–432.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1606-4>
- Huang, W.C., Chen, Y.H., Chuang, H.L., Chiu, C.C., Huang, C.C., 2019. Investigation of the effects of microbiota on exercise physiological adaption, performance, and energy utilization using a gnotobiotic animal model. *Front. Microbiol.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01906>
- Hussin, N.M., Shahar, S., Teng, N.I.M.F., Ngah, W.Z.W., Das, S.K., 2013. Efficacy of Fasting and Calorie Restriction (FCR) on mood and depression among ageing men. *J. Nutr. Health Aging* 17, 674–680. <https://doi.org/10.1007/s12603-013-0344-9>
- Jamshed, H., Beyl, R.A., Manna, D.L.D., Yang, E.S., Ravussin, E., Peterson, C.M., 2019. Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. *Nutrients* 11, 3–5. <https://doi.org/10.3390/nu11061234>
- Kobyliak, N., Virchenko, O., Falalyeyeva, T., 2015. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutr. J.* 15, 43.  
<https://doi.org/10.1186/s12937-016-0166-9>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F., 2016. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165, 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Lalancette-Hébert, M., Faustino, J., Thammisetty, S.S., Chip, S., Vexler, Z.S., Kriz, J., 2017. Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection. *Brain. Behav. Immun.* 65, 312–327.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.020>
- Lamontagne, S.J., Olmstead, M.C., Menard, J.L., 2016. The lateral septum and anterior hypothalamus act in tandem to regulate burying in the shock-probe test

but not open-arm avoidance in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 314, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.034>

Lamoureux, E. V., Grandy, S.A., Langille, M.G.I., 2017. Moderate Exercise Has Limited but Distinguishable Effects on the Mouse Microbiome. *mSystems* 2, 1–14. <https://doi.org/10.1128/msystems.00006-17>

Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R.G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Gavrilova, O., Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., 2017. Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 26, 672-685.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.019>

Lira, F.S., Rosa, J.C., Pimentel, G.D., Tarini, V.A., Arida, R.M., Faloppa, F., Alves, E.S., Do Nascimento, C.O., Oyama, L.M., Seelaender, M., De Mello, M.T., Santos, R.V., 2010. Inflammation and adipose tissue: Effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-109>

Liu, Y., Cheng, A., Li, Y.J., Yang, Y., Kishimoto, Y., Zhang, S., Wang, Y., Wan, R., Raefsky, S.M., Lu, D., Saito, T., Saido, T., Zhu, J., Wu, L.J., Mattson, M.P., 2019. SIRT3 mediates hippocampal synaptic adaptations to intermittent fasting and ameliorates deficits in APP mutant mice. *Nat. Commun.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09897-1>

Liu, Z., Dai, X., Zhang, H., Shi, R., Hui, Y., Jin, X., Zhang, W., Wang, L., Wang, Q., Wang, D., Wang, Jia, Tan, X., Ren, B., Liu, Xiaoning, Zhao, T., Wang, Jiamin, Pan, J., Yuan, T., Chu, C., Lan, L., Yin, F., Cadenas, E., Shi, L., Zhao, S., Liu, Xuebo, 2020. Gut microbiota mediates intermittent-fasting alleviation of diabetes-induced cognitive impairment. *Nat. Commun.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14676-4>

Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>

Ma, T., Jin, H., Kwok, L.Y., Sun, Z., Liong, M.T., Zhang, H., 2021. Probiotic consumption relieved human stress and anxiety symptoms possibly via modulating the neuroactive potential of the gut microbiota. *Neurobiol. Stress* 14, 100294.

<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100294>

Mankhong, S., Kim, S., Moon, S., Lee, K.H., Jeon, H.E., Hwang, B.H., Beak, J.W., Joa, K.L., Kang, J.H., 2020. Effects of aerobic exercise on tau and related proteins in rats with the middle cerebral artery occlusion. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–12.

<https://doi.org/10.3390/ijms21165842>

Martínez-Mota, L., Ulloa, R.E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R., Fernández-Guasti, A., 2011. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiol. Behav.* 104, 900–905.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.027>

Mattson, M.P., Longo, V.D., Harvie, M., 2017. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res. Rev.* 39, 46–58.

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>

Miles, A.A., Misra, S.S., Irwin, J.O., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (Lond)*. 38, 732–749.

<https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>

Moon, H.Y., Kim, S.H., Yang, Y.R., Song, P., Yu, H.S., Park, H.G., Hwang, O., Lee-Kwon, W., Seo, J.K., Hwang, D., Choi, J.H., Bucala, R., Ryu, S.H., Kim, Y.S., Suh, P.G., 2012. Macrophage migration inhibitory factor mediates the antidepressant actions of voluntary exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13094–13099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205535109>

Moraes, 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>

Morgan, J.A., Singhal, G., Corrigan, F., Jaehne, E.J., Jawahar, M.C., Baune, B.T., 2018. The effects of aerobic exercise on depression-like, anxiety-like, and cognition-like behaviours over the healthy adult lifespan of C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 337, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.022>

Moro, T., Tinsley, G., Bianco, A., Marcolin, G., Pacelli, Q.F., Battaglia, G., Palma, A., Gentil, P., Neri, M., Paoli, A., 2016. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *J.*

- Transl. Med. 14, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1044-0>
- Nascimento, A.F., Luvizotto, R.A.M., Leopoldo, A.S., Lima-Leopoldo, A.P., Seiva, F.R., Justulin, L.A., Silva, M.D.P., Okoshi, K., Wang, X.D., Cicogna, A.C., 2011. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 88, 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.015>
- Ochoa-Repáraz, J., Kasper, L.H., 2016. The Second Brain: Is the Gut Microbiota a Link Between Obesity and Central Nervous System Disorders? *Curr. Obes. Rep.* 5, 51–64. <https://doi.org/10.1007/s13679-016-0191-1>
- Otsuka, T., Nishii, A., Amemiya, S., Kubota, N., Nishijima, T., Kita, I., 2016. Effects of acute treadmill running at different intensities on activities of serotonin and corticotropin-releasing factor neurons, and anxiety- and depressive-like behaviors in rats. *Behav. Brain Res.* 298, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.055>
- Park, S., Zhang, T., Wu, X., Qiu, J.Y., 2020. Ketone production by ketogenic diet and by intermittent fasting has different effects on the gut microbiota and disease progression in an Alzheimer ' s disease rat model. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 67, 188–198. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.19>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Petriz, B.A., Castro, A.P., Almeida, J.A., Gomes, C.P.C., Fernandes, G.R., Kruger, R.H., Pereira, R.W., Franco, O.L., 2014. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics* 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-511>
- Pinto, P.R., da Silva, K.S., Iborra, R.T., Okuda, L.S., Gomes-Kjerulf, D., Ferreira, G.S., Machado-Lima, A., Rocco, D.D.F.M., Nakandakare, E.R., Machado, U.F., Correa-Giannella, M.L., Catanozi, S., Passarelli, M., 2018. Exercise training favorably modulates gene and protein expression that regulate arterial cholesterol content in CETP transgenic mice. *Front. Physiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00502>
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.

[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)

Queipo-Ortuño, M.I., Seoane, L.M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J.M., Cardona, F., Casanueva, F., Tinahones, F.J., 2013. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLoS One* 8, e65465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065465>

Ribeiro, F.M., Ribeiro, C.F.A., Cláudia M. G., A., Castro, A.P., Almeida, J.A., Franco, O.L., Petriz, B.A., 2019. Limited effects of low-to-moderate aerobic exercise on the gut microbiota of mice subjected to a high-fat diet. *Nutrients* 11, 149. <https://doi.org/10.3390/nu11010149>

Sadeghi, K., Ahmadi, Seyed Majid, Ahmadi, Seyed Mojtaba, Rezaei, M., Miri, J., Abdi, A., Khamoshi, F., Salehi, M., Jamshidi, K., 2016. A Comparative Study of the Efficacy of Cognitive Group Therapy and Aerobic Exercise in the Treatment of Depression among the Students. *Glob. J. Health Sci.* 8, 54171.

<https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n10p1>

Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okamura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T.T., Hammer, R.E., Kodama, T., Yanagisawa, M., Sakai, J., 2009. Fasting-Induced Hypothermia and Reduced Energy Production in Mice Lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metab.* 9, 191–202.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.008>

Schönfeld, P., Wojtczak, L., 2016. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J. Lipid Res.* 57, 943–954.

<https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>

Sim, H., Lee, T.K., Yoo, Y.H., Ahn, J.H., Kim, D.W., Kim, B., Lee, J.C., Park, J.H., Lim, S.S., Park, J.S., Kang, I.J., Kim, Y.M., Shin, M.C., Cho, J.H., Park, Y., Won, M.H., 2021. Increased calbindin d28k expression via long-term alternate-day fasting does not protect against ischemia-reperfusion injury: A focus on delayed neuronal death, gliosis and immunoglobulin g leakage. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–17.

<https://doi.org/10.3390/ijms22020644>

Slattery, D.A., Cryan, J.F., 2012. Using the rat forced swim test to assess

antidepressant-like activity in rodents. *Nat. Protoc.* 7, 1009–1014.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>

Smyers, M.E., Koch, L.G., Britton, S.L., Wagner, J.G., Novak, C.M., 2021.

Enhanced weight and fat loss from long-term intermittent fasting in obesity-prone, low-fitness rats. *Physiol. Behav.* 230, 113280.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113280>

Souza Cordeiro, L.M., Mario, É.G., Moreira, C.C.L., Rodrigues, A.H., Wanner, S.P., Soares, D.D., Botion, L.M., Ferreira, A.V.M., 2019. Aerobic training induces differential expression of genes involved in lipid metabolism in skeletal muscle and white adipose tissues. *J. Cell. Biochem.* 120, 18883–18893.

<https://doi.org/10.1002/jcb.29208>

Sturman, O., Germain, P.L., Bohacek, J., 2018. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* 21, 443–452.

<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>

Tavares, R.L., Vasconcelos, M.H. de A., Dorand Victor Augusto Mathias, Torres Junior, E.U., Toscano, L.T., de Queiroz, R.T., Alves, A.F., Magnani, M., Guzman-Quevedo, O., Aquino, J. de S., 2021. *Mucuna pruriens* treatment shows anti-obesity and intestinal health effects on obese rats. *Food Funct.*

<https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>

Treit, D., Menard, J., Royan, C., 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 463–469. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90492-C](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90492-C)

Uysal, N., Yuksel, O., Kizildag, S., Yuce, Z., Gumus, H., Karakilic, A., Guvendi, G., Koc, B., Kandis, S., Ates, M., 2018. Regular aerobic exercise correlates with reduced anxiety and increased levels of irisin in brain and white adipose tissue. *Neurosci. Lett.* 676, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.023>

Van Der Merwe, M., Sharma, S., Caldwell, J.L., Smith, N.J., Gomes, C.K., Bloomer, R.J., Buddington, R.K., Pierre, J.F., 2020. Time of feeding alters obesity-associated parameters and gut bacterial communities, but not fungal populations, in C57BL/6 male mice. *Curr. Dev. Nutr.* 4, 1–12.

<https://doi.org/10.1093/cdn/nzz145>

Van Nieuwenhoven, M.A., Brouns, F., Brummer, R.J.M., 2004. Gastrointestinal

- profile of symptomatic athletes at rest and during physical exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 91, 429–434. <https://doi.org/10.1007/s00421-003-1007-z>
- Vitrac, C., Benoit-Marand, M., 2017. Monoaminergic Modulation of Motor Cortex Function. *Front. Neural Circuits* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00072>
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504.
- Wang, H. Bin, Loh, D.H., Whittaker, D.S., Cutler, T., Howland, D., Colwell, C.S., 2018. Time-restricted feeding improves circadian dysfunction as well as motor symptoms in the Q175 mouse model of huntington's disease. *eNeuro* 5, 1–16. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0431-17.2017>
- WHO, 2020. WHO Guidelines on physical activity and sedentary behaviour, World Health Organization.
- Wilson, R.A., Deasy, W., Stathis, C.G., Hayes, A., Cooke, M.B., 2018. Intermittent fasting with or without exercise prevents weight gain and improves lipids in diet-induced obese mice. *Nutrients* 10, 346. <https://doi.org/10.3390/nu10030346>
- Yang, L., Lin, H., Lin, W., Xu, X., 2020. Exercise ameliorates insulin resistance of type 2 diabetes through motivating short-chain fatty acid-mediated skeletal muscle cell autophagy. *Biology (Basel)*. 9, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology9080203>
- Yin, L., Dai, Q., Jiang, P., Zhu, L., Dai, H., Yao, Z., Liu, H., Ma, X., Qu, L., Jiang, J., 2018. Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to promote neuronal death. *Neurotoxicology* 64, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.04.001>
- Zhang, K., Yang, J., Wang, F., Pan, X., Liu, J., Wang, L., Su, G., Ma, J., Dong, Y., Xiong, Z., Wu, C., 2016. Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *J. Ethnopharmacol.* 194, 674–683. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.028>
- Zhang, X., Zou, Q., Zhao, B., Zhang, J., Zhao, W., Li, Y., Liu, R., Liu, X., Liu, Z., 2020. Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. *Redox Biol.* 32, 101535. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101535>
- Zhou, Z.L., Jia, X.B., Sun, M.F., Zhu, Y.L., Qiao, C.M., Zhang, B.P., Zhao, L.P., Yang, Q., Cui, C., Chen, X., Shen, Y.Q., 2019. Neuroprotection of Fasting

Mimicking Diet on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice via Gut Microbiota and Metabolites. *Neurotherapeutics* 16, 741–760. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00719-2>

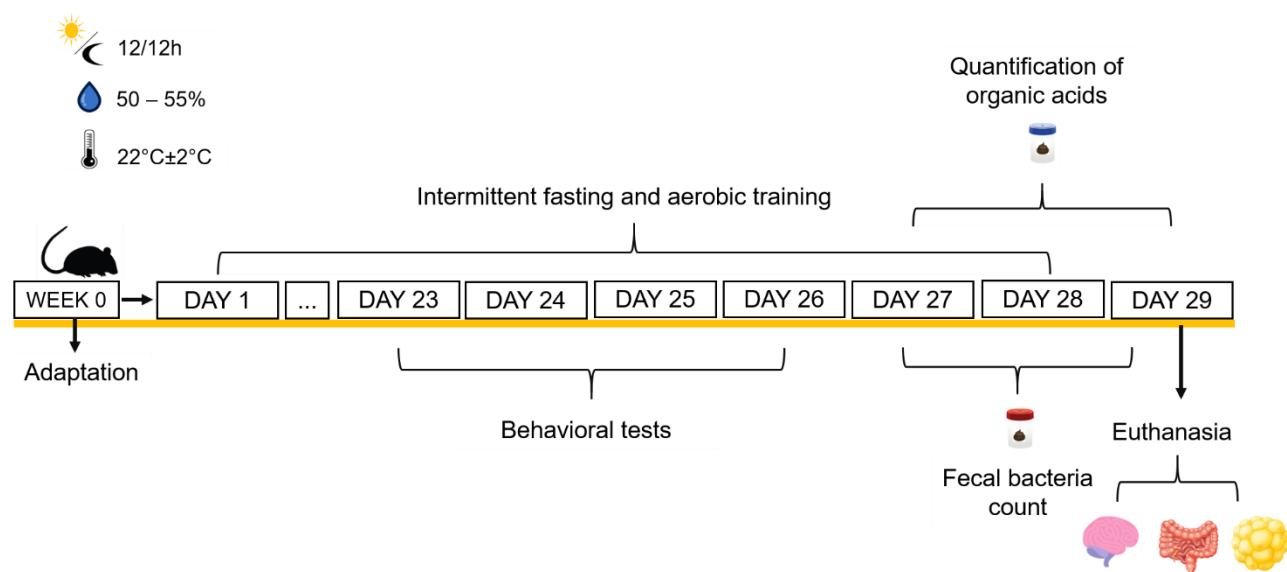
**Table**

**Table 1.** Bacteria count in faeces and quantification of organic acids in gut and faeces of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training.

| Parameters                    | Groups        |                |                |                |
|-------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
|                               | SC            | TC             | SIF            | TIF            |
| <b>Bacteria count (CFU/g)</b> |               |                |                |                |
| <i>Bifidobacterium</i>        | 10.77±0.07    | 10.66±0.05     | 10.91±0.04†    | 10.42±0.02*†§  |
| <i>Lactobacillus</i>          | 10.76±0.15    | 10.67±0.06     | 10.83±0.04     | 9.53±0.24*†§   |
| <i>Streptococcus</i>          | 7.60±0.29     | 7.08±0.21      | 8.85±1.36*†    | 6.99±0.16§     |
| <i>Enterobacteriaceae</i>     | 7.29±0.38     | 6.56±0.10      | 7.20±0.93      | 7.53±1.64      |
| <i>Escherichia coli</i>       | 6.85±0.81     | 6.59±0.53      | 7.07±0.34      | 6.93±0.77      |
| <b>Organic acids (µmol/g)</b> |               |                |                |                |
| Gut                           |               |                |                |                |
| Succinic acid                 | 33.02±01.12   | 3.06±0.86*     | 5.07±1.06*     | 0.38±0.01*†§   |
| Lactic acid                   | 9.20±1.32     | 12.70±4.34     | 0.85±0.01*†    | 12.17±2.17§    |
| Formic acid                   | 291.70±126.30 | 210.90±36.37   | 177.90±14.41   | 381.50±2.17§   |
| Propionic acid                | 210.60±28.57  | 724.80±113.40* | 177.80±37.70†  | 634.80±63.69*§ |
| Faeces                        |               |                |                |                |
| Succinic acid                 | 9.50±6.83     | 1.98±0.39      | 1.99±1.78      | 0.90±0.34      |
| Lactic acid                   | 190.50±26.25  | 195.00±8.14    | 46.91±0.40*†   | 158.50±2.44†§  |
| Formic acid                   | ND            | 12.28±0.01*    | 22.38±3.37*†   | 44.44±2.40*†§  |
| Propionic acid                | 439.20±44.24  | 511.40±13.80*  | 802.80±00.33*† | 573.60±2.67*†§ |
| Acetic acid                   | 39.53±2.56    | 28.98±0.15*    | 13.12±1.31*†   | 15.23±1.23*†   |

SC – sedentary control (n = 10); TC – trained control (n = 10); SIF- sedentary intermittent fasting (n = 10); TIF – trained intermittent fasting (n = 10). \* Significant difference compared to the SC group; † Significant difference compared to the TC group; § Significant difference compared to the SIF group (one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ , Tukey's hoc test).

## Figures



## Graphical abstract

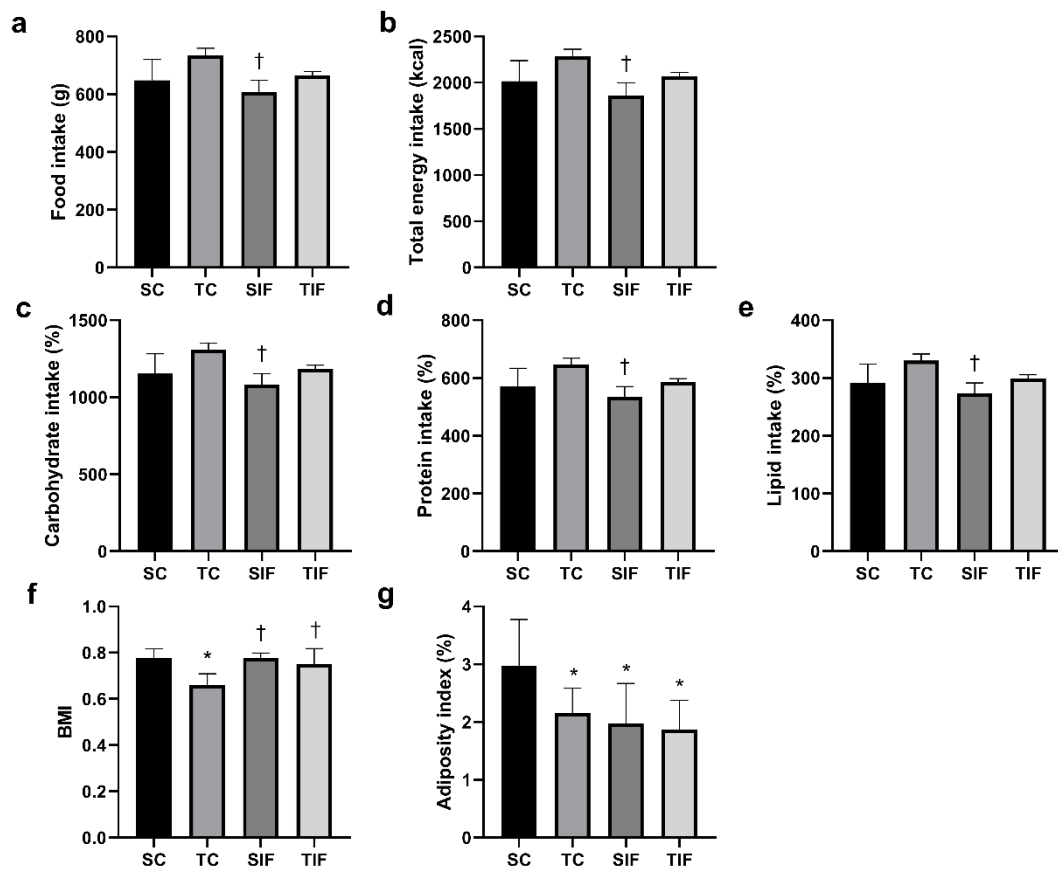


**Fig. S1.** Food intake (a, b, c, d, e) and somatic parameters (f, g) of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. SC – sedentary control (n = 10); TC – trained control (n = 10); SIF- sedentary intermittent fasting (n = 10); TIF – trained intermittent fasting (n = 10). \* Significant difference compared to the SC group; † Significant difference compared to the TC group (one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ , Tukey's hoc test).

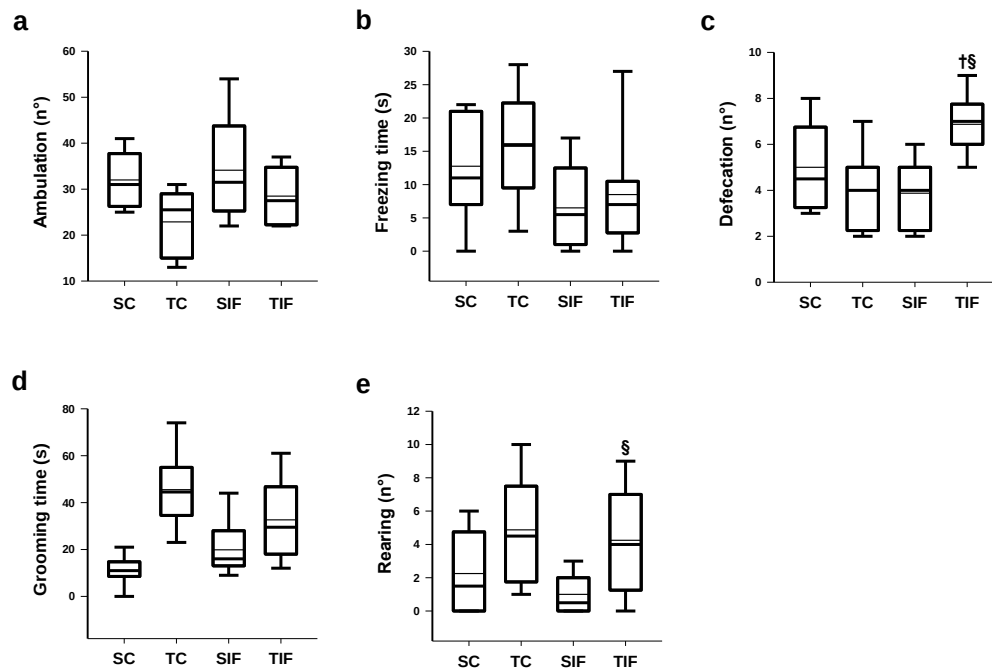


**Fig. 1.** Behavioural parameters evaluated in the open field test of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. SC – sedentary control (n = 10); TC – trained control (n = 10); SIF- sedentary intermittent fasting (n = 10); TIF – trained intermittent fasting (n = 10). † Significant difference compared to the TC group; § Significant difference compared to the SIF group (t test,  $p \leq 0.05$ ).

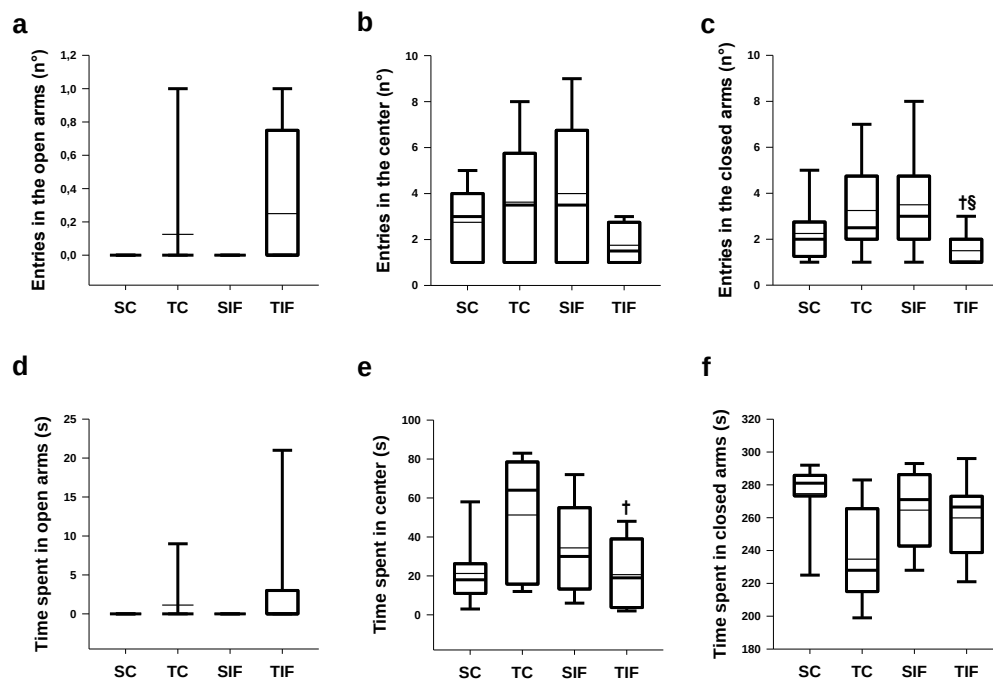


**Fig. 2.** Behavioural parameters evaluated in the elevated plus maze test of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. SC – sedentary control ( $n = 10$ ); TC – trained control ( $n = 10$ ); SIF- sedentary intermittent fasting ( $n = 10$ ); TIF – trained intermittent fasting ( $n = 10$ ). † Significant difference compared to the TC group; § Significant difference compared to the SIF group (t test,  $p \leq 0.05$ ).

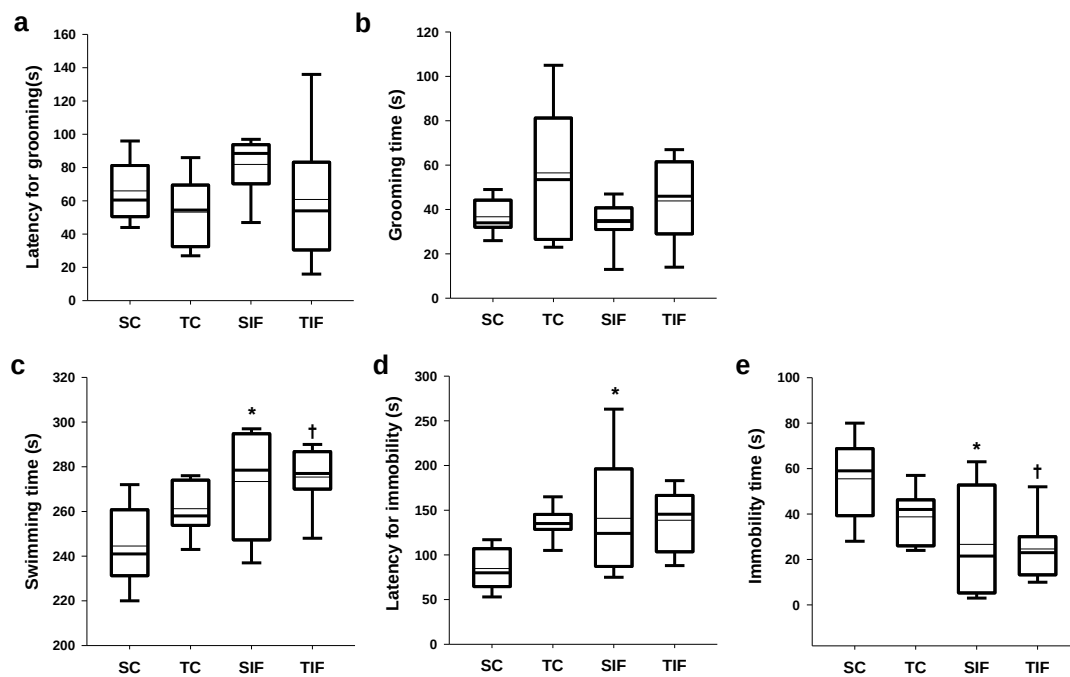


**Fig. 3.** Behavioural parameters evaluated in the splash test (a, b) and forced swimming test (c, d, e) of rats submitted or not to intermittent fasting and aerobic training. SC – sedentary control (n = 10); TC – trained control (n = 10); SIF– sedentary intermittent fasting (n = 10); TIF – trained intermittent fasting (n = 10). \* Significant difference compared to the SC group; † Significant difference compared to the TC group (t test,  $p \leq 0.05$ ).

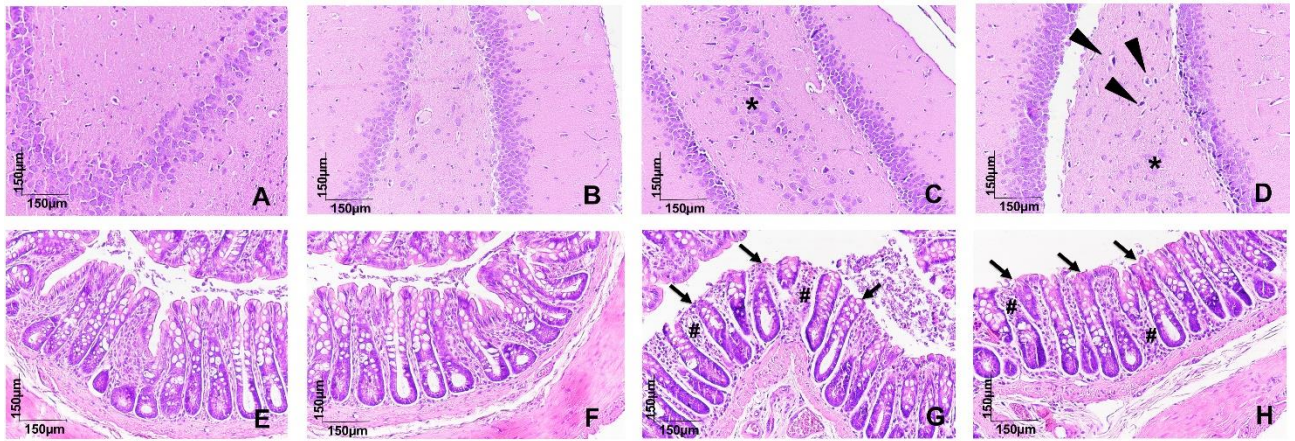


**Fig. 4.** Histological analyses of the brain (A, B, C, D) and gut (E, F, G, H) of sedentary control rats (SC); trained control (TC); sedentary intermittent fasting (SIF) and trained intermittent fasting (TIF). \* Ischemic neurons;  neuronal death; # inflammatory cells;  atrophy.

## ANEXO A – CERTIDÃO DA CEUA



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EIXO INTESTINO-CÉREBRO E DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS SUBMETIDOS AO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO TREINAMENTO AERÓBICO", protocolada sob o CEUA nº 5028031219 (ID 000961), sob a responsabilidade de **Jailane de Souza Aquino e equipe; Naís Lira Soares; Victor Augusto Mathias Dorand** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 03/04/2020.

We certify that the proposal "VALUATION OF THE GUT-BRAIN AXIS AND PHYSICAL PERFORMANCE OF RATS SUBMITTED TO INTERMITTENT FASTING ASSOCIATED WITH AEROBIC TRAINING", utilizing 40 Heterogenics rats (40 males), protocol number CEUA 5028031219 (ID 000961), under the responsibility of **Jailane de Souza Aquino and team; Naís Lira Soares; Victor Augusto Mathias Dorand** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 04/03/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **11/2021** Área: **Nutrição**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **140 a 140 dias**

N: **40**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **370 a 400 g**

Local do experimento: Laboratório de Nutrição Experimental, LANEX (Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde - DN/CCS/UFPB) tem como responsável técnico o veterinário prof. Eulampio José da Silva Neto.

João Pessoa, 03 de abril de 2020

Prof.ª. Dra. Jailane de Souza Aquino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba