



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

André Keng Wei Hsu

**JEJUM INTERMITENTE PRÉ-LAPAROTOMIA EM RATOS
DIABÉTICOS, EFEITOS NA GLICOSE, ACHADOS
LABORATORIAIS E HISTOPATOLÓGICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Norma Sueli Pinheiro Módolo

**Botucatu
2022**

André Keng Wei Hsu

**JEJUM INTERMITENTE PRÉ-LAPAROTOMIA EM RATOS
DIABÉTICOS, EFEITOS NA GLICOSE, ACHADOS LABORATORIAIS
E HISTOPATOLÓGICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Anestesiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Hsu, André Keng Wei.

Jejum intermitente pré-laparotomia em ratos diabéticos, efeitos na glicose, achados laboratoriais e histopatológicos / André Keng Wei Hsu. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Norma Sueli Pinheiro Módolo
Capes: 40102130

1. Jejum. 2. Período perioperatório. 3. Laparotomia.
4. Abdome - Cirurgia. 5. Índice glicêmico.

Palavras-chave: Glicemia; Jejum intermitente;
Perioperatório.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, em especial à minha vó Dona Shu e a minha tia Margarida, que mesmo não estando mais presentes fisicamente entre nós, eram grandes alicerces, incentivadoras e exemplos de caráter.

Aos meus pais Maria e Hsu e meus irmãos pelo incentivo incondicional, amor e pilares da minha formação como ser humano.

Ao Marcelo, pelo companheirismo e incentivo diário.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e todas as oportunidades concedidas.

À minha orientadora Norma Sueli Pinheiro Módolo por ter me acolhido gentilmente com todo o carinho e disposição para me ajudar neste projeto, ensinar lições valiosas e me mostrar o caminho da ciência.

Aos animais que foram utilizados na pesquisa, sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não teria sido possível sem a contribuição de diversas pessoas e Instituições:

Professoras Margarete e Filomena por toda ajuda na coleta e disponibilidade durante todas as etapas de análises laboratoriais. Professora Silvane Roman, colega de faculdade, pela ajuda na histologia.

Aos professores que fizeram parte da minha formação para chegar até aqui, especialmente do Departamento de Anestesiologia da Unesp e Professor Paulo pelas revisões de meus manuscritos.

Tatiane de F. Pineiz Biondo, da Seção Técnica de Pós-graduação, por toda a disposição e ajuda durante toda essa caminhada.

Colegas anesthesiologistas da Clínica de Anestesiologia e Dor de Erechim pelo incentivo e apoio cuidando dos nossos pacientes enquanto eu estava nas aulas da pós-graduação.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Câmpus de Erechim, e aos alunos do Curso de Medicina dessa instituição por fornecer toda a estrutura laboratorial e apoio logístico necessário.

A professora de português, Vania, pela ajuda na revisão linguística.

Ao Hospital de Caridade de Erechim pelo gentil fornecimento de sua estrutura laboratorial.

À Unesp e à Pós-graduação em Anestesiologia pelo acolhimento como aluno.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada da pós-graduação. Obrigado João Paulo, Ana Cláudia Valente, Igor Cuiabano, Emiliana Mello, Caio Klippel, Alex Madeira, Eugênio Pagnussat, Anderson Gonçalves e todos outros colegas.

Hsu AKW. Jejum intermitente pré-laparotomia em ratos diabéticos, efeitos na glicose, achados laboratoriais e histopatológicos. [tese]. Botucatu. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

Introdução e objetivos: o jejum intermitente é uma prática nutricional em que o indivíduo passa por uma grande restrição de ingestão de alimentos por várias horas ao longo do dia. Visa melhorar o desempenho metabólico e a resistência celular ao estresse. Neste estudo, testamos o protocolo de jejum para investigar o efeito glicêmico; alterações histopatológicas hepáticas, renais, intestinais e de cicatrização; estresse oxidativo; inflamação e bioquímicos no período perioperatório de laparotomia em ratos diabéticos.

Métodos: para este estudo foram utilizados ratos machos com diabetes induzida com aloxana. Dois grupos foram definidos de acordo com o protocolo de alimentação: comida livre (FF) e jejum intermitente (IF) em que os ratos comem apenas 8 horas à luz do dia e posterior 16 horas de jejum intermitente. Após 15 dias, ambos os grupos foram anestesiados e uma laparotomia foi realizada. Os níveis de glicose foram avaliados durante o período peri e pós-operatório e foi realizada coleta laboratorial e histologia dos órgãos para verificar lesão renal, intestino, fígado e o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas.

Resultados: como resultado foi possível observar que os níveis glicêmicos melhoraram no grupo de jejum intermitente, principalmente no pós-operatório após laparotomia. Comparando os dois grupos, FF e IF, o dano tubular mostrou interdependência com camundongos com pior nível glicêmico e os parâmetros de cicatrização de feridas mostraram interdependência em ratos com melhor estado glicêmico para neovascularização e presença de glândulas sebáceas e sudoríparas no processo de cicatrização.

Conclusão: a partir destes resultados, demonstra-se que o jejum intermitente antes da cirurgia pode ser uma ferramenta para melhorar os níveis glicêmicos e resultados renais e de cicatrização em ratos diabéticos, com melhora principalmente no período pós-operatório.

Palavras-chave: Jejum Intermitente; Glicemia; Perioperatório.

Hsu AKW. Intermittent fasting before laparotomy surgery: effect on glucose control and histopatologic findings in diabetic mice. [Ph.D. thesis]. Botucatu: Medical School, São Paulo State University; 2022.

ABSTRACT

Background and objectives: intermittent fasting is a nutrition practice where individuals fast several hours in a day, mainly with feeding time during the daylight hours. These seeks to improve metabolic performance and cellular resistance to stress. In this study, we tested the fasting protocol to investigate glycemic effect in laparotomy perioperative period in diabetic rats.

Methods: for this study, rats were diabetic induced with alloxan. Two groups were set according to the feeding protocol: free food (FF) and intermittent fasting (IF) where mice only eat 8 hours in the daylight and fast 16 hours. Both groups were anesthetized, and a laparotomy was done. The glucose level was evaluated during perioperative period, and laboratorial and histological analysis in organs was done in order to look for damage of kidney; bowel; liver and to evaluate surgical wound healing process.

Results: as a result, it was possible to observed that the glycemic level was improved in the intermittent fasting group, especially in post-operative period after laparotomy. Comparing both groups, FF and IF, tubular damage showed interdependency with mice with worse glycemic level and wound healing parameters showed interdependency with rats with better glycemic status for neovascularization and presence of sebaceous and sweat gland in the healing process.

Conclusion: Therefore, we demonstrated that intermittent fasting before surgery can be a tool to improve glycemic levels in diabetic rats, with better results of surgical cicatrization and less renal impairment. These results were important especially in the postoperative period.

Keywords: Intermittent fasting; Glicemic level; Perioperative period.

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais pontos do ACERTO	12
Figura 2 - Gráfico de caixas da glicose (mg/dL) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo de 11 protocolos de jejum pré-laparotomia.....	25
Figura 3 - Gráfico de caixas do peso (g) e da circunferência abdominal (cm) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo do tempo.....	26
Figura 4 - Gráfico de caixas da glicose (mg/dL) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo de 48 horas após laparotomia.	27
Figura 5 - Mapa perceptivo da primeira e segunda dimensão da análise de correspondência múltipla com os achados qualitativos da histopatologia, grupos experimentais e classes de glicose.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvio-padrão de IL 10, NGAL, creatinina, ácido úrico, proteína total, TBARS do plasma, coração, cérebro, rim e fígado da comparação coletados 48 horas após laparotomia de ratos submetidos a jejum intermitente daqueles com alimentação livre.....	29
-----------------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	Associação americana de diabetes
ACERTO	Aceleração da recuperação total pós-operatória
CEUA	Comitê de ética para cuidados e uso de animais experimentais
DM	Diabetes mellitus
ERAS	Enhanced recovery after surgery
FF	Alimentação livre (<i>Free food</i>)
GH	Hormônio do crescimento
IF	Jejum intermitente (<i>Intermittent fasting</i>)
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL10	Interleucina 10
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (<i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>)
OMS	Organização mundial de Saúde
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Protocolos: Eras e Acerto	11
1.2	Diabetes mellitus	13
1.3	Considerações cirúrgicas em pacientes diabéticos	13
1.4	Jejum Intermitente	14
2	Hipótese	16
3	Objetivos	17
3.1	Objetivos secundários	17
4	Métodos	18
4.1	Amostra	18
4.2	Confinamento	18
4.3	Indução do <i>Diabetes Mellitus</i>	18
4.4	O jejum	18
4.5	Pesagem dos animais	19
4.6	Controle glicêmico	19
4.7	Anestesia e Cirurgia	19
4.8	Analgesia pós-operatória	19
4.9	Pós- operatório	20
4.10A	Eutanásia	20
4.11	Coleta e armazenamento das amostras	20
4.12	Parâmetros inflamatórios	20
4.13	Parâmetro oxidativo – TBARS	21
4.14	Parâmetros bioquímicos	21
4.15	Análise histológica	22
4.16	Análise estatística	22
5	Resultados	25
6	Discussão	30
7	Conclusão	33
8	Considerações finais	34
	Referências	35
	Apêndice	41
	Apêndice 1 - Valores de resíduo do teste de qui-quadrado feito por uma tabela de burt e padronizados pela escala z-normal com as variáveis qualitativas do estudo	41
	Apêndice 2 - Fotos histologia – a/b – jejum intermitente, c/d – dieta livre	43
	Anexos	47
	Anexo 1 – Aprovação do Comitê de ética no uso em animais.	47
	Anexo 2 – Publicação	48

1 INTRODUÇÃO

O procedimento cirúrgico é reconhecidamente essencial para o manejo de diversas condições que afetam a saúde [1]. Com o passar dos séculos e avanços da tecnologia na área médica, as cirurgias vêm se tornando cada vez mais específicas e eficazes, abrindo espaço para procedimentos complexos como microcirurgias e cirurgias laparoscópicas [2].

Acompanhando os procedimentos cirúrgicos, os aspectos de cuidados também evoluíram para otimizar a recuperação e evitar efeitos adversos. Tradicionalmente, as recomendações referentes ao período perioperatório de cirurgias eletivas eram determinadas pelos chefes de cada serviço de maneira empírica, sem embasamento científico, e assim repassadas para as novas gerações de cirurgiões médicos. Estudos científicos passaram a confrontar essas práticas tradicionais utilizadas, com o objetivo de evitar danos e trazer benefícios ao paciente. Entretanto, em relação ao período pré-operatório, existem ainda poucos estudos e evidências de qual a melhor dieta o paciente precisa seguir antes de uma cirurgia para otimizar seus resultados pós-operatórios [3]. Sabe-se que pacientes desnutridos possuem piora nos seus desfechos, como aumento de infecção na ferida operatória [4].

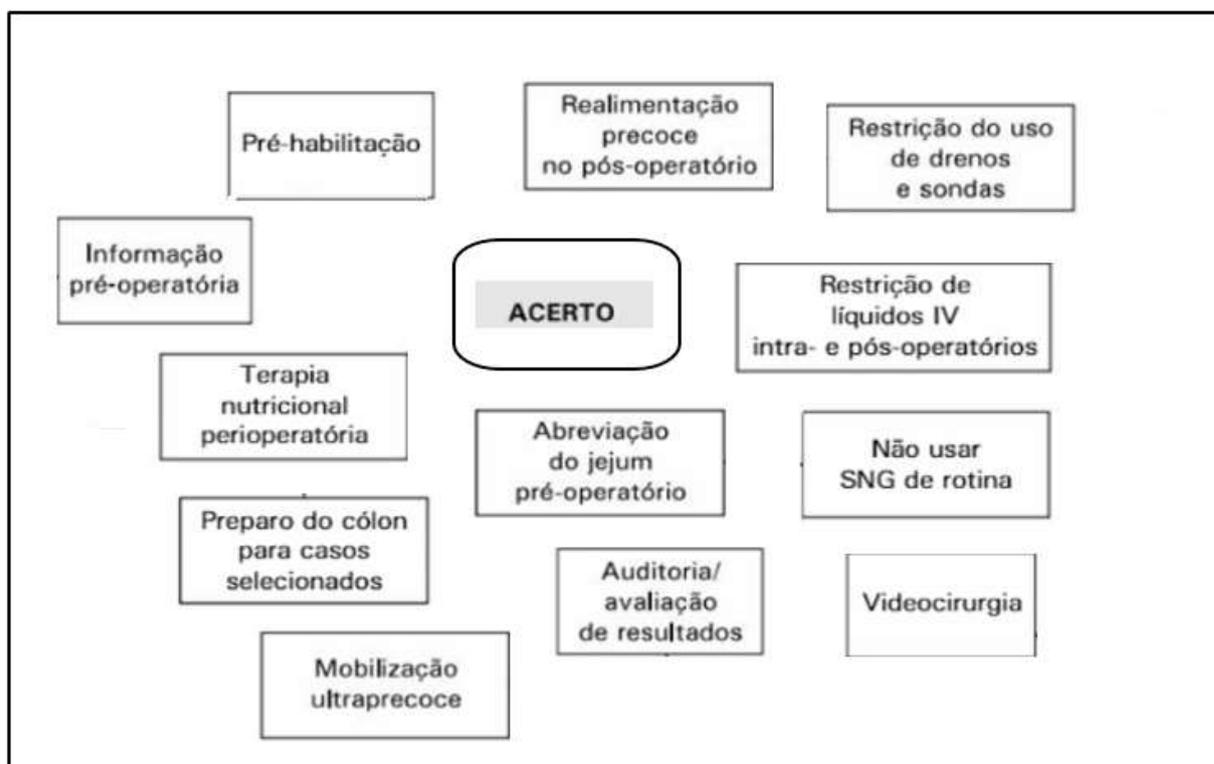
Diversos *guidelines* foram surgindo ao longo dos anos, visando minimizar o trauma cirúrgico, a dor e as complicações pós-operatórias, a fim de diminuir o tempo de internação, tornando a estadia mais curta e reduzindo, conseqüentemente, os custos à saúde [5].

1.1 Protocolos: Eras e Acerto

No início do ano 2000, um grupo de pesquisadores europeus se uniram para formar uma equipe multicêntrica visando criar protocolos baseados em evidências destinados a melhor recuperação do paciente cirúrgico no período perioperatório. Dessa união surgiu o termo **ERAS** que é a sigla de *Enhanced Recovery After Surgery* (Otimização da Recuperação Pós-operatória), um conjunto de medidas de cuidados pré, intra e pós-operatórios realizados por uma equipe multiprofissional, destinado à otimização da recuperação do paciente cirúrgico. Inicialmente o projeto se destinava à cirurgias colorretais, porém, em decorrência dos excelentes resultados encontrados, o projeto foi expandido para outras cirurgias. Hoje, o ERAS se tornou uma sociedade internacional que visa desenvolver o cuidado perioperatório, melhorar a recuperação por meio de pesquisa, educação, auditoria de resultados, sempre com medicina baseada em evidências. Com a introdução dessas medidas, os pacientes se recuperam mais rápido de grandes procedimentos, com redução do tempo de internação em mais de 30% e, principalmente, diminuição do número de complicações, principalmente as não cardíacas, em aproximadamente 40% [6, 7, 8, 9, 10].

Baseado no protocolo europeu ERAS surgiu no Brasil em 2005 o projeto **ACERTO** (Aceleração da Recuperação Total Pós-operatória). O protocolo brasileiro aborda temas como a prevenção de náuseas e vômitos pós-operatórios, a redução de uso de opióides no pós-operatório, o uso racional de antibióticos, a diminuição do jejum pré-operatório no dia da cirurgia e realimentação no pós-operatório [4].

Figura 1 - Principais pontos: adaptado do ACERTO [11]



Os anestesiológicos foram pioneiros nessa revolução no campo cirúrgico, criando e estudando diversas táticas para a melhor recuperação do paciente. Cabe a eles importante papel nas medidas do protocolo, divididas entre cuidados pré, intra e pós-operatórios [12, 13]. Entre as pré-operatórias incluem-se, além da orientação acerca do protocolo, a ausência de medicação pré-anestésica, o jejum não prolongado e o não preparo do cólon em cirurgia colo-retal. No período intraoperatório o uso de agentes anestésicos de ação curta e a ausência de drenos na maior parte dos procedimentos são algumas das recomendações mais comuns. Finalmente, no pós-operatório, a remoção precoce de cateteres, a não utilização de cateter nasogástrico, a mobilização precoce e a introdução, também precoce, da dieta oral, fazem parte do protocolo [9]. Além, disso podemos também citar como exemplos desses cuidados o tempo de jejum, a hidratação durante o procedimento cirúrgico, a realização de bloqueios otimizando o menor uso de opióides, instalação de bombas de analgesia e controle da dor pós-operatória [12,13].

No campo do preparo pré-operatório, um tema importante é a diminuição do jejum no dia da cirurgia. Foi provado que o menor tempo de jejum no dia da cirurgia, utilizando preparados de carboidratos de fácil absorção, diminui a sede dos pacientes e aumenta a satisfação em relação ao tempo de espera para o procedimento [14, 15]. O protocolo Europeu ERAS recomenda a redução na privação alimentar pré-operatória, indicando jejum de 2 horas para líquidos claros e de 8 horas para sólidos, com o fornecimento de fluidos e bebidas contendo carboidrato. No Brasil, o programa ACERTO recomenda a administração de uma solução de carboidrato (maltodextrina) a 12,5%, fornecida 6 horas e 2 horas antes do procedimento cirúrgico [16].

Contudo, ainda não existem protocolos padrões para alimentação nos dias anteriores a cirurgia, não se sabe se o tipo de dieta precedente a uma cirurgia influencia o resultado e a melhor recuperação do paciente. Apenas existe evidência no grupo de pacientes desnutridos e

com baixa albumina. Neles, sabe-se que otimizar nutricionalmente o estado proteico pré-operatório evita complicações e aumento de mortalidade [17].

Além disso, a terapia nutricional pré-operatória tem ganhado maior importância e reconhecimento como componente de cuidados cirúrgicos, e a pré habilitação nutricional tem se mostrado importante ferramenta nas medidas otimizando a recuperação [18].

1.2 *Diabetes Mellitus*

O *diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas que compartilham a elevação dos níveis de glicose no sangue como sintoma principal. A doença decorre da produção inadequada de insulina pelo pâncreas ou resposta inadequada das células do organismo à insulina produzida. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de diabéticos subiu de 108 milhões de pessoas em 1980 para 422 milhões em 2014. Ela é a maior causa de cegueira no mundo, falência renal, infartos, acidentes vasculares cerebrais e amputação de membros [19]. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 8,9% da população é portadora da doença e o crescimento foi de 61,8% nos últimos 10 anos [20]. Em 2015, no Brasil, o número de pessoas com diabetes, na faixa etária de 20 a 79 anos, era de cerca de 14,3 milhões de casos, com projeção de 23,3 milhões de diabéticos em 2040 [21].

Quando nos alimentamos, o corpo começa com a digestão e transformação dos alimentos em glicose, proteínas e gorduras. A glicose é o grande combustível para geração de energia no organismo, mas para que esse possa ser utilizado é preciso ser transportado na corrente sanguínea e, depois, que entre no interior das células. Neste momento, entra em ação a insulina, que abre canais para entrada ou absorção da glicose nas células. Na doença, o pâncreas começa a diminuir a produção de insulina ou as células do corpo iniciam com resistência para o efeito do hormônio. Como resultado, os níveis sanguíneos de glicose começam aumentar silenciosamente. A hiperglicemia prolongada leva à glicosilação proteica, que causará inflamação crônica, lesões macro e microvasculares, levando a doença coronariana, hipertensão, acidente vascular cerebral, nefropatia e neuropatias [22].

São sintomas do diabetes e que auxiliam no diagnóstico: sede constante, cansaço sem razão, vontade frequente de urinar, principalmente durante a noite, feridas que demoram ou não cicatrizam, perda de peso, visão turva, dormência e/ou formigamento nos pés e nas mãos e infecções constantes [23].

O diagnóstico se baseia nos critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA), que também guiam a Sociedade Brasileira. Um dos critérios mais importantes é a glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL ou maior ou igual a 200mg/dL, resultado da glicemia de 2 horas após receber 75 g de glicose (teste de tolerância oral à glicose). A glicemia acima de 200 mg/dL associada aos sintomas também é considerada critério. É necessária a confirmação com a repetição dos exames. A hemoglobina glicada, teste laboratorial que reflete a glicose média dos últimos 3 meses, também é utilizada como critério quando os resultados são maiores ou igual a 6,5% [24].

1.3 *Considerações cirúrgicas em pacientes diabéticos*

Pessoas com diabetes têm maior probabilidade de necessitarem de procedimento cirúrgico do que pessoas sem diabetes [25]. Estima-se que 25% dos pacientes diabéticos necessitarão de algum procedimento cirúrgico ao longo da vida [26].

A presença de diabetes ou hiperglicemia em pacientes cirúrgicos podem aumentar a morbidade e mortalidade perioperatória em até 50% [27]. Estas altas taxas podem ser consequência de diversos fatores que incluem: falha na identificação de pacientes com diabetes ou hiperglicemia; múltiplas comorbidades, incluindo complicações microvasculares e

macrovasculares; uso de medicações complexas e erros de prescrição de insulina; aumento das infecções peri-operatórias e pós-operatórias; hipoglicemia e hiperglicemia associadas; ausência ou inadequada diretriz institucional para o manejo de diabetes ou hiperglicemia em pacientes internados e conhecimento inadequado sobre controle de diabetes e hiperglicemia entre a equipe que presta cuidados [27]. Moningi *et al.* mencionam que a neuropatia autonômica causada pela doença pode ser um desafio para o período perioperatório e está relacionada ao aumento da morbimortalidade [26]. O controle glicêmico inadequado é fator de risco para sepse pós-operatória, aumento da inflamação e disfunção endotelial, isquemia cerebral e dificuldade na cicatrização de feridas [26].

A cirurgia predispõe o indivíduo diabético a diversas perturbações do metabolismo, levando a uma resposta neuroendócrina. O trauma cirúrgico aumenta a produção de hormônios do estresse, como as catecolaminas e o cortisol, que são hormônios que diminuem a sensibilidade insulínica das células. Em adição, ocorre a liberação de interleucinas e fator de necrose tumoral, substâncias que aumentam o estado inflamatório do paciente. Além disso, esse trauma diminui a secreção pancreática de insulina e faz aumentar a liberação dos hormônios contrareguladores a ela; como glucagon e hormônio do crescimento (GH). Devido a toda essa resposta ao estresse, é gerado um desbalanço hormonal, com diminuição da secreção e ação da insulina, levando o paciente a um estado catabólico importante, com hiperglicemia e cetose pós-operatória [26].

Além disso, medicamentos, anestésicos e sedativos utilizados no processo anestésico também podem influenciar no nível de glicemia dos pacientes e até mesmo mascarar sinais e sintomas comuns de hipoglicemia. Alguns agentes anestésicos podem reduzir a secreção de hormônios catabólicos ou alterar a secreção de insulina em pacientes diabéticos com secreção residual de insulina [28]. O etomidato, por exemplo, usado para indução de anestesia geral com ação hipnótica, inibe a síntese adrenal de esteroides e desencadeia uma redução na resposta hiperglicêmica à cirurgia [29].

Por fim, é importante ressaltar que os cuidados perioperatórios do paciente diabético são um desafio à equipe assistente e a otimização dos níveis glicêmicos pré-operatórios em cirurgias eletivas é de extrema importância a fim de evitar resultados adversos [30].

1.4 Jejum intermitente

Em 2016, o prêmio Nobel de medicina foi para o cientista Yoshinori Ohsumi que realizou estudo que relaciona o jejum com a autofagia celular e o aumento da expectativa de vida. Sua pesquisa apontou que a privação de alimentos de forma controlada pode ativar mecanismos de autodefesa das células que garantem a elas maior longevidade [31].

Se olharmos nosso passado e mesmo para os animais selvagens é possível verificar que os padrões de alimentação de muitos mamíferos são caracterizados por períodos prolongados de jejum, diferente do que vemos hoje com os hábitos do homem moderno e até com animais domesticados. Os carnívoros podem matar e comer suas presas apenas algumas vezes por semana ou ainda menos frequentemente, e os primatas caçadores-coletores, incluindo aqueles que vivem hoje, muitas vezes comem de forma intermitente dependendo da disponibilidade de comida. A capacidade de funcionar em alto nível, tanto fisicamente quanto mentalmente, durante períodos sem alimentação pode ter sido de importância fundamental em nossa evolução. Muitas adaptações para períodos de escassez são conservados entre mamíferos, incluindo órgãos para a absorção e armazenamento de glicose rapidamente mobilizável (reservas de glicogênio hepático) e de longa duração substratos de energia, como ácidos graxos em tecido adiposo [32].

Estas adaptações parecem ocorrer não apenas no aspecto metabólico, mas, também, cognitivo. Como citado por Longo *et al*, em mamíferos, a restrição calórica grave resulta em atrofia da maioria dos órgãos, exceto do cérebro, sugerindo que a manutenção da função cognitiva seja determinante para sobrevivência, mesmo sob condição de escassez alimentar [33]. Em teoria, esta melhora cognitiva aumentaria as chances de o animal/indivíduo criar maneiras de encontrar alimento. Em um estudo publicado por Lee *et al*, com 56 ratos adultos, onde um grupo foi submetido a alimentação livre e outro com alimentação controlada em dias alternados, foi visto que o jejum pode aumentar a função cerebral, indicada pela melhora no desempenho de testes comportamentais de função sensorial e motora, além de aprendizado e memória [34].

O desenvolvimento e evolução da agricultura e técnica de conservação de alimentos possibilitaram um cenário em que temos mais comida à nossa disposição e assim as refeições ao longo do dia se tornaram um hábito. O consumo diário de refeições de alta densidade energética, associado ao estilo de vida sedentário, contribui de maneira plausível para o surgimento da obesidade e doenças relacionadas, como as principais causas de morbidade e mortalidade [35].

Assim, o jejum intermitente como prática nutricional vem ganhando vários adeptos e tem sido comprovadas evidências científicas com bons resultados. Nele restringe-se às horas do dia de alimentação, intercalando alguns períodos de jejum na semana. Inicialmente, foi percebido seus resultados em populações que o realizavam a partir de práticas religiosas como o Ramadã. Após foi extrapolado em diversos protocolos como estratégia pensada para a perda de peso. Diversos estudos têm mostrado benefícios além controle peso corporal como a diminuição da resistência à insulina, inflamação, redução dos níveis pressóricos e do estresse oxidativo. [36, 37, 38].

Acredita-se que o jejum intermitente age principalmente de duas formas. A primeira é relacionada ao ritmo circadiano. O ritmo circadiano é o relógio orgânico num período de 24 horas (ou um dia) no qual se baseia o ciclo biológico de quase todos seres vivos. O ciclo regula todos os ritmos fisiológicos (como secreção de hormônios) bem como muitos dos ritmos psicológicos do organismo.

A principal hipótese do mecanismo de ação do jejum intermitente é o retorno do organismo a sua programação ancestral. Nos períodos de luz ocorre alimentação e maior atividade e no período noturno, onde os animais ficam de jejum, ocorre o descanso, o sono e a reparação celular e tecidual. Esse tempo de jejum otimiza a secreção hormonal programada pelo organismo [39].

A segunda forma de ação do jejum intermitente é por meio da seleção da microbiota intestinal. Quando ocorre privação de energia, acredita-se que o jejum seleciona bactérias menos inflamatórias e danosas para o organismo. Essas bactérias, mais adaptadas à privação de energia, causam menos alterações na permeabilidade intestinal e menor translocação das mesmas, diminuindo a inflamação sistêmica do organismo.

Além dos efeitos relacionados acima, o jejum intermitente já foi correlacionado com proteção contra desenvolvimento de doenças metabólicas e do câncer. Em estudo publicado no periódico DIABETES, em abril de 2018, foi provado que o jejum intermitente diminuiu retinopatia em ratos e prolongou a sobrevivência dos mesmos, apesar de não haver diminuição da hemoglobina glicada [37, 40].

Por fim, o jejum intermitente também está correlacionado com maior regeneração celular, diminuição da inflamação e aumento da resistência corporal ao estresse oxidativo, fatores sempre implicados no processo de trauma cirúrgico e recuperação pós-operatória [41, 42, 43].

Visto isso, se faz necessário buscar mais informações sobre os efeitos do jejum intermitente no momento pré-cirúrgico e benefícios para o momento pós-cirúrgico.

2 HIPÓTESE

A hipótese principal da pesquisa é que o jejum intermitente modifica e diminui a glicemia de jejum frente a um trauma cirúrgico em ratos diabéticos.

3 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é avaliar se a prática de jejum intermitente, dias antes da cirurgia, modifica e melhora os resultados glicêmicos em procedimento de laparotomia em ratos diabéticos.

3.1 Objetivos secundários

- a) Avaliar a perda ponderal;
- b) Avaliar marcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativos pós-operatórios;
- c) Avaliar a cicatrização pós-operatória e a lesão de órgãos por histologia.

4 MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com o guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) [44] e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai (URI) Câmpus de Erechim (**Anexo 1**).

4.1 Amostra

O tamanho da amostra foi estimado considerando 80% de poder e 5% de significância para teste de hipótese bicaudal para duas amostras ('power.t.test{stats}'). Para tanto, foi selecionada a diferença das médias da glicose 48 horas após a laparotomia entre os grupos experimentais (118 mg/dL), bem como o desvio-padrão comum de ambos os grupos em 48 horas pós-laparotomia (70 mg/dL) para a estimativa. Dado os limites supracitados, estimou-se 7 animais para cada grupo.

4.2 Confinamento

Os ratos (40 da raça Wistar) utilizados foram confinados no biotério da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai - Câmpus Erechim (URI ERECHIM) em gaiolas com 4 indivíduos em cada. O ambiente era livre de patógenos e em condições de temperatura controlada de 20 °C – 24 °C. O ciclo de luz foi fixado em 12 horas, sendo 12 horas com luz e 12 horas no escuro, iniciando às 8 horas. Todos os ratos receberam água *ad libitum* e alimentação padrão conforme protocolo de jejum.

4.3 Indução do *Diabetes Mellitus*

A indução da *Diabetes Mellitus* foi realizada com a administração de Aloxano [45] (em solução de citrato de sódio 100 mM, pH 4,5) na dose de 150 mg/kg, após um período de jejum de 12 horas, via intraperitoneal, dose única. Após 6 horas da indução, foi fornecida glicose 10% como única fonte hídrica, durante 24 horas para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina pelas células beta remanescentes das Ilhotas de Langerhans. Após 7 dias, 13 ratos que tinham a glicemia ≥ 200 mg/dL e foram selecionados para seguir com o experimento.

4.4 O jejum

Os ratos foram randomizados em dois grupos: um submetido a um jejum intermitente (IF – *Intermittent fasting*) e outro submetido a uma alimentação livre (*ad libitum*) (FF – *free food*). A randomização foi realizada por programa específico e distribuída em envelopes opacos e selados. Apenas os tratadores tinham a informação a qual grupo o animal pertencia.

O primeiro grupo foi submetido a um jejum intermitente num protocolo de 16 horas de jejum e 8 horas de alimentação liberada. Todo o montante de alimentação foi colocado no início do ciclo de luz às 8 horas para mimetizar a ingestão de alimentos à luz do dia e retirada às 16h. O esquema de alimentação foi intercalado em 2 dias de jejum e 1 dia de alimentação livre, neste momento foi utilizado o mesmo padrão de alimentação do grupo FF.

No segundo grupo (FF), os ratos receberam alimentação duas vezes por dia, às 8h e às 20h.

Em ambos os grupos a quantidade de calorias e nutrientes diários foi a mesma (ração balanceada para ratos - ração comercial padrão). A água esteve sempre disponível 24 horas

para ambos os grupos. A quantidade de ração foi de 20 g/dia proporcionada de acordo com alimentação do dia: 10g para cada horário para o grupo não jejum às 8h e às 20h e 20 gramas em uma porção única no grupo jejum às 8h. Caso os ratos não consumissem toda a ração após às 18h ela era retirada para cumprir 8 horas de intervalo de alimentação no grupo jejum.

Os ratos realizaram essa dieta por 15 dias antes da cirurgia de laparotomia. Durante período entre a indução e confirmação da diabetes e início do protocolo jejum os ratos receberam alimentação *ad libidum*.

4.5 Pesagem dos animais

Os animais de cada grupo foram pesados em balança digital, antes dos procedimentos. Durante o tratamento a pesagem foi realizada uma vez por semana no decorrer dos 15 dias de tratamento de alimentação.

4.6 Controle glicêmico

Todos os ratos foram submetidos a exame de controle glicêmico com glicosímetro One Touch Ultra Mini diariamente antes da alimentação das 8h da manhã. O exame foi realizado pelos tratadores todos os dias após os ciclos de jejum com a finalidade de diagnosticar episódios de hipoglicemia, imediatamente após a cirurgia e a cada 6 horas no pós-operatório até a eutanásia.

4.7 Anestesia e cirurgia

O procedimento foi realizado em sala cirúrgica acompanhado por médico especialista veterinário. A sala foi aclimatizada para evitar hipotermia, bem como durante a recuperação anestésica.

Todos os ratos foram anestesiados com cetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg administradas intraperitoneal em quadrante abdominal inferior direito. Utilizou-se dipirona 150 mg/kg e morfina 2 mg/kg pela via subcutânea para promover analgesia. Antes da incisão cirúrgica, infiltrou-se o abdômen do animal com lidocaína 0,5% na dose de 2 mg/kg para associação analgésica. Foi colocada pomada protetora nos olhos para evitar lesão de córnea.

Sob condições assépticas, foi realizada a incisão de laparotomia de aproximadamente 3 cm e posterior sutura da incisão com pontos contínuos de polipropileno 2.0 e nylon 3.0 para a pele. Após a cirurgia ambos os grupos retornaram para o protocolo de dieta livre.

4.8 Analgesia pós-operatória

Todos os ratos receberam analgesia com dipirona 150 mg/kg e morfina 2 mg/kg por via subcutânea de 4/4h nas primeiras 72h pós cirurgia. Para os ratos que apresentaram sinais de dor foi utilizado resgate de morfina de 1mg/kg a cada 2h.

4.9 Pós-operatório

No pós-operatório todos os ratos retornaram para dieta livre conforme o grupo não jejum. Foi realizado controle glicêmico 6/6h.

4.10 A Eutanásia

Após 48h de pós-operatório os ratos foram eutanasiados. Foi utilizada dose letal de Tiopental (150 mg/kg) e Lidocaína (10 mg/mL) por via intraperitoneal. Foi coletado sangue do coração do rato por punção cardíaca para dosagem de testes de estresse oxidativo e bioquímicos. Também foi realizada retirada da cicatriz abdominal para estudo da cicatrização e quantidade colágeno [48, 49].

Fragmentos do rim, fígado, intestino duodenal e ferimento cirúrgico foram coletados para avaliação histológica.

4.11 Coleta e armazenamento das amostras

Após a eutanásia foram realizadas coletas de sangue diretamente do coração do rato. As amostras de plasma com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram encaminhadas ao laboratório para centrifugação à 3500 rpm por 15 minutos, sendo as mesmas aliqüotadas em criotubo e armazenadas em ultrafreezer Indrel IULT 335D-486 a -80 °C para posterior realização das análises laboratoriais. Desse sangue foi realizado controle glicêmico e dosados marcadores inflamatórios: interleucinas 4 (IL4), 6 (IL6), 10 (IL10) e TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa).

Foram retiradas amostras de cérebro, coração, fígado e rim e armazenadas em solução salina a -80 °C. As amostras de tecidos foram homogeneizadas por 5 minutos, centrifugadas à 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado na realização da análise de peroxidação lipídica, para avaliação de estresse oxidativo.

4.12 Parâmetros inflamatórios

Avaliou-se o perfil inflamatório dos ratos em estudo a partir da amostra de plasma, pela dosagem de interleucinas pró e anti-inflamatórias, sendo analisados a IL-10 como marcador anti-inflamatório, a IL-4, IL-6 e TNF- α como marcadores pró-inflamatórios e o NGAL como marcador de dano renal. Os kits utilizados para as dosagens foram:

- Rat IL-4 Elabscience, código E-EL-R0014,
- Rat IL-6 Elabscience, código E-EL-R0015,
- Rat IL-10 Cloud-Clone, código SEA056Ra
- Rat TNF- α Elabscience, código E-EL-R0019,
- Rat NGAL Elabscience, código E-EL-R0662.

Para realização dos ensaios procedeu-se a preparação dos reagentes conforme orientação do fabricante. Para realização da curva padrão procedeu-se a adição de 1,0 mL de diluente ao tubo contendo a concentração padrão, a partir da qual realizou-se sete diluições seriadas para obtenção de diferentes concentrações (concentrações de cada curva descritas abaixo), os resultados obtidos na curva padrão foram plotados em gráfico para obtenção da equação dos gráficos e realização dos cálculos das amostras.

- IL-4: 0; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 pg/mL;
- IL-6: 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 pg/mL;
- IL-10: 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 pg/mL;
- TNF- α : 0; 78,13; 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500 e 5000 pg/mL;
- NGAL: 0; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 e 4000 pg/mL.

Após a diluição das concentrações padrões para curva iniciou-se o ensaio no qual pipetou-se 100 μ L do padrão ou amostra em seu respectivo poço na placa de ensaio e incubou-se por 90 minutos a 37 °C. As amostras foram analisadas em duplicata para garantir a confiabilidade do ensaio. Sequencialmente pipetaram-se os reagentes indicados pelo fabricante, incluindo anticorpo secundário e substrato/enzima, alternando procedimentos de incubação a 37 °C e de lavagem, ao final pipetou-se 100 μ L de solução de parada e procedeu-se a leitura a 450 nm, em espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos da América – EUA).

4.13 Parâmetro oxidativo – TBARS

A avaliação do parâmetro oxidativo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) constitui um marcador pró-oxidante de grande relevância biológica. Procedeu-se a análise em quadriplicata pelo protocolo de Jentzsch *et al.* [46]. Essa técnica tem como objetivo medir a formação de malondialdeído (MDA), que compreende uma substância formada pela reação das espécies reativas com os lipídios de membrana, reação esta denominada lipoperoxidação (LPO). A LPO promove alterações na membrana que comprometem a permeabilidade e a matriz extracelular, e ocasiona perda de seletividade. Para medição do MDA liberado pela LPO, as amostras foram aquecidas na presença de ácido tiobarbitúrico, formando um composto de coloração rosa, o protocolo experimental foi executado nas amostras de plasma e tecido (cérebro, coração, fígado e rim) e após um período de incubação a 90 °C por 60 minutos o composto formado foi medido espectrofotometricamente a 532 nm, os resultados obtidos foram expressos em nmol MDA/mL [46, 47].

4.14 Parâmetros bioquímicos

Tendo como objetivo a correlação de variáveis e definição de características bioquímicas, realizou-se um conjunto de parâmetros bioquímicos complementares a partir da avaliação da amostra plasma, que incluíram: proteínas totais, creatinina e ácido úrico. Para estas dosagens foi empregado o procedimento analítico padronizado no laboratório em conformidade ao protocolo definido pelo fabricante dos kits comerciais utilizados (Gold Analisa Diagnóstica Ltda – Belo Horizonte, MG, Brasil), procedendo as leituras em espectrofotômetro UV/VIS 5300PC (Shanghai Metash Instruments Co. – China).

Proteínas totais

A determinação das proteínas totais fundamentou-se no método colorimétrico-Biureto pela na reação das ligações peptídicas das proteínas com íons cúprico em meio alcalino (reagente de Biureto), formando um complexo de coloração violeta, para tal pipetou-se 20 µL de amostra ou padrão e 1000 µL de reagente de Biureto e incubou-se a 37 °C por 10 minutos, ao final procedeu-se a medição da absorbância a 545 nm. A quantidade de proteínas totais foi diretamente proporcional a absorbância, sendo os resultados expressos em g/dL.

Creatinina

A creatinina corresponde a um importante marcador renal, sua análise fundamenta-se no método cinético-colorimétrico promovendo a reação desse metabólito com o reagente picrato em meio alcalino, formando um complexo colorido, laboratorialmente mede-se a velocidade de formação desse complexo. Para o procedimento laboratorial pipetou-se 100 µL da amostra ou padrão e 1000 µL do reagente de trabalho (ácido pícrico e tampão) em cubeta termostatizada a 37 °C e procedeu-se as leituras após 30 e 90 s a 510 nm, os resultados foram calculados e expressos em mg/dL.

Ácido úrico

A determinação do marcador ácido úrico fundamentou-se no método enzimático-colorimétrico avaliando a oxidação desse componente pela enzima uricase em alantoína, CO₂ e H₂O₂. Sequencialmente na reação têm-se a copulação oxidativa, catalisada pela peroxidase (POD), onde o H₂O₂ reage com o diclorofenolsulfonato (DCFS) e com a 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo um composto denominado antipirilquinonimina de cor vermelha, o qual é medido no espectrofotômetro a 505. Para o procedimento laboratorial pipetou-se 20 µL da amostra ou padrão e 1000 µL do reagente de trabalho e incubou-se a 37 °C por 10 minutos, os resultados foram calculados e expressos em mg/dL.

4.15 Análise histológica

Para análise histológica o material foi preservado, fixado em parafina e os slides corados com hematoxilina e eosina. Os graus de lesão das amostras foram classificados qualitativamente por histologista em ausente, suave, moderada e severa (0, 1, 2, 3). A avaliação do rim envolveu o grau de dano glomerular e tubular; para a avaliação do fígado, a presença de esteatose e necrose. Para o segmento duodenal foi avaliado a destruição das vilosidades e a presença de células inflamatórias. Por fim, na ferida operatória verificou-se a presença de células inflamatórias, reepitelização da pele, fibroplasia, colagenização, vasodilatação, neovascularização e presença de glândulas sebáceas e sudoríparas no processo de cicatrização.

4.16 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas por cientista de dados no software R com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (versão 4.1.0 (2020-06-22), RStudio, Inc.). As funções e os pacotes utilizados foram apresentados no formato ‘função{pacote}’. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo considerados estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese nula foi menor que 5% ($p < 0,05$).

O tamanho da amostra foi estimado considerando 80% de poder e 5% de significância aplicando teste de hipótese bicaudal para duas amostras ('power.t.test{stats}'). Para tanto, foi selecionada a diferença das médias da glicose 48h após a laparotomia entre os grupos experimentais (118,5 mg/dL), bem como o desvio-padrão comum de ambos os grupos em 48h pós-laparotomia (70,30693 mg/dL) para a estimativa. Dado os limites supracitados, estimou-se 7 animais para cada grupo.

Para investigar as mudanças no nível de glicose intergrupo (IF vs FF) em cada momento de avaliação e intragrupo ao longo dos protocolos de jejum pré-laparotomia (1° vs 2° vs 3° vs 4° vs 5° vs 6° vs 7° vs 8° vs 9° vs 10° vs 11° protocolo de jejum) e avaliações pós-laparotomia (0 vs 6 vs 12 vs 18 vs 24 vs 30 vs 36 vs 42 vs 48h após a laparotomia) foram conduzidos modelos lineares mistos ('lmer{lme4}'). Ademais, as mudanças intragrupo do peso (início vs após uma semana vs final dos protocolos de jejum) e da circunferência abdominal dos ratos ao longo do tempo (início vs final dos protocolos de jejum), bem como as comparações intergrupo (IF vs FF) também foram conduzidas por modelos lineares mistos. O erro residual de todos os modelos lineares mistos ('residuals{stats}') mostraram distribuição assumida como gaussiana por gráficos quantil-quantil ('qqnorm{stats}') e pelo teste de Shapiro-Wilk ('shapiro.test{stats}'), sendo que para as avaliações pré-laparotomia de glicose e circunferência abdominal foi usada a transformação de Box-Cox (lambda de 1,82954 e -5,977124 respectivamente) ('powerTransform{car}'). Os modelos lineares mistos ajustados incluíram a interação entre grupos e momentos como efeito fixo e os ratos como efeito individual aleatório. Comparações múltiplas foram performadas no pós-teste com a correção do procedimento de Bonferroni, assumindo significância de 5% ('lsmeans{lsmeans}' e 'cld{multcomp}'). Gráficos de caixas ('ggplot{ggplot2}') foram construídos para apresentar os resultados desta comparação.

Para identificar as interdependências entre os dois grupos, os intervalos de glicose e os achados histopatológicos qualitativos, foi realizada uma análise de correspondência múltipla (MCA). *A priori*, os valores de glicose coletados 48h pós-laparostomia foram categorizados em 4 classes de acordo com os valores extremos (mínimo e máximo), bem como o primeiro, segundo, terceiro e quarto quartil, a saber: de 284 a 300, de 301 a 374, de 375 a 412 e de 413 a 483 mg/dL. *A posteriori*, a matriz formada pelos grupos, classes de glicose e os achados qualitativos da histopatologia foi convertida em uma tabela de Burt e submetida ao teste do qui-quadrado. Investigar a existência de uma relação não aleatória entre as linhas e colunas da matriz, bem como extrair os resíduos (valor observado subtraído do valor esperado) que foram ajustados e padronizados pelo escore z-normal (valor observado subtraído do valor esperado dividido pela raiz quadrada do resíduo). A tabela de Burt representa a união de várias tabelas de contingências (obrigatoriamente 2x2) em uma única tabela, possibilitando sua análise múltipla (várias tabelas de contingência). Quando a ocorrência de uma das classes de variáveis diferentes, foi elevada concomitantemente entendeu-se como sendo uma interdependência significativa entre as variáveis qualitativas. Portanto, os resíduos padronizados pelo escore z ($Z > 1,65$ e $> 1,96$) determinaram a existência de interdependências com significância de 10 e 5% respectivamente entre as classes das variáveis qualitativas, quanto maior a distância do ponto de corte estabelecido por Z , maior será a magnitude da interdependência. Quando Z foi $< -1,65$ ou $< -1,96$, indicou a inexistência de interdependências com significância de 10 e 5%, respectivamente.

Finalmente, os testes foram mostrados em um mapa perceptivo bidimensional. As interdependências de interesse apontadas pelo Z , bem como a construção de elipses confidentes com a distribuição da densidade dos ratos de ambos os grupos experimentais para um julgamento visual qualitativo. Para confirmar a separação entre as elipses dos grupos, o escore individual de cada rato foi extraído das duas primeiras dimensões, que é um coeficiente

que representa a interdependência múltipla entre as variáveis. As variações nas pontuações individuais em função dos grupos foram investigadas por regressão linear simples. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, e as comparações múltiplas foram feitas com a correção do procedimento de Bonferroni com significância de 5%.

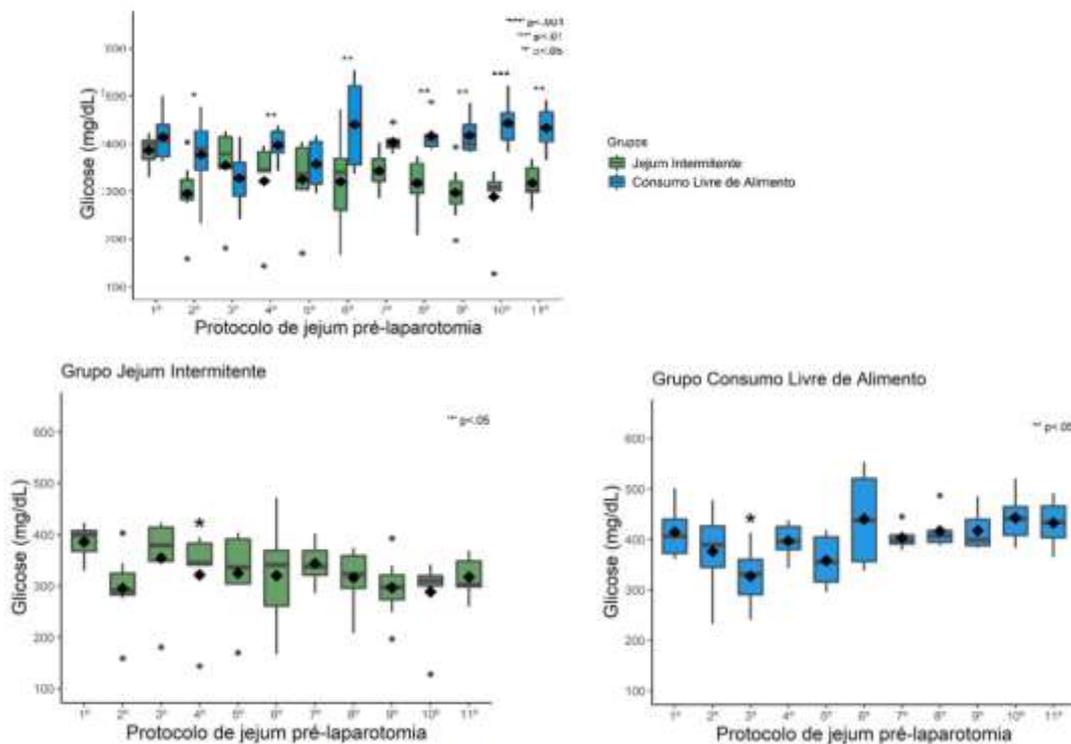
5 RESULTADOS

Para este estudo foram utilizados inicialmente 40 ratos, destes, 13 foram selecionados e foram divididos em dois grupos: IF, jejum intermitente e FF, alimentação livre.

Na comparação intragrupos ao longo dos protocolos de jejum pré-laparotomia, os ratos do grupo IF apresentaram glicose no 1º protocolo maior em relação ao 4º protocolo e houve equilíbrio na variação da glicose a partir do 5º, enquanto para os do grupo FF a glicose no 3º protocolo foi menor em relação ao 6º, 10º e 11º, representando uma instabilidade na curva glicêmica ao longo dos 11 protocolos.

Na comparação intergrupos, os ratos do grupo IF apresentaram glicose menor em comparação aos do grupo FF no 2º, 4º, 6º, 8º, 9º, 10º e 11º nos momentos de jejum. As alterações de glicose sugerem uma glicemia mais baixa e mais estável nos ratos do grupo IF ao longo dos 11 protocolos de jejum (Figura 2). Além disso, os ratos de ambos os grupos reduziram o peso após os 11 protocolos de jejum e apenas os do grupo IF apresentaram redução da circunferência abdominal (Figura 3).

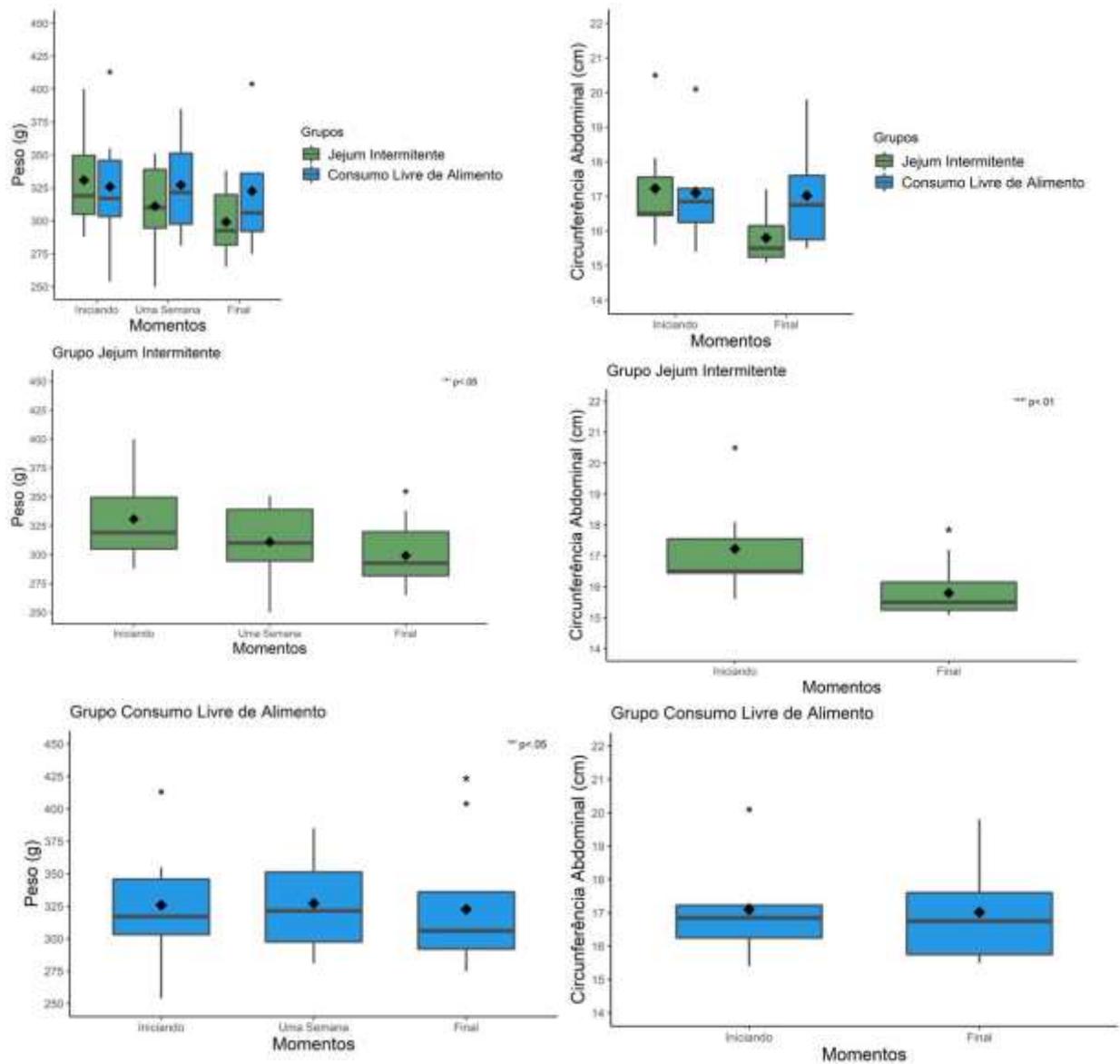
Figura 2 - Gráfico da glicose (mg/dL) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo de 11 protocolos de jejum pré-laparotomia



Os limites inferior e superior da caixa representam respectivamente o primeiro e terceiro quartil dos dados; a linha horizontal mais expressa dentro da caixa indica a mediana; o losango indica a média; círculos pretos indicam outliers; Níveis glicêmicos do protocolo de jejum pré-laparotomia mostrando comparação entre os grupos (verde e azul) e comparação ao longo do tempo em relação ao primeiro momento apenas para o grupo em jejum intermitente (verde) e o grupo de alimentação livre (azul). Comparações múltiplas foram conduzidas por modelos lineares mistos com pós-teste corrigido por procedimento de Bonferroni após transformação de Box-Cox para atender a pressuposição de normalidade ($p < 0,05$). Os dados apresentados na figura representam os valores originais (não transformados).

Fonte: material elaborado pelo autor.

Figura 3 - Gráfico do peso (g) e da circunferência abdominal (cm) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo do tempo

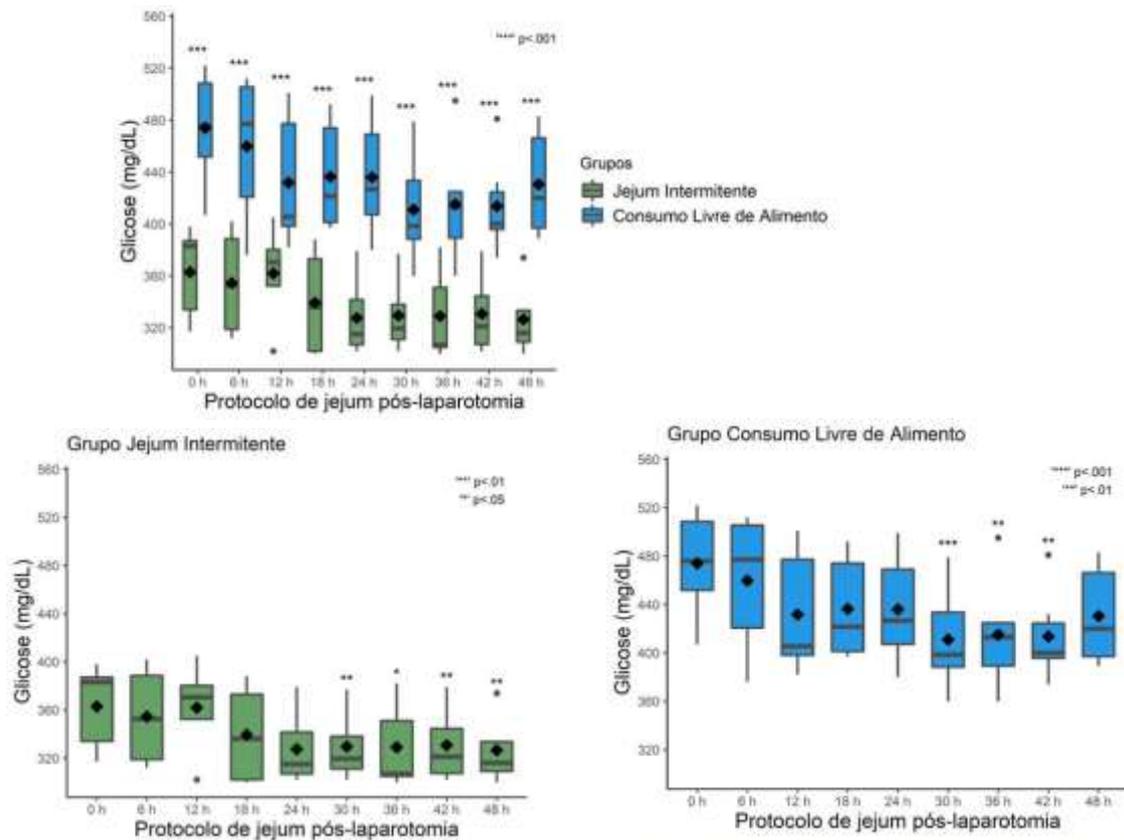


Os limites inferior e superior da caixa representam respectivamente o primeiro e terceiro quartil dos dados; a linha horizontal mais escura dentro da caixa indica a mediana; o losango indica a média; círculos pretos indicam outliers; Comparação do peso e circunferência abdominal entre os grupos (verde e azul) e comparação ao longo do tempo em relação ao momento inicial apenas para o grupo em jejum intermitente (verde) e grupo de alimentação livre (azul). Comparações múltiplas foram conduzidas por modelo linear generalizado com pós-teste corrigido por procedimento de Bonferroni ($p < 0,05$).

Fonte: material elaborado pelo autor.

No controle glicêmico pós-operatório, os ratos do grupo IF apresentaram glicose mais elevada em 0 horas após a cirurgia em comparação com 30, 36, 42 e 48 horas pós-laparotomia e houve estabilização da variação da glicemia a partir de 6 horas após a operação. No grupo FF, eles também apresentaram glicose mais elevada 0 horas após o procedimento em comparação com 30, 36 e 42 horas pós-laparotomia, porém após 6 horas a curva glicêmica pós-operatória permaneceu instável (Figura 4). Na comparação intergrupos, os ratos do grupo IF apresentaram glicose menor em comparação aos do grupo FF em todos os momentos de avaliação. Essas alterações na glicose sugerem uma glicemia mais baixa e mais estável em ratos do grupo IF após a laparotomia.

Figura 4 - Gráfico da glicose (mg/dL) de ratos submetidos a jejum intermitente ou ingestão de comida livre avaliados ao longo de 48 horas após laparotomia



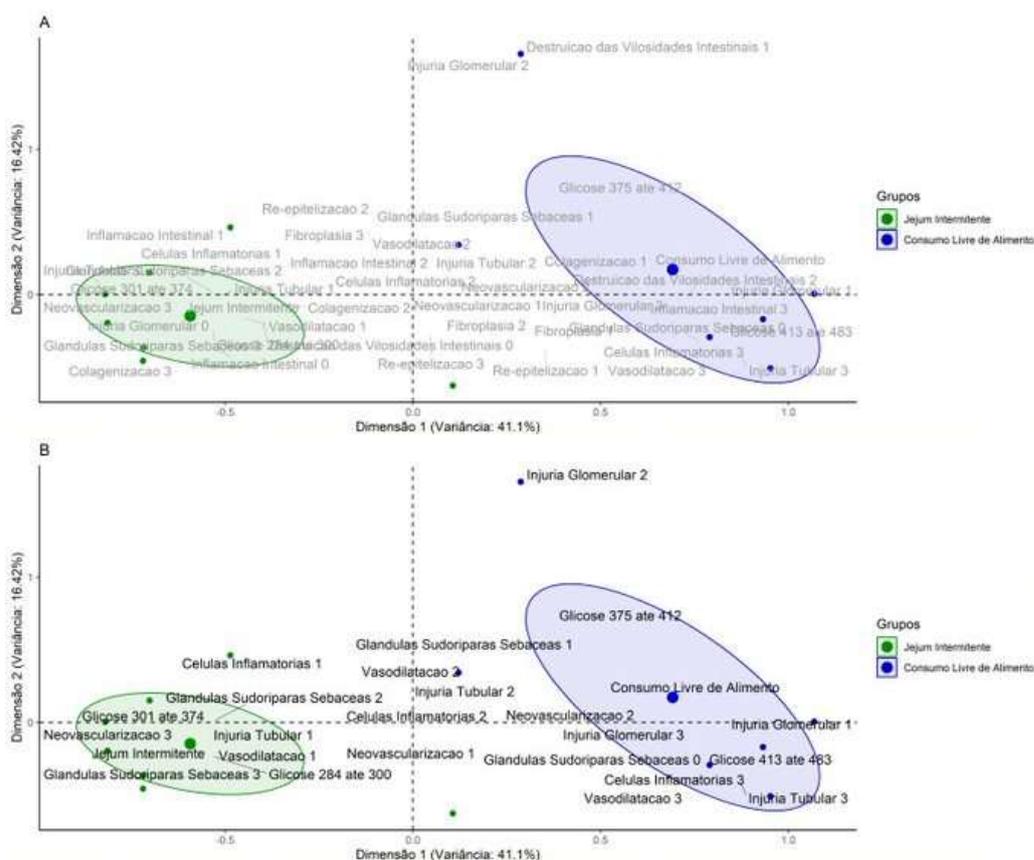
Os limites inferior e superior da caixa representam respectivamente o primeiro e terceiro quartil dos dados; a linha horizontal mais escura dentro da caixa indica a mediana; o losango indica a média; círculos pretos indicam *outliers*; Níveis glicêmicos do protocolo de jejum pós-laparotomia mostrando comparação entre os grupos (verde e azul) e comparação ao longo do tempo em relação ao primeiro momento apenas para o grupo em jejum intermitente (verde) e grupo de alimentação livre (azul). Comparações múltiplas foram conduzidas por modelos lineares mistos com pós-teste corrigido por procedimento de Bonferroni ($p < 0,05$).

Fonte: material elaborado pelo autor.

A análise histológica mostrou que ratos com glicose > 413 mg / dL (quarto quartil), independente do grupo, apresentaram interdependência com escore de dano tubular 3 ($Z = 2,3$; $p = 0,0215$). Animais com glicose de 301 a 374 mg / dL (segundo quartil) apresentaram interdependência com escore 3 para neovascularização ($Z = 2,2$; $p = 0,0273$) e glândula sebácea e sudorípara ($Z = 2,30$; $p = 0,0215$). Os demais parâmetros histológicos não mostraram interdependência estatística. Além disso, a distância entre as elipses no mapa perceptivo sugere uma separação dos animais submetidos ao jejum intermitente daqueles com alimentação livre (Figura 5). A separação visual das elipses mais os achados de Z sugerem um padrão de resposta em que ratos com melhor controle glicêmico apresentaram dano mais leve ao tecido renal, maior grau de neovascularização e presença de cicatrização de glândulas sebáceas e sudoríparas após laparotomia.

Pela análise dos resíduos do teste de qui-quadrado padronizados pela escala z-normal (Z) (**Apêndice 1**) foi possível observar que ratos do grupo FF mostraram uma tendência a não interdependência com dano glomerular score 0 ($Z = -1,86$; $p = 0,0616$), enquanto aqueles do grupo IF mostraram tendência de interdependência com dano glomerular score 0 ($Z = -1,73$; $p = 0,0826$).

Figura 5 - Mapa perceptivo da primeira e segunda dimensão da análise de correspondência múltipla com os achados qualitativos da histopatologia, grupos experimentais e classes de glicose



Na figura A são apresentadas todas as variáveis qualitativas aplicadas na análise e na figura B apenas aquelas com interdependências pelo teste do qui-quadrado. Nessa dimensão da glicose é possível avaliar as interdependências de maior lesão renal no grupo alimentação livre e melhores parâmetros de cicatrização no grupo jejum.

Fonte: material elaborado pelo autor.

Em relação à interleucina IL 10, NGAL (Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica), creatinina, ácido úrico, proteína total, TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) do plasma, coração, cérebro, rim e fígado foram iguais entre os grupos (Tabela 1), sendo que nenhum dos animais atingiu o limite mínimo detectável pelo teste de TNF- α (<48,88 pg/mL), IL 6 (<7,5 pg/mL) e IL 4 (<9,38 pg/mL).

Tabela 1 - Média e desvio-padrão de IL 10, NGAL, creatinina, ácido úrico, proteína total, TBARS do plasma, coração, cérebro, rim e fígado da comparação coletados 48 horas após laparotomia de ratos submetidos a jejum intermitente (IF) daqueles com alimentação livre (FF)

Variáveis	FF	IF	P-valor
IL 10(pg/mL)	24,77 \pm 7,96	29,27 \pm 15,17	0,5279
NGAL(pg/mL)	1464,28 \pm 345,83	1226,61 \pm 378,54	0,2654
Creatinine (mg/dL)	0,97 \pm 0,73	0,8 \pm 1,21	0,4166
Uric Acid (mg/dL)	1,95 \pm 0,81	1,76 \pm 0,5	0,6091
Total Protein(g/dL)	5,78 \pm 0,39	5,66 \pm 0,48	0,6177
Plasma TBARS(pg/mL)	29,7 \pm 10,39	25,26 \pm 6	0,3562
Heart TBARS(pg/mL)	17,2 \pm 1,21	23,39 \pm 10,49	0,2303
Brain TBARS(pg/mL)	30,2 \pm 9,39	29,2 \pm 6,78	0,8278
Kidney TBARS(pg/mL)	23,87 \pm 3,4	25,77 \pm 4,13	0,3890
Liver TBARS(pg/mL)	61,28 \pm 19,19	48,71 \pm 12,41	0,1820

Comparações múltiplas foram feitas por procedimento de Bonferroni do modelo linear incluindo grupos como efeito fixo, sendo que creatinina e TBARS do coração foram submetidas a transformação de Box-Cox para atender a pressuposição de normalidade. Os dados apresentados na figura representam os valores originais (não transformados).

Fonte: material elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo verificar a influência da prática de jejum intermitente dias antes da cirurgia na melhora dos resultados e da recuperação de procedimentos cirúrgicos em indivíduos diabéticos.

Neste estudo, demonstramos que o IF antes da cirurgia reduziu notavelmente os níveis de glicose sanguínea em ratos diabéticos no período perioperatório, principalmente com melhor estabilização da curva glicêmica no pós-operatório em comparação ao grupo FF. Também é importante dizer que não tivemos nenhuma hipoglicemia importante durante o protocolo de jejum no grupo IF.

Nossos achados neste campo cirúrgico estão de acordo com vários estudos anteriores demonstrando que a IF é uma intervenção benéfica no diabetes [50, 51, 52]. Como a cirurgia é uma agressão à homeostase e pode dificultar o controle da glicose, o IF poderia ser uma proteção contra o trauma cirúrgico, pois aumenta a resistência ao estresse celular [53] e melhora a flexibilidade metabólica [54]. Em ratos induzidos por diabetes em estudos anteriores, o IF melhorou a tolerância à glicose, aumentou a insulina plasmática e melhorou a massa de células β [55, 56]. A resposta adaptativa ao estresse do IF inclui prevenção da inflamação, melhor controle do estresse oxidativo, com formação de mais mitocôndrias [57].

Além de todos os benefícios metabólicos do IF, principalmente no metabolismo da glicose, estudos têm mostrado vantagens secundárias que podem ser interessantes para o anesthesiologista no período perioperatório. Na dor, o IF aumentou a antinocepção induzida por morfina enquanto atenuou a tolerância e a constipação em camundongos [58]. Outro benefício potencial é a função cognitiva que poderia melhorar contra o sofrimento [59].

Em geral, o peso corporal em ratos em jejum intermitente é menor do que em ratos alimentados *ad libitum* [60]. Em estudo publicado por Spezani [61], os ratos que foram submetidos a IF demonstraram perda de massa corporal a partir da 8ª semana de experimento, chegando a uma redução de até 10%. Entretanto, em nosso estudo ambos os grupos perderam peso e a diferença não foi estatisticamente significativa. Porém, apenas no grupo IF houve redução da circunferência abdominal ($p < 0,05$).

Neste estudo também buscamos verificar os níveis de marcadores inflamatórios no momento pós-operatório. Os marcadores inflamatórios são proteínas de baixo peso molecular com funções metabólicas e endócrinas, que participam dos mecanismos de inflamação e da resposta imunológica do organismo para garantir a homeostase [62].

As citocinas pró-inflamatórias verificadas neste estudo são: a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, envolvida no desenvolvimento da hiperinsulinemia e na síndrome metabólica, pois desempenha papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios por aumentar a lipólise, com inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol, e redução da expressão do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e GLUT-4 nos tecidos muscular e hepático. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida pelas células T helpers, linfócitos T, linfócitos B, monócitos e macrófagos. Possui propriedades anti-inflamatórias, cuja principal função é a regulação do sistema imune, pois inibe de maneira potente a expressão e/ou a produção de citocinas pró-inflamatórias. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que regula múltiplos processos biológicos (incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação). É uma citocina que age no adipócito, desempenhando um papel regulador no acúmulo de gordura corporal. Em seres humanos obesos, há forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo da glicose em razão da supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina. A IL 4 é uma glicoproteína anti-inflamatória e tem sido referida como fator de

crescimento de células B, fator estimulante das células B, fator de crescimento de linfócitos e fator de crescimento-II das células T [63].

NGAL é uma molécula proteica predominantemente expressa na parte distal do néfron após a ocorrência de lesão renal. Diferentemente da creatinina sérica e da taxa de filtração glomerular, que são marcadores de função renal, os níveis aumentados de NGAL, tanto no soro quanto na urina, estão intimamente ligados a lesões estruturais do néfron. Estudos clínicos indicam que poucas horas após a ocorrência da lesão renal aguda os níveis séricos e urinários de NGAL já se apresentam significativamente elevados [64]. Tendo em vista que a doença renal pode ser causada ou agravada pela diabetes, este marcador foi escolhido para avaliarmos a ocorrência de lesão renal.

TBARS é um marcador de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um termo geral usado para descrever o desequilíbrio entre a produção e a manifestação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou de reparar o dano resultante. O aumento do estresse oxidativo vem sendo fortemente relacionado, tanto em estudos experimentais quanto clínicos, com patogênese e complicações do DM [65]. Wietzycosk *et al* demonstraram aumento importante na atividade de TBARS no sangue e nos tecidos pulmonares e hepáticos em ratos diabéticos em comparação com a sua atividade nos ratos controles [66].

As análises em relação a interleucina IL 10, NGAL, creatinina, ácido úrico, proteína total, TBARS do plasma, coração, cérebro, rim e fígado demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos. Os marcadores inflamatórios IL 6, IL 4 e TNF- α , não atingiram o limite mínimo detectável. Isso pode ter ocorrido devido ao momento tardio da coleta de sangue, que ocorreu no momento da eutanásia, 48 horas depois da cirurgia.

Em nossos achados histológicos, investigamos o efeito do IF na cicatrização de feridas, danos nos rins, fígado e intestino duodenal. Em nossos resultados, apresentados no mapa perceptual, menor comprometimento renal esteve próximo da elipse de IF com ratos com melhor controle glicêmico em comparação com níveis mais elevados, com interdependência significativa de dano tubular moderado no terceiro quartil de glicose, representado pelo grupo FF. O mesmo ocorreu com os parâmetros de cicatrização de feridas com melhor estado de cicatrização próximo à elipse IF em comparação com FF. Além disso, houve interdependência significativa de neovascularização e presença de glândulas sebáceas e sudoríparas no processo de cicatrização de feridas. É difícil dizer que esses resultados se devem à IF ou ao melhor controle glicêmico promovido pelo jejum, porém ambos estão muito interligados. É claro que indivíduos com melhor controle da glicose apresentam incremento em seus resultados de cura [67].

O comprometimento renal é sempre preocupante no período perioperatório. Observamos que no rim diabético após laparotomia seguiu o mesmo caminho de estudos anteriores, onde IF protegeu contra dano tubular em lesão de isquemia-reperfusão induzida. Isso aponta que o IF poderia ser uma proteção nutricional promovendo a resistência renal contra lesões após o trauma [68, 69]. Em nosso estudo não está claro se esse resultado é devido apenas ao IF ou ao melhor controle glicêmico por ele promovido, ou ambos.

Outra preocupação dos pesquisadores é o aumento da esteatose hepática no período perioperatório. Felizmente, não houve interdependência entre os grupos, sem aumento de esteatose ou lesão hepática em ambos os grupos. É importante ressaltar que em estudos anteriores o IF promoveu redução de esteatose e inflamação em camundongos com alto teor de gordura ou frutose [70]. Nossos resultados intestinais não mostraram interdependência importante na destruição de vilosidades e inflamação (**Apêndice 2- figuras histologia**).

Nosso estudo tem várias limitações. Em primeiro lugar, não investigamos se os mecanismos por trás de um melhor controle da glicose após laparotomia/cirurgia eram os

mesmos que o IF promoveu em outras condições em ratos diabéticos. Outra possível limitação é que não investigamos a funcionalidade dos órgãos, apenas avaliamos o estado morfológico para comparar e elucidar os achados histológicos em possíveis danos e o efeito na ferida operatória. Além disso, nossa limitação mais importante é que não poderíamos nos dissociar se o resultado histológico se deve ao jejum intermitente ou ao melhor controle da glicose por ele promovido, ou a ambos. Portanto, a lesão de órgão perioperatória é sempre uma preocupação do anestesiológico, e não há terapia farmacológica específica comprovadamente eficaz na prevenção do dano [71]. Este estudo de IF no período perioperatório poderia guiar novos estudos para confirmar os mecanismos e benefícios do IF em campo cirúrgico.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o controle da glicose em ratos diabéticos melhora no período perioperatório com jejum intermitente, especialmente com mais rápida estabilização glicêmica no pós-operatório, com menor comprometimento renal e melhor cicatrização da ferida cirúrgica. Os demais parâmetros estudados não apresentaram diferenças significativas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O jejum intermitente pode ser um novo recurso para melhorar a resistência do organismo ao estresse cirúrgico que poderíamos explorar em estudos futuros em humanos, especialmente em indivíduos diabéticos.

REFERÊNCIAS

1. Covre ER, de Melo WA, Tostes MFP, Fernandes CAM. Tendência de internações e mortalidade por causas cirúrgicas no Brasil, 2008 a 2016. *Revista do colégio brasileiro de cirurgiões*. 2019;46(1):e1979.
2. Christóforo BB. Cuidados de enfermagem realizados ao paciente cirúrgico no período pré-operatório. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
3. Ali Abdelhamid Y, Chapman MJ, Deane AM. Peri-operative nutrition. *Anaesthesia*. 2016 Jan;71 Suppl 1:9-18. doi: 10.1111/anae.13310. PMID: 26620142.
4. Martindale RG, McClave SA, Taylor B, Lawson CM. Perioperative nutrition: what is the current landscape? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2013; 37(5 Suppl.): 5S–20S.
5. Mennella B, Ramos S. Diretriz do Projeto ACERTO – Aceleração da Recuperação Total Pós-operatória. *Insira Educacional*. [acesso em 2020 out 12]. Disponível em: <https://blog.insira.com.br/diretriz-do-projeto-acerto-aceleracao-da-recuperacao-total-pos-operatoria/>.
6. Carmichael JC, Keller DS, Baldini G, Bordeianou L, Weiss E, Lee L, et al. Clinical Practice Guidelines for Enhanced Recovery After Colon and Rectal Surgery From the American Society of Colon and Rectal Surgeons and Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons. *Diseases of the colon and rectum*. 2017;60(8):761-84.
7. Eras Society. History. [acesso em 2018 set 01]. Disponível em: <http://erassociety.org/about/history/>.
8. Greco M, Capretti G, Beretta L, Gemma M, Pecorelli N, Braga M. Enhanced recovery program in colorectal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *World journal of surgery*. 2014;38(6):1531-41.
9. Martins MVDC. Estamos realmente prontos para a implantação do protocolo ERAS? *Revista do colégio brasileiro de cirurgiões*. 2017;44(4):314-15.
10. Ripollés-Melchor J, Fuenmayor-Varela ML, Camargo SC, Fernández PJ, Barrio ÁCD, Martínez-Hurtado E, et al. Aceleração da recuperação após protocolo cirúrgico versus cuidados perioperatórios convencionais em cirurgia colorretal. Um estudo de coorte em centro único [Enhanced recovery after surgery protocol versus conventional perioperative care in colorectal surgery. A single center cohort study]. *Brazilian journal of anesthesiology*. 2018;68(4):358-68.
11. de Aguiar-Nascimento JE, editor. *Acerto: acelerando a recuperacao total pos-operatória*. 3 ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2016.

12. Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, Rosenberg JM, Bickler S, Brennan T, et al. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *The journal of pain*. 2016;17(2):131-57.
13. Feldheiser A, Aziz O, Baldini G, Cox BP, Fearon KC, Feldman LS, et al. Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) for gastrointestinal surgery, part 2: consensus statement for anaesthesia practice. *Acta anaesthesiologica scandinavica*. 2016;60(3):289-334.
14. Brady M, Kinn S, Stuart P. Preoperative fasting for adults to prevent perioperative complications. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003;(4):CD004423.
15. Watt DG, McSorley ST, Horgan PG, McMillan DC. Enhanced Recovery After Surgery: Which Components, If Any, Impact on The Systemic Inflammatory Response Following Colorectal Surgery?: A Systematic Review. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(36):e1286.
16. Campos SBG, Barros-Neto JA, Guedes GS, Moura FA. Jejum pré-operatório: por que abreviar? *ABCD, Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva*. 2018;31(02):e1377.
17. Hennessey DB, Burke JP, Ni-Dhonochu T, Shields C, Winter DC, Mealy K. Preoperative hypoalbuminemia is an independent risk factor for the development of surgical site infection following gastrointestinal surgery: a multi-institutional study. *Annals of surgery*. 2010;252(2):325-9.
18. Gillis C, Wischmeyer PE. Pre-operative nutrition and the elective surgical patient: why, how and what? *Anaesthesia*. 2019 Jan;74 (Suppl 1):27-35. doi: 10.1111/anae.14506. PMID: 30604414.
19. World Health Organization. Diabetes. [acesso em 2018 set 03]. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017*. Brasília: Ministério da Saúde; 2018. 130.: il. [acesso em 2019 set. 03]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2017/11/numero-de-brasileiros-com-diabetes-cresceu-61-8-em-10-anos>.
21. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018*. De Oliveira JEP, Montenegro Junior RM, Vencio S, organizadores. São Paulo: Clannad; 2017.

22. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). National Institutes of Health (NIH). [acesso em 2018 out 20]. Disponível em: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/whatis-diabetes>.
23. American Diabetes Association (ADA). Diabetes Symptoms. Acesso em 2018 out 20]. Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/?loc=superfooter>.
24. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. [acesso em 2021 nov 15]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>.
25. Albalawi Z, Laffin M, Gramlich L, Senior P, Mcalister FA. Enhanced Recovery After Surgery (ERAS[®]) in Individuals with Diabetes: A Systematic Review. *World journal of surgery*. 2017;41(8):1927-34.
26. Moningi S, Nikhar S, Ramachandran G. Autonomic disturbances in diabetes: Assessment and anaesthetic implications. *Indian journal of anaesthesia*. 2018;62(8):575-83.
27. Membership of the Working Party, Barker P, Creasey PE, Dhatariya K, Levy N, Lipp A, et al. Peri-operative management of the surgical patient with diabetes 2015: Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland. *Anaesthesia*. 2015;70(12):1427-40.
28. Pontes JPJ, Mendes FF, Vasconcelos MM, Batista NB. Avaliação e manejo perioperatório de pacientes com diabetes melito. Um desafio para o anestesista. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2018;68(1):75-86.
29. Fragen RJ, Shanks CA, Molteni A, Avram MJ. Effects of etomidate on hormonal responses to surgical stress. *Anesthesiology*. 1984;61(6):652-6.
30. Bodnar TW, Gianchandani R. Preprocedure and preoperative management of diabetes mellitus. *Postgrad Med*. 2014 Oct;126(6):73-80. doi: 10.3810/pgm.2014.10.2822. PMID: 25414936.
31. NOBELPRIZE.ORG. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016. [acesso em 2018 out 29]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/press-release/>.
32. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 2014;111(47):16647-53.
33. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell metabolism*. 2014;19(2):181-92.
34. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Journal of neurochemistry*. 2002;80(3):539-47.

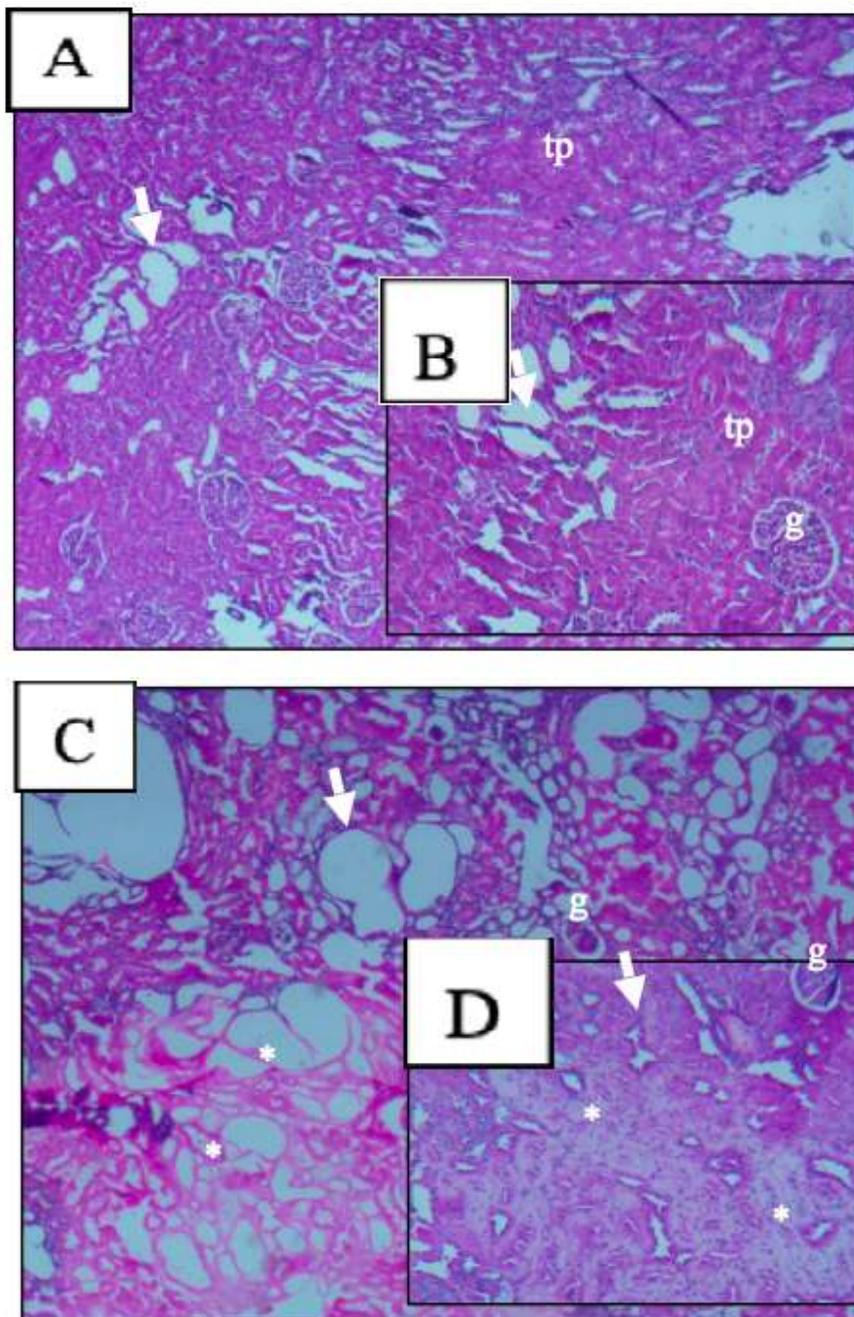
35. Baptistella AB, Dos Santos GB. Jejum Intermitente e Implicações Metabólicas. In: Andreia Naves; Ana Beatriz Baptistella. (Org.). *Análise Crítica das Estratégias Nutricionais para Performance Esportiva & Emagrecimento*. 1ed. São Paulo: Valéria Paschoal Editora, 2016; 1:11-144.
36. Barnosky AR, Hoddy KK, Unterman TG, Varady KA. Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;164(4):302-11.
37. Beli E, Yan Y, Moldovan L, Vieira CP, Gao R, Duan Y, et al. Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in *db/db* Mice. *Diabetes*. 2018;67(9):1867-79.
38. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell metabolism*. 2018;27(6):1212-1221.e3.
39. Patterson RE, Laughlin GA, LaCroix AZ, Hartman SJ, Natarajan L, Senger CM, et al. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2015;115(8):1203-12.
40. Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Science translational medicine*. 2012;4(124):124ra27.
41. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*. 2014;2014:761264.
42. Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD, et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(5):665-74.
43. Alirezaei M, Kemball CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL, Kiosses WB. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*. 2010;6(6):702-10.
44. Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 2020;8(7):e3000410.
45. da Silva VD, Nogueira RMB. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos *Wistar*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2015;36(1):9-15.
46. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free radical biology & medicine*. 1996;20(2):251-6.

47. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
48. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA. Brasília, DF, 2013.
49. de Carvalho PTC. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2001.
50. Belkacemi L, Selselet-Attou G, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. In vivo investigations. *International journal of molecular medicine*. 2010;26(5):759-65.
51. Wei S, Han R, Zhao J, Wang S, Huang M, Wang Y, et al. Intermittent administration of a fasting-mimicking diet intervenes in diabetes progression, restores β cells and reconstructs gut microbiota in mice. *Nutrition & Metabolism*. 2018;15:80.
52. Wei S, Zhao J, Bai M, Li C, Zhang L, Chen Y. Comparison of glycemic improvement between intermittent calorie restriction and continuous calorie restriction in diabetic mice. *Nutrition & Metabolism*. 2019;16:60.
53. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *The journal of nutrition biochemistry*. 2005;16(3):129-37.
54. Dedual MA, Wueest S, Borsigova M, Konrad D. Intermittent fasting improves metabolic flexibility in short-term high-fat diet-fed mice. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*. 2019;317(5):E773-E82.
55. Belkacemi L, Selselet-Attou G, Hupkens E, Nguidjoe E, Louchami K, Sener A, et al. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. *International Journal of Endocrinology*. 2012;2012:962012.
56. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, Murphy J, Ma X, Rohatgi N, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*. 2017;13(11):1952-68.
57. Vemuganti R, Arumugam TV. Molecular Mechanisms of Intermittent Fasting-induced Ischemic Tolerance. *Conditioning medicine*. 2020;3(1):9-17.
58. Duron DI, Hanak F, Streicher JM. Daily intermittent fasting in mice enhances morphine-induced antinociception while mitigating reward, tolerance, and constipation. *Pain*. 2020;161(10):2353-63.
59. Shojaie M, Ghanbari F, Shojaie N. Intermittent fasting could ameliorate cognitive function against distress by regulation of inflammatory response pathway. *Journal of advanced research*. 2017;8(6):697-701.

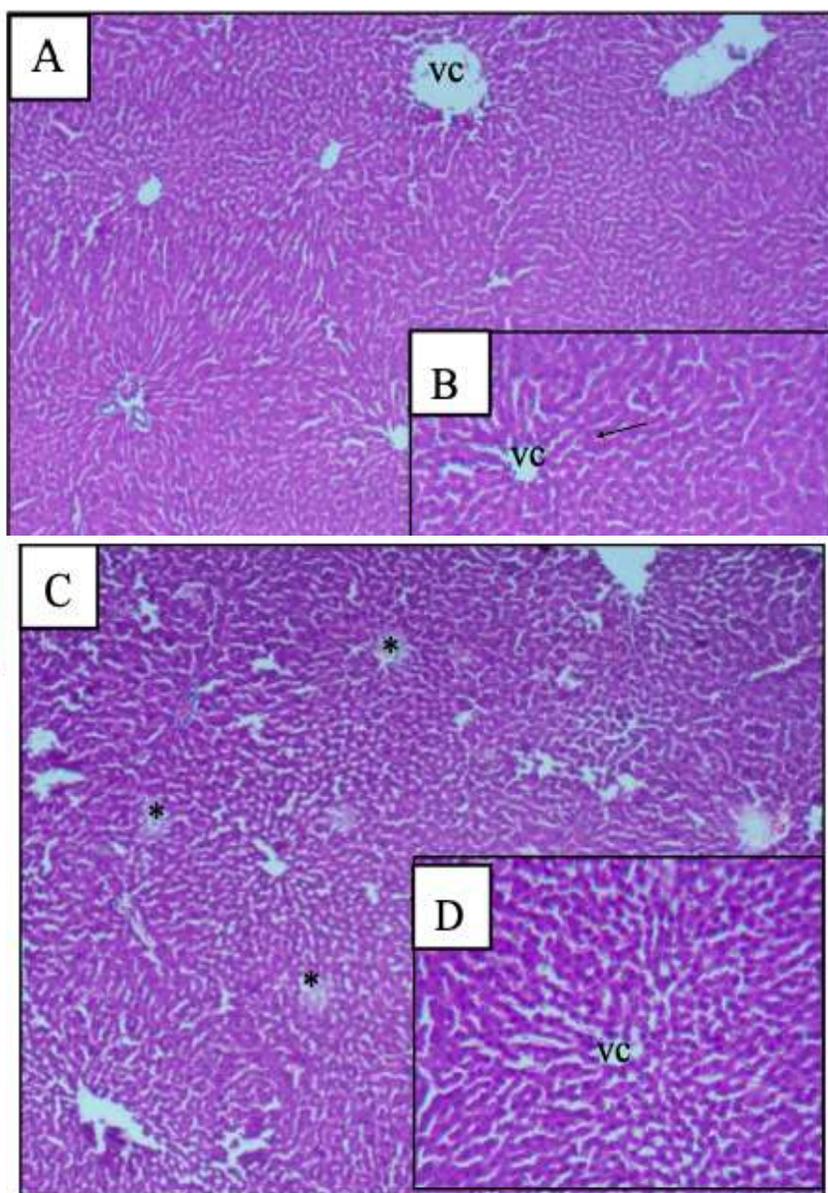
60. Ma J, Cheng Y, Su Q, Ai W, Gong L, Wang Y, et al. Effects of intermittent fasting on liver physiology and metabolism in mice. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;22(3):950.
61. Spezani R. Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos obesos induzidos por dieta. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2020.
62. Miranda VPN, Peluzio M do CG, Franceschini S do CC, Priore SE. Marcadores inflamatórios na avaliação nutricional: relação com parâmetros antropométricos, composição corporal e níveis de atividade física. *Revista da associação brasileira de nutrição*. 2014;6(1):61-72.
63. Volp AC, Alfenas R de C, Costa NM, Minim VP, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008;52(3):537-49.
64. Lago MW, Moresco RN, Bochi GV. Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) como um biomarcador de lesão renal: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2016;75:01-3.
65. Al-Rawi N. Diabetes, Oxidative Stress, Antioxidants and Saliva: A Review. In: *Oxidative Stress and Diseases*. Lushchak VI, Gospodaryov DV (ed). Croácia: IntechOpen; 2012. p.303-310.
66. Wietzycoski CR, Marchesini JCD, Al-Themyat S, Meyer FS, Trindade MRM. Improvement in oxidative stress after duodenojejunosomy in an experimental model of type 2 diabetes mellitus. *ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 2016;29(Supl.1):3-7.
67. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;112:108615.
68. Rojas-Morales P, León-Contreras JC, Aparicio-Trejo OE, Reyes-Ocampo JG, Medina-Campos ON, Jiménez-Osorio AS, et al. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology and medicine*. 2019;135:60-67.
69. Saat TC, van der Pluijm I, Ridwan Y, van Damme-van den Engel S, van Heijningen PM, Clahsen-van Groningen MC, et al. Pre-Operative Fasting Provides Long Term Protection Against Chronic Renal Damage Induced by Ischaemia Reperfusion Injury in Wild Type and Aneurysm Prone Fibulin-4 Mice. *European journal J Vasc Endovasc Surg*. 2020;60(6):905-15.
70. Marinho TS, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition*. 2019;65:103-12.
71. Conrad C, Eltzschig HK. Disease Mechanisms of Perioperative Organ Injury. *Anesthesia and analgesia*. 2020;131(6):1730-50.

Apêndice 2 – Fotos histologia – a/b – jejum intermitente, c/d – dieta livre

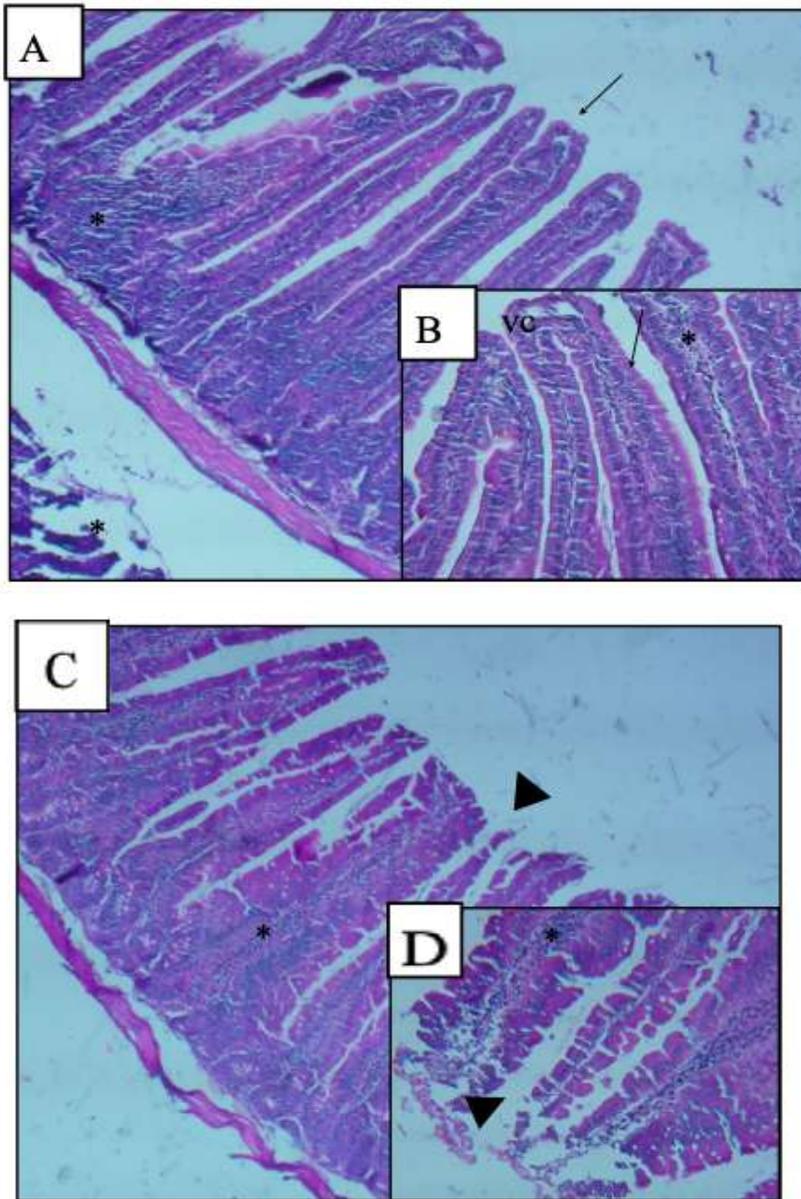
RIM: TP-TUBULO PROXIMAL;G-GLOMERULO; SETAS-LESÃO TUBULAR;* LESÃO tubular proximal e distal.



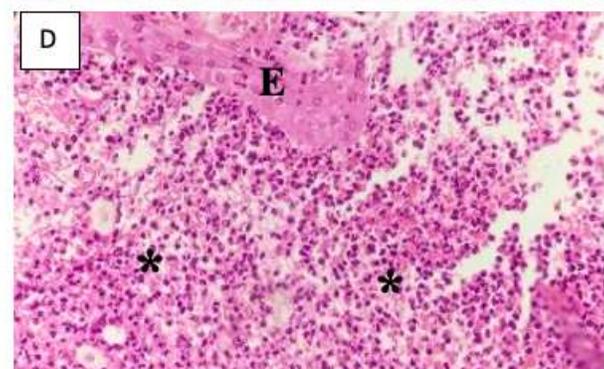
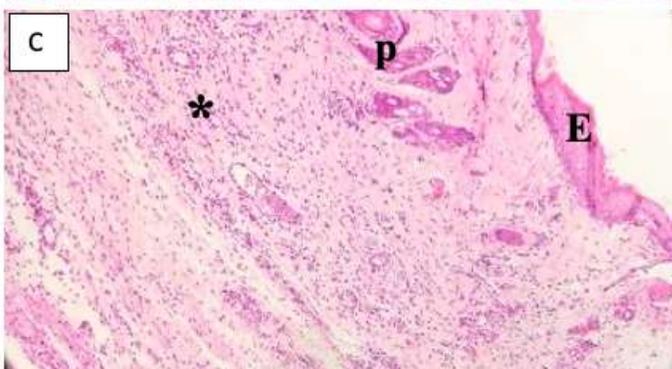
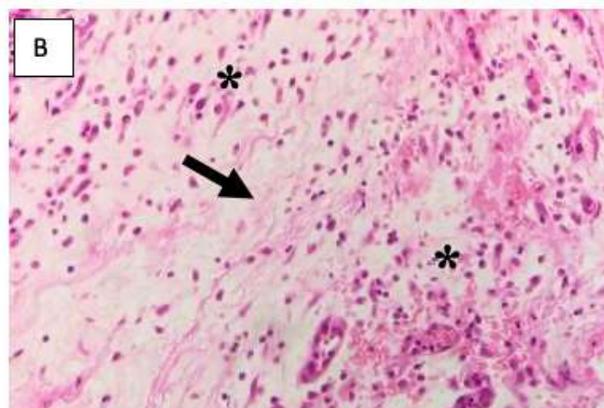
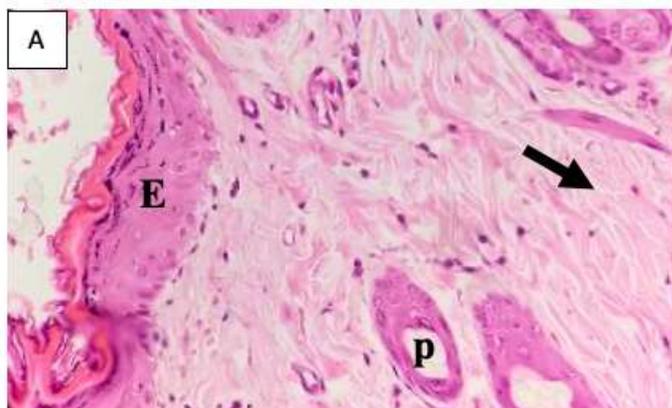
Figado: VC - VEIA CENTROLOBULAR; setas – hepatocitos ;* pequenas areas necrose



INTESTINO DELGADO: SETAS NAS VILOSIDADES; * células inflamatórias



PELE: e- epitelio; p – pelo; seta:colageno; * células inflamatórias



Anexo 1 – Aprovação do Comitê de ética no uso em animais

Erechim, 09 de março de 2019.

Carta de aprovação

O projeto intitulado “**Avaliação do jejum intermitente como estratégia nutricional pré-operatória em ratos diabéticos**”, de responsabilidade do professor **ANDRE KENG WEI HSU**, foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - URI Erechim) e está adequado a **LEI 11.794 DE 08 DE OUTUBRO DE 2008** que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

Foram solicitados e aprovados o uso de 40 Ratos heterogênicos, linhagem Wistar, adultos, machos, idade 3 meses. Assim, o projeto foi **considerado aprovado**.

Atenciosamente

Prof. Amito José Teixeira
Coordenador da CEUA URI Erechim
54 3520 9000

Anexo 4 – PUBLICAÇÃO



Article

Intermittent Fasting before Laparotomy: Effects on Glucose Control and Histopathologic Findings in Diabetic Rats

André Keng Wei Hsu ^{1,2,*}, Silvane Souza Roman ², Margarete Dulce Bagatini ³, Filomena Marafon ⁴, Paulo do Nascimento Junior ¹ and Norma Sueli Pinheiro Modolo ¹

¹ Anesthesia Department, São Paulo State University (UNESP)-Botucatu, Botucatu 18618683, Brazil; donascimentojunior@unesp.br (P.d.N.J.); norma.modolo@unesp.br (N.S.P.M.)

² Medical School, Pharmacology and Histology Department Integrated Regional University (URI), Erechim 99709910, Brazil; roman@uricer.edu.br

³ Academic Coordination, Biomedical Sciences Department, Federal University of Fronteira Sul, Chapeco 89862210, Brazil; margaretebagatini@yahoo.com.br

⁴ Postgraduate Program in Biochemistry Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040900, Brazil; marafon.fil@gmail.com

* Correspondence: andrekweng@hotmail.com



Citation: Hsu, A.K.W.; Roman, S.S.; Bagatini, M.D.; Marafon, F.; do Nascimento Junior, P.; Modolo, N.S.P. Intermittent Fasting before Laparotomy: Effects on Glucose Control and Histopathologic Findings in Diabetic Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 4519. <https://doi.org/10.3390/nu13124519>

Academic Editor: Benjamin D. Horne

Received: 27 November 2021

Accepted: 15 December 2021

Published: 17 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: Intermittent fasting is a nutrition practice in which individuals fast for several hours in a day, mainly with feeding time during the daylight hours. They seek to improve metabolic performance and cellular resistance to stress. In this study, we tested the fasting protocol to investigate the glycemic effect in a laparotomy perioperative period in diabetic rats and histopathologic findings. (2) Methods: The animals were diabetic-induced with alloxan. Two groups were set according to the feeding protocol: free food and intermittent fasting, whose rats could only eat 8 h in the daylight. Both groups were anesthetized, and a laparotomy was performed. We evaluated the glucose levels during the perioperative period, and we accessed organ histology seeking damage of kidney, bowel and liver after surgical trauma, and we evaluated the wound healing process. (3) Results: Glycemic levels were improved in the intermittent fasting group, especially in the post-operative period after laparotomy. Comparing both groups' tubular damage showed interdependency with mice with worse glycemic level ($Z = 2.3$; $p = 0.0215$) and wound-healing parameters showed interdependency with rats with better glycemic status for neovascularization ($Z = 2.2$; $p = 0.0273$) and the presence of sebaceous and sweat gland in the healing process ($Z = 2.30$; $p = 0.0215$). (4) Conclusions: Intermittent fasting before surgery can be a tool to improve glycemic levels in diabetic rats, with improvement especially in the post-operative period.

Keywords: intermittent fasting; diabetes; perioperative care

1. Introduction

Intermittent fasting (IF) is a nutrition strategy that is showing promising results in metabolic improvement in glucose regulation, weight loss and stress resistance [1]. In this practice the hours of the feeding day are restricted, alternating periods from 12 to 24 h of fasting in some days of the week. This aims to promote cellular resistance, organism resilience and improve plasticity when damage occurs [2].

In animal models, prophylactic IF diminished progression and gravity in several conditions such as cardiovascular diseases (myocardial infarction and stroke) [3,4], cancer and improvement of cancer-related therapy (chemotherapy or immunotherapy) [5,6].

In a diabetes scenario, previous studies have shown that IF in murine models promotes better β cell function and decreases insulin resistance [7,8]. In addition, gut microbiome is restructured and prevents retinopathy and prolonged survival [9]. In humans, results are attributed to weight loss in association with enhancement of peripheral insulin action [10,11].

In surgical field, this nutritional strategy could be a new method to improve outcomes and prepare the organism for the trauma of the surgical process. In animal models of ischemia/reperfusion injury, IF has displayed protection in hepatic and renal ischemic damage and has reduced intimal hyperplasia [12–14].

Considering that diabetes is a very challenging condition in the perioperative period and uncontrolled blood glucose can lead to worse surgical outcomes [15], we hypothesized that IF before surgery could be a new tool to improve glucose metabolic endurance and control after surgical trauma in diabetic rats, since the preoperative period represents an opportunity to optimize glycemic levels and potentially decrease adverse events [16].

2. Materials and Methods

The study was conducted according to ARRIVE guidelines and under the approval and regulations set forth by Institutional Animal Care and Use Committee of Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai—Erechim/Ceua (resolution 1628/CUN) on 19 March 2019 according to Brazilian animal studies law [17]. Wistar rats (all 3 months of age males $n = 40$) were housed in appropriate pathogen-free controlled conditions at a temperature of 20–24 °C in a group of four individuals in each cage. Light cycle was fixed at 12 h (12 h light and 12 h dark, starting at 8:00 am). All rats received water ad libitum and standard food according to the fasting protocol.

Experimental diabetes was induced in 12 h fasted rats by single intraperitoneal injection of alloxan [18] (150 mg/kg body weight) dissolved in citrate buffer (100 mM, pH 4.5). To prevent fatal hypoglycemia, as a result of massive pancreatic insulin release, the rats were supplied with 10% glucose solution after 6 h of alloxan administration for the next 24 h [18]. After seven days, rats with glycemia ≥ 200 mg/dL were selected for the experiment ($n = 13$).

The rats were divided in two feeding groups: the ad libitum (free food—FF) and the intermittent fasting protocol. In both groups the number of daily calories and nutrients were the same: 20 g per rat daily. In the FF group the amount of food was divided in two and was given at 8:00 a.m and the other half at 20:00 p.m. In the IF protocol, they fasted for 16 h and were fed for 8 h a day. The fasting hours were based on previous studies [19]. All amount of food was placed in the beginning of the light cycle at 8:00 a.m to mimic food intake only in the daylight and was taken at 16:00 p.m. They interspersed two days of fasting to one of free food where the food was given as the same as the FF group. They had 15 days of this feeding cycle before the laparotomy surgery.

All rats were anesthetized with 80 mg/kg ketamine + 10 mg/kg xylazine intraperitoneally in the right lower abdominal quadrant. For multimodal analgesia metamizole 150 mg/kg, 2 mg/kg morphine were administered subcutaneously, and the operative wound was infiltrated with 0.5% 2 mg/kg lidocaine. Under aseptic conditions a 3 cm laparotomy was performed, and abdominal wall closing was performed with continuous 2.0 polypropylene stiches and 3.0 nylon for the skin. After the surgery, both groups returned to FF diet protocol.

During the feeding protocol, blood glucose was measured (One Touch Ultra Mini™/Johnson & Johnson do Brazil, Complexo JK, São Paulo, Brazil) in both groups in the mornings after the fasting days to search for possible hypoglycemia, and immediately after the surgery every 6 h.

In 48 h after the surgery, rats were euthanized with thiopental 150 mg/kg and lidocaine 10 mg/kg intraperitoneally. Kidney, liver, the duodenal intestinal segment and the surgical wound were collected for histological assessment (experiment is diagrammed in Figure 1).

For histological analysis, the material was preserved, placed in paraffin and slides stained with hematoxylin and eosin were performed. A histologist analyzed and qualitatively classified the lesions into absent, mild, moderate and severe (0, 1, 2, 3). Kidney evaluation involved the degree of glomerular and tubular damage, for the liver, the presence of steatosis and necrosis. For duodenal segment we evaluated villi destruction and presence of inflammatory cells. Finally, in the operative wound we checked for the pres-

ence of inflammatory cells, re-epithelialization, fibroplasia, collagenization, vasodilatation, neovascularization and the presence of sebaceous and sweat glands in the healing process.

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed by a data scientist in the R software with the RStudio (Version 4.1.0 (22 June 2020), RStudio, Inc. Boston, MA, USA). The sample size was calculated using data from a previous study that was independent of the research reported herein [20].

Mixed linear models were conducted to investigate changes in intergroup glucose level (IF vs. FF) at each time point and intragroup across the pre-laparotomy fasting protocols and post-laparotomy evaluations. Furthermore, we also used this model for changes in weight and waist circumference of rats over time. The residual error of all mixed linear models showed a distribution assumed to be Gaussian by quantile–quantile plots and by the Shapiro–Wilk test. For the pre-laparotomy assessments of glucose and waist circumference, the Box–Cox transformation was used. The adjusted mixed linear models included the interaction between groups and moments as a fixed effect and rats as a random individual effect. Multiple comparisons were performed in the post-test with the correction of the Bonferroni procedure, assuming a significance of 5%.

To identify interdependencies between groups (IF or FF), glucose ranges and qualitative histopathology findings, a multiple correspondence analysis (MCA) was conducted. A priori, the glucose values collected 48 h post-laparotomy were categorized into 4 classes according to extreme values (minimum and maximum) as well as the first, second, third and fourth quartile, namely: from 284 to 300, from 301 to 374, from 375 to 412 and from 413 to 483 mg/dL. A posteriori, the matrix formed by the groups, classes of glucose and the qualitative findings of the histopathology was converted into a Burt table and submitted to the chi-square test to investigate the existence of a non-random relationship between the rows and columns of the matrix, as well as to extract the residuals (observed value subtracted from the expected value) that were adjusted and standardized by the normal z-score. Therefore, the residuals standardized by the z-score (Z) >1.65 and >1.96 determined the existence of interdependencies with significance of, respectively, 10 and 5% between the classes of qualitative variables; the greater the distance from the point of cut established by Z , the greater the magnitude of interdependence. When Z was <-1.65 or <-1.96 , it indicated the non-existence of interdependencies with significance of, respectively, 10 and 5%.

Finally, tests were shown in a two-dimensional perceptual map. The interdependencies of interest was pointed out by the Z , as well as the construction of confident ellipses with the density distribution of rats from both experimental groups for a qualitative visual judgment. To confirm the separation between the ellipses of the groups, the individual score of each rat was extracted from the first two dimensions, which is a coefficient representing the multiple interdependence between the variables. Variations in individual scores as a function of groups were investigated by simple linear regression. The Shapiro–Wilk test was performed, and multiple comparisons were performed with the correction of the Bonferroni procedure using 5% significance.

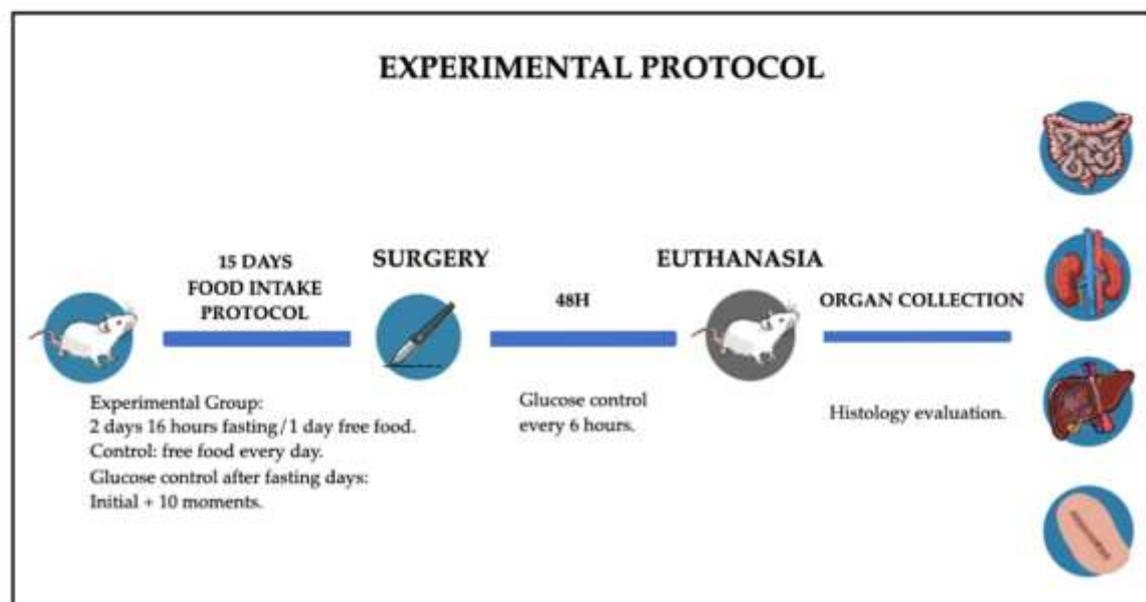


Figure 1. Schematic image of experimental protocol in diabetic rats of our study.

3. Results

Between intragroup comparisons throughout the pre-laparotomy fasting protocols, rats in the IF group showed higher glucose in the first moment compared to the fourth and there was a balance in the variation of glucose from the fifth, while for those in the FF group the glucose in the third moment was lower compared to the sixth, tenth and eleventh, representing an instability in the glycemetic curve over the 11 moments. In the intergroup comparison, rats from the IF group had lower glucose compared to those from the FF group in the second, fourth, sixth, eighth, ninth, tenth and eleventh fasting moments. Glucose changes suggest a lower and more stable glycemia in the IF group rats throughout the 11 fasting protocols (Figure 2A). Furthermore, rats in both groups reduced their weight after the 11 fasting protocols and only those in the IF group showed a reduction in waist circumference (Figure 2B). In both groups the amount of food intake was the same, 20 g/rat/daily, and there were no food leftovers. Due to this non-variation, no analyses were conducted for this item.

In the post-operative glucose control, rats in the IF group exhibited higher glucose at 0 h after surgery compared to 30, 36, 42 and 48 h post-laparotomy and there was a stabilization of glycemia variation from 6 h after the operation. In the FF group, they also showed higher glucose at 0 h after the procedure compared to 30, 36 and 42 h post-laparotomy, however after 6 h the post-operative glycemetic curve remained unstable (Figure 2C). In the intergroup comparison, rats in the IF group had lower glucose compared to those in the FF group at all evaluation times. Such changes in glucose suggest lower and more stable glycemia in rats in the IF group after laparotomy. The MCA showed that rats with glucose >413 mg/dL (fourth quartile) regardless of group had interdependence with tubular damage score 3 ($Z = 2.3$; $p = 0.0215$). Animals with glucose from 301 to 374 mg/dL (second quartile) showed interdependence with score 3 for neovascularization ($Z = 2.2$; $p = 0.0273$) and sebaceous and sweat gland ($Z = 2.30$; $p = 0.0215$). The other histological parameters did not show statistical interdependence. Furthermore, the distance between the ellipses on the perceptual map suggests a separation of animals submitted to intermittent fasting from those with free feeding (Figure 3). The visual separation of the ellipses plus the Z findings suggests a response pattern in which rats with better glycemetic control showed

milder damage to the renal tissue, a greater degree of neovascularization and the presence of sebaceous and sweat glands healing processes after laparotomy. Histological images are shown in Figure 3.

(A): Pre-laparotomy

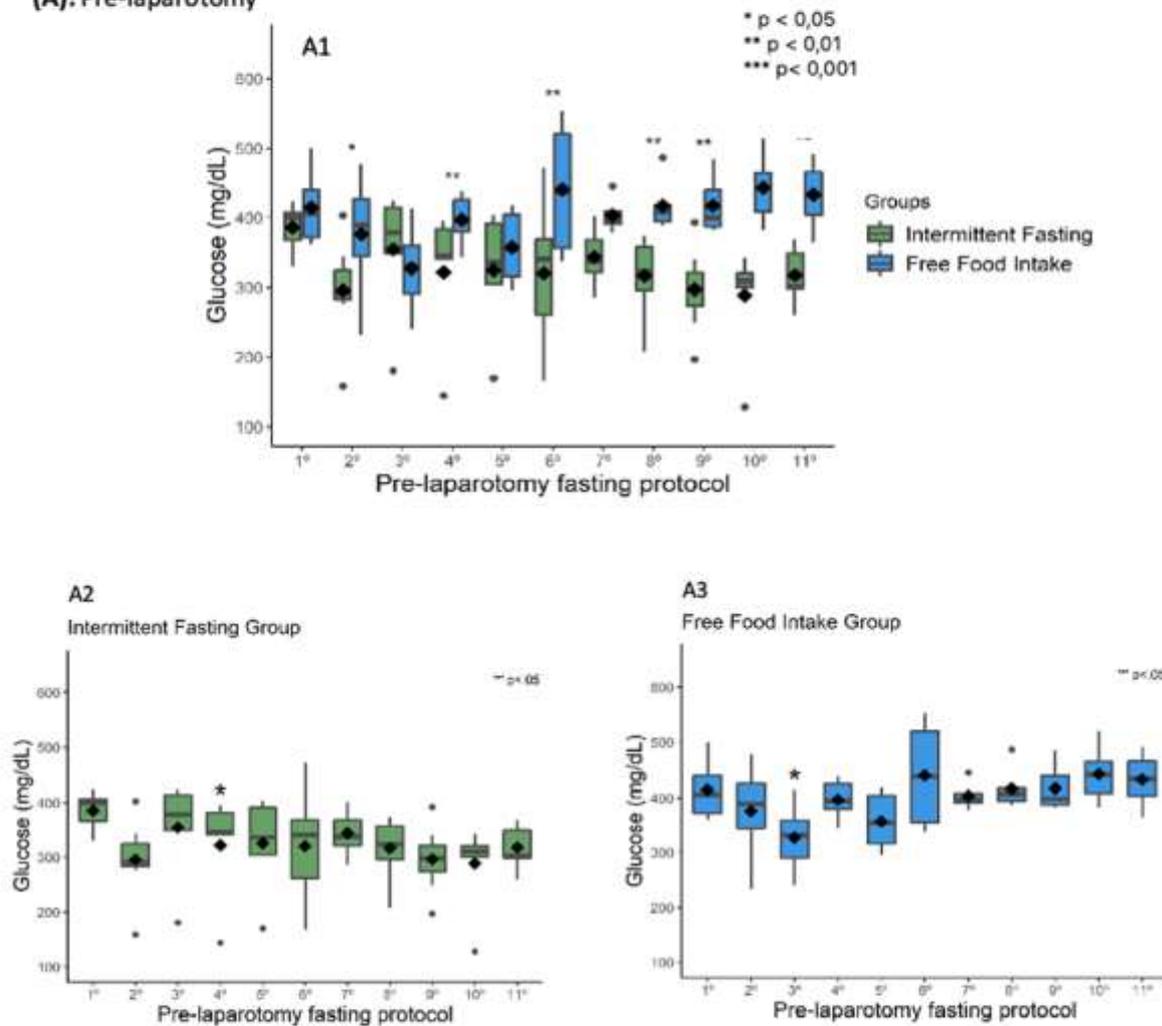


Figure 2. Cont.

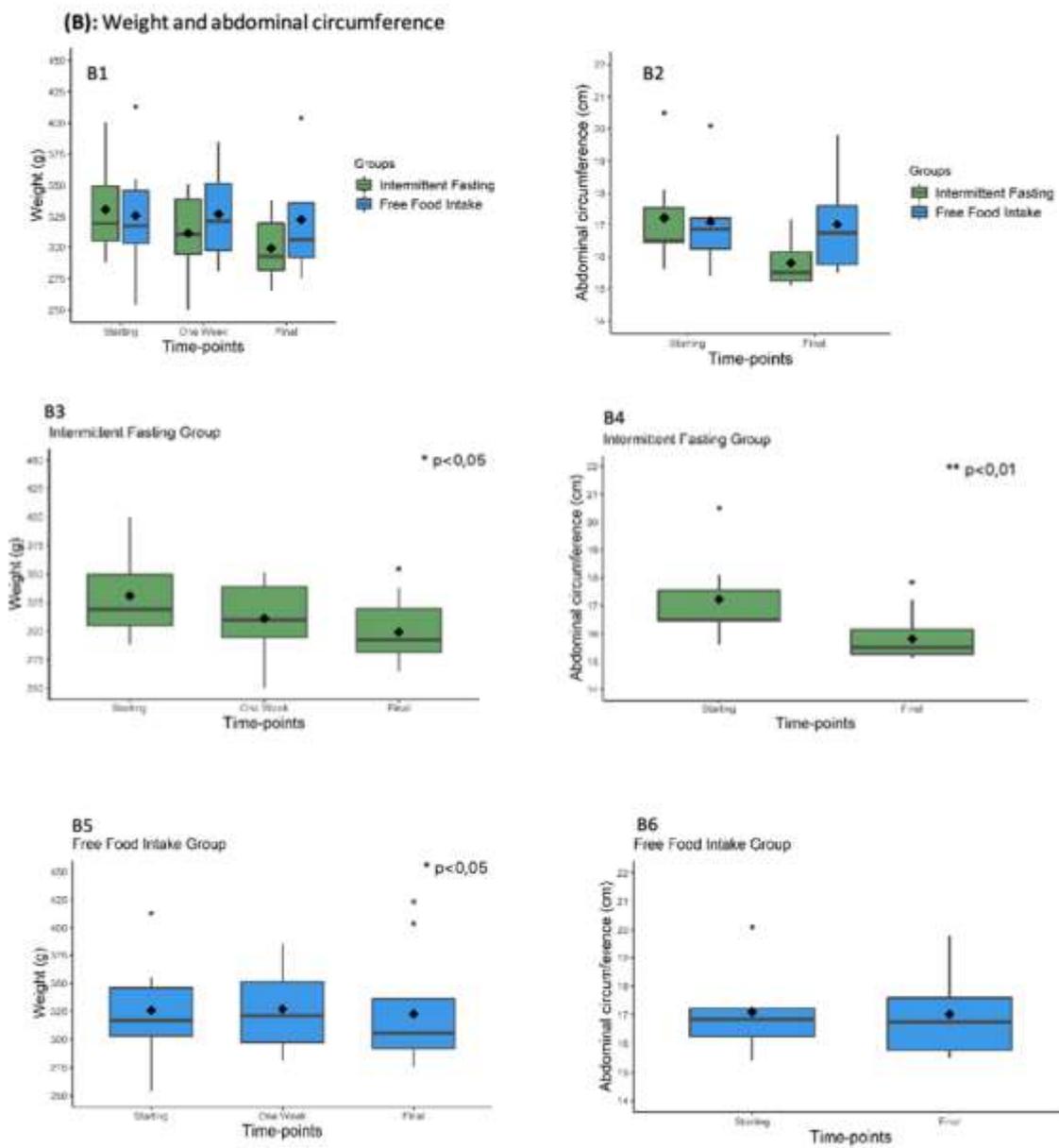


Figure 2. Cont.

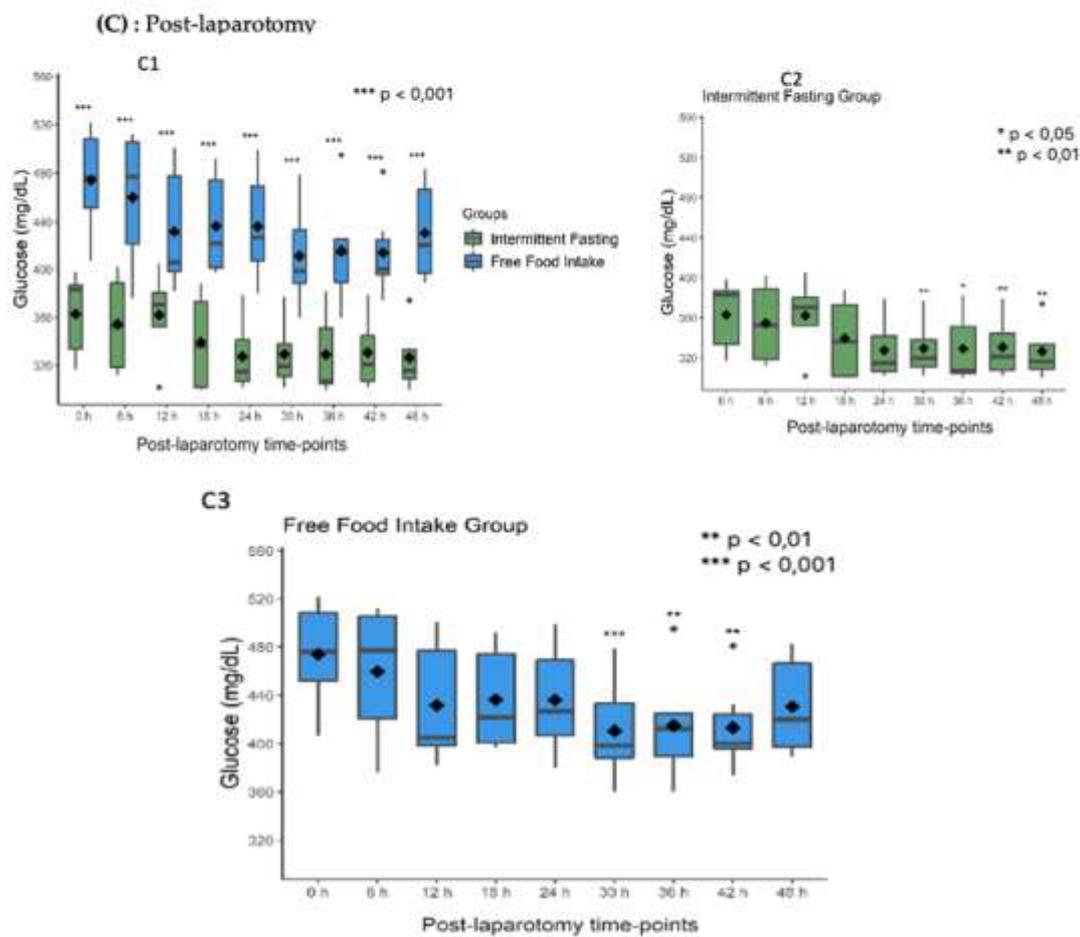


Figure 2. Green represents IF group. Blue represents FF group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. The lower and upper bounds of the box represent the first and third quartiles of the data, respectively; the horizontal line plus space inside the box indicates the median; the diamond indicates the mean; black circles indicate outliers; comparisons were performed by mixed linear models. (A) Pre-laparotomy fasting protocol glucose levels showing comparison between groups (A1) and comparison over time in relation to the first time-point for only intermittent fasting group (A2) and free food intake group (A3). (B) Comparison of the weight and abdominal circumference between groups (B1/B2) and comparison over time in relation to the starting time-point for only intermittent fasting group (B3/B4) and free food intake group (B5/B6). (C) Post-laparotomy fasting protocol glucose levels showing comparison between groups (C1) and comparison over time in relation to the first time-point for only the intermittent fasting group (C2) and free food intake group (C3).

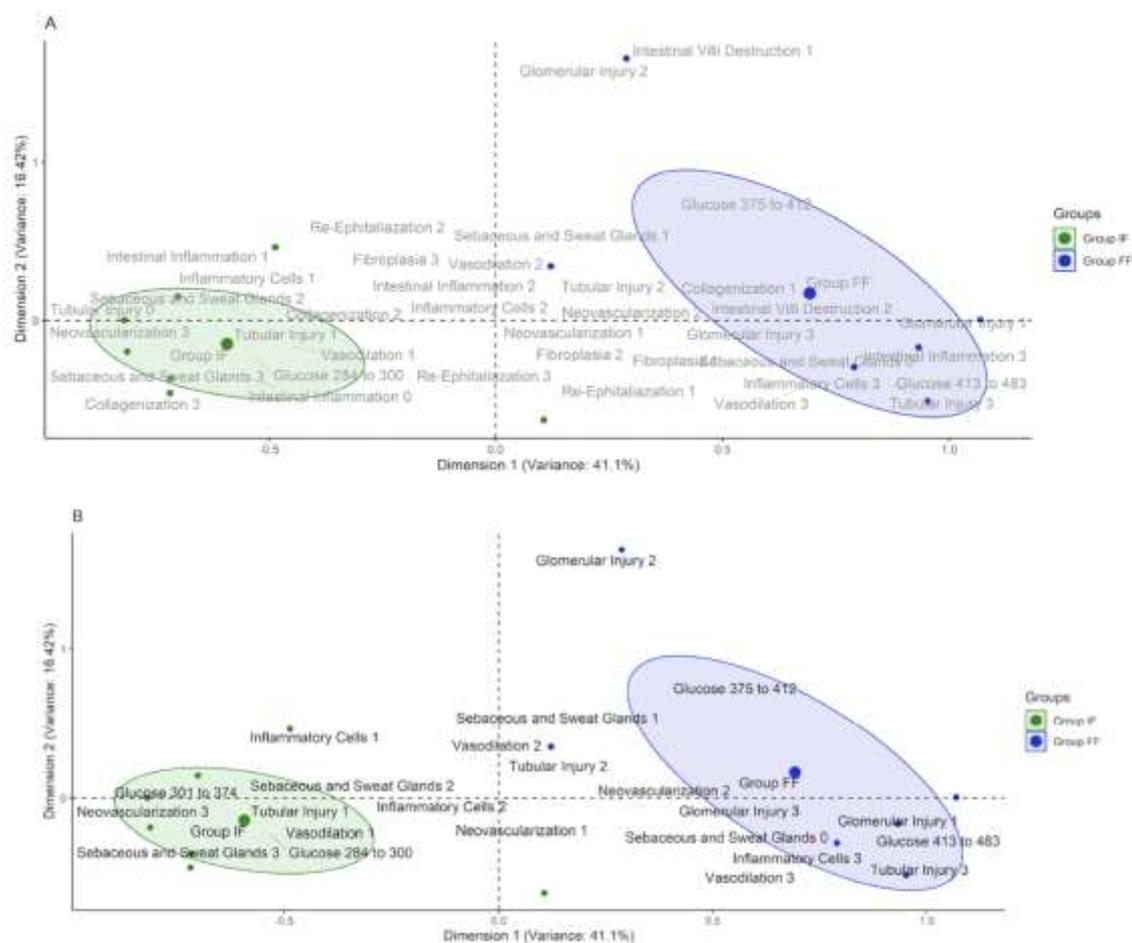
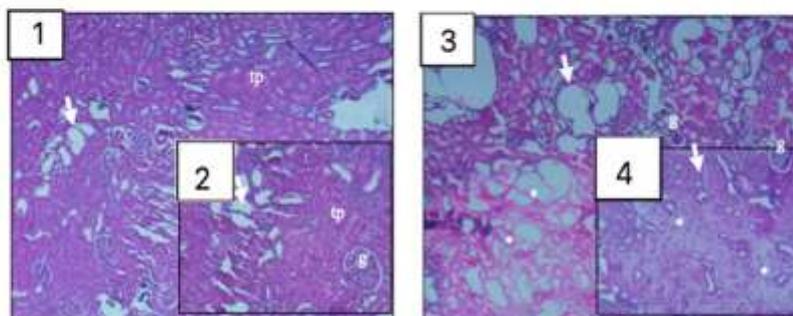


Figure 3. Perceptual map of the first and second dimensions of the multiple correspondence analysis with the qualitative findings of histopathology, experimental groups and glucose classes. In (A), all the qualitative variables applied in the analysis are presented, and in figure (B) only those with interdependencies by the chi-square test.

(A)



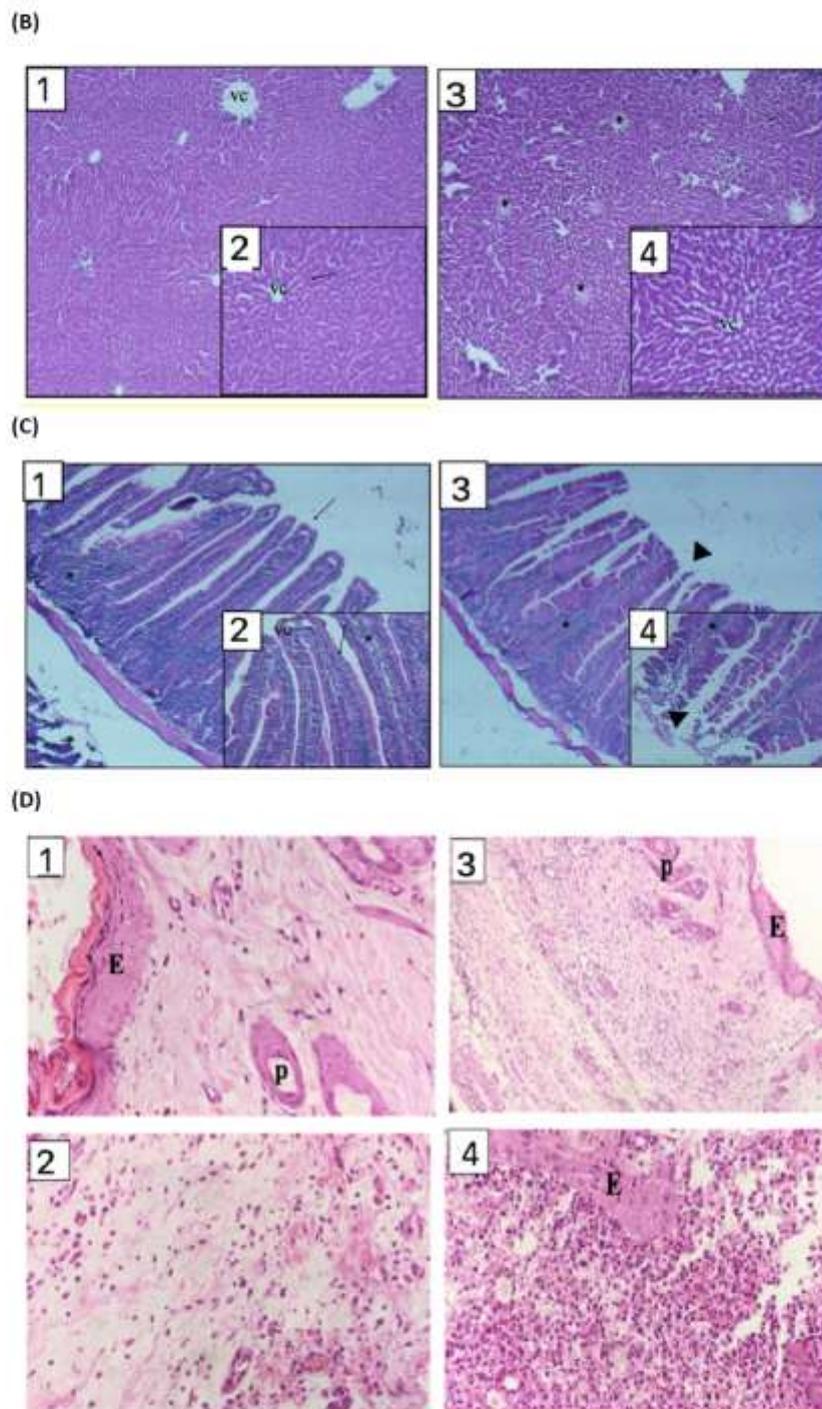


Figure 3. Box 1;2 represents IF group while Box 3;4 represents FF group. (A)—Kidney: tp: proximal tube; g: glomerulus; arrows: tubular damage; *: proximal and distal tubular damage. (B)—Liver: vc: centrilobular vein; arrows: hepatocytes; *: necrosis. (C)—Duodenal segment: arrows: intestinal villi; *: inflammatory cells. (D)—Operative Wound: E: epithelium; p: hair follicles.

4. Discussion

In this study, we demonstrated that IF before surgery remarkably reduced the levels of blood glucose in diabetic rats in the perioperative period, mainly with better stabilization of the glycemic curve in the post-operative period comparing with the FF group. It is also important to say that the animals did not have any important hypoglycemia during the fasting protocol in the IF group.

Our findings in this surgical field are in agreement with numerous previous studies demonstrating that IF is a beneficial intervention in diabetes. The mechanisms shown in the preceding research could explain our perioperative glucose results: IF improves insulin sensitivity with less deterioration of pancreatic islets and reconstructed gut microbiota with bacteria correlated with better glucose control [21–23]. Since surgery is an aggression to homeostasis and could bring difficulty to glucose control, IF could be a protection against surgical trauma since it increases cellular stress resistance [24] and improves metabolic flexibility [25]. In diabetic-induced rats in the previous analysis, IF improved glucose tolerance, increased plasma insulin and improved β -cell mass [26]. The adoptive stress response of IF includes prevention of inflammation, better handling of oxidative stress and formation of more mitochondria [27].

In addition to all the metabolic benefits of IF, especially in glucose metabolism, studies have shown secondary advantages that could be interesting for the physicians in the perioperative period. In pain, IF enhanced morphine-induced antinociception while mitigating tolerance and constipation in mice [28]. Another potential benefit is the cognitive function that could ameliorate against distress [29]. In general body weight in intermittently fasted rats is usually lower than their ad libitum fed counterparts, but in our study both groups lost weight and the difference was not statistically significant. However only in the IF group there was a reduction in abdominal circumference ($p < 0.05$) [30].

In our histological findings we investigated the IF effect on wound healing, kidney, liver and duodenal bowel damage after surgical trauma. In our results, shown on the perceptual map, less renal impairment was close to the ellipse of IF with rats with better glucose control compared with higher levels, with significant interdependency of moderate tubular damage on the third quartile of glucose, represented by the FF group. The same occurred with wound-healing parameters with better healing status close to IF ellipse comparing with FF. Furthermore, there was significant interdependency of neovascularization and presence of sebaceous and sweat glands on the wound-healing process. It is difficult to say that these results are due to IF or to the better glucose control promoted by the fasting; however, both are very intertwined. It is clear that individuals with better glucose control have better healing outcomes [31]. We conjecture that the results from both have synergy, since during in vitro studies fasting enhanced endothelial angiogenesis brought activation of SMOC1 and SCG2, facilitating neovascularization and wound healing [32].

Renal impairment is always worrisome in the perioperative period. Our diabetic kidney finding after laparotomy followed the same path of previous studies where IF protected against tubular damage in induced ischemia–reperfusion injury. This points out that IF could be a nutrition protection promoting renal endurance against injury after surgical trauma [33,34]. In our study it is not clear if this result is because only of IF or the better glucose control was promoted by it, or both.

Another concern of the researchers was the increase in liver steatosis in the perioperative period. Fortunately, there was no interdependency between groups, with no increase in steatosis or liver damage in both groups. It is important to point out that in previous studies IF promoted reduction of steatosis and inflammation in high fed fat or fructose mice [35]. Unfortunately, our bowel results did not show important interdependence in villi destruction and inflammation.

Our study has several limitations. First, we did not investigate if the mechanisms behind our findings were the same that IF promoted in other conditions in experimental studies. We speculate that IF in the perioperative period targets the same multiple pathophysiological mechanisms of protection as shown in ischemia–reperfusion injuries

studies, such as preservation of mitochondrial homeostasis, conservation of redox status, suppressing endoplasmic reticulum stress and abrogated signaling pathways (ERK1/2 and mTOR) [36]. Another potential limitation is that we did not investigate the functionality of the organs, we only assessed the morphology status to compare and elucidate histological findings in possible damage and the effect in the surgical wound. Furthermore, our most important limitation is that we could not dissociate whether the histological results are due to IF or to the better glucose promoted by it, or both. Hence, perioperative organ injury is always a concern to perioperative physicians, and there is no specific pharmacological therapy proven effective in the prevention of the damage [37]. This study of IF before laparotomy could guide new studies to confirm the mechanisms and benefits of IF in the surgical field.

5. Conclusions

In this study, we demonstrated that glucose control in diabetic rats is ameliorated in the perioperative period with intermittent fasting, with less renal impairment and better surgical wound healing. Human testing will be required in further studies since IF may be a new resource to improve organism endurance to surgical stress, especially in diabetic subjects.

Author Contributions: Conceptualisation, A.K.W.H. and N.S.P.M.; methodology and formal analysis, A.K.W.H., S.S.R., M.D.B. and F.M.; resources, N.S.P.M. and P.d.N.J.; supervision, N.S.P.M. and P.d.N.J.; project administration, A.K.W.H.; funding acquisition, N.S.P.M. and P.d.N.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by UNESP Botucatu—Department Anesthesiology.

Institutional Review Board Statement: The Animal Ethics Committee of URI ERECHIM University approved all experimental protocols on rats. This committee operates under the guidelines of Brazilian Law animal research.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Crupi, A.N.; Haase, J.; Brandhorst, S.; Longo, V.D. Periodic and Intermittent Fasting in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Curr. Diab. Rep.* **2020**, *20*, 83. [\[CrossRef\]](#)
2. de Cabo, R.; Mattson, M.P. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2541–2551, Erratum in **2020**, *382*, 978. [\[CrossRef\]](#)
3. Okoshi, K.; Cezar, M.D.M.; Polin, M.A.M.; Paladino, J.R., Jr.; Martinez, P.F.; Oliveira, S.A., Jr.; Lima, A.R.R.; Damatto, R.L.; Paiva, S.A.R.; Zornoff, L.A.M.; et al. Influence of intermittent fasting on myocardial infarction-induced cardiac remodeling. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2019**, *19*, 126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Fann, D.Y.; Ng, G.Y.; Poh, L.; Arumugam, T.V. Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke. *Exp. Gerontol.* **2017**, *89*, 93–102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Zhao, X.; Yang, J.; Huang, R.; Guo, M.; Zhou, Y.; Xu, L. The role and its mechanism of intermittent fasting in tumors: Friend or foe? *Cancer Biol. Med.* **2021**, *18*, 63–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Nencioni, A.; Caffa, L.; Cortellino, S.; Longo, V.D. Fasting and cancer: Molecular mechanisms and clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 707–719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Cheng, C.W.; Villani, V.; Buono, R.; Wei, M.; Kumar, S.; Yilmaz, O.H.; Cohen, P.; Sneddon, J.B.; Perin, L.; Longo, V.D. Fasting-mimicking diet promotes Ngn3-driven β -cell regeneration to reverse diabetes. *Cell* **2017**, *168*, 775–788.e12. [\[CrossRef\]](#)
8. Liu, H.; Javaheri, A.; Godar, R.J.; Murphy, J.; Ma, X.; Rohatgi, N.; Mahadevan, J.; Hyrc, K.; Saftig, P.; Marshall, C.; et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy* **2017**, *13*, 1952–1968. [\[CrossRef\]](#)
9. Beli, E.; Yan, Y.; Moldovan, L.; Vieira, C.P.; Gao, R.; Duan, Y.; Prasad, R.; Bhatwadekar, A.; White, F.A.; Townsend, S.D.; et al. Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in *db/db* Mice. *Diabetes* **2018**, *67*, 1867–1879. [\[CrossRef\]](#)

10. Furmli, S.; Elmasry, R.; Ramos, M.; Fung, J. Therapeutic use of intermittent fasting for people with type 2 diabetes as an alternative to insulin. *BMJ Case Rep.* **2018**, *2018*. [CrossRef] [PubMed]
11. Muñoz-Hernández, L.; Márquez-López, Z.; Mehta, R.; Aguilar-Salinas, C.A. Intermittent Fasting as Part of the Management for T2DM: From Animal Models to Human Clinical Studies. *Curr. Diab. Rep.* **2020**, *20*, 13. [CrossRef]
12. Mauro, C.R.; Tao, M.; Yu, P.; Treviño-Villerreal, J.H.; Longchamp, A.; Kristal, B.S.; Ozaki, C.K.; Mitchell, J.R. Preoperative dietary restriction reduces intimal hyperplasia and protects from ischemia-reperfusion injury. *J. Vasc. Surg.* **2016**, *63*, 500–509.e1. [CrossRef]
13. Verweij, M.; van Ginhoven, T.M.; Mitchell, J.R.; Sluiter, W.; van den Engel, S.; Roest, H.P.; Torabi, E.; Ijzermans, J.N.; Hoeijmakers, J.H.; de Bruin, R.W. Preoperative fasting protects mice against hepatic ischemia/reperfusion injury: Mechanisms and effects on liver regeneration. *Liver Transpl.* **2011**, *17*, 695–704. [CrossRef] [PubMed]
14. Mitchell, J.R.; Verweij, M.; Brand, K.; van de Ven, M.; Goemaere, N.; van den Engel, S.; Chu, T.; Forrer, F.; Müller, C.; de Jong, M.; et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Ageing Cell* **2010**, *9*, 40–53. [CrossRef]
15. Zaidi, S.O.; Khan, Y.; Razak, B.S.; Malik, B.H. Insight Into the Perioperative Management of Type 2 Diabetes. *Cureus* **2020**, *12*, e6878. [CrossRef] [PubMed]
16. Kuzulugil, D.; Papeix, G.; Luu, J.; Kerridge, R.K. Recent advances in diabetes treatments and their perioperative implications. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **2019**, *32*, 398–404. [CrossRef]
17. Marques, R.G.; Morales, M.M.; Petroianu, A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir. Bras.* **2009**, *24*, 69–74. [CrossRef]
18. Radenković, M.; Stojanović, M.; Prostran, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *78*, 13–31. [CrossRef] [PubMed]
19. Robertson, D.G.; Ruepp, S.U.; Stryker, S.A.; Hnatyshyn, S.Y.; Shipkova, P.A.; Aranibar, N.; Mcnaney, C.A.; Fiehn, O.; Reilly, M.D. Metabolomic and transcriptomic changes induced by overnight (16 h) fasting in male and female Sprague-Dawley rats. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 481–487. [CrossRef]
20. Belkacemi, L.; Selselet-Attou, G.; Louchami, K.; Sener, A.; Malaisse, W.J. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. In vivo investigations. *Int. J. Mol. Med.* **2010**, *26*, 759–765. [CrossRef]
21. Belkacemi, L.; Selselet-Attou, G.; Bulur, N.; Louchami, K.; Sener, A.; Malaisse, W.J. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. III. Post-mortem investigations. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *27*, 95–102. [CrossRef]
22. Wei, S.; Han, R.; Zhao, J.; Wang, S.; Huang, M.; Wang, Y.; Chen, Y. Intermittent administration of a fasting-mimicking diet intervenes in diabetes progression, restores β cells and reconstructs gut microbiota in mice. *Nutr. Metab.* **2018**, *15*, 80. [CrossRef]
23. Wei, S.; Zhao, J.; Bai, M.; Li, C.; Zhang, L.; Chen, Y. Comparison of glycemic improvement between intermittent calorie restriction and continuous calorie restriction in diabetic mice. *Nutr. Metab.* **2019**, *16*, 60. [CrossRef]
24. Mattson, M.P.; Wan, R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 129–137. [CrossRef]
25. Dedual, M.A.; Wueest, S.; Borsigova, M.; Konrad, D. Intermittent fasting improves metabolic flexibility in short-term high-fat diet-fed mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**, *317*, E773–E782. [CrossRef]
26. Belkacemi, L.; Selselet-Attou, G.; Hupkens, E.; Nguidjoe, E.; Louchami, K.; Sener, A.; Malaisse, W.J. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. *Int. J. Endocrinol.* **2012**, *2012*, 962012. [CrossRef]
27. Vemuganti, R.; Arumugam, T.V. Molecular Mechanisms of Intermittent Fasting-induced Ischemic Tolerance. *Cond. Med.* **2020**, *3*, 9–17.
28. Duron, D.I.; Hanak, F.; Streicher, J.M. Daily intermittent fasting in mice enhances morphine-induced antinociception while mitigating reward, tolerance, and constipation. *Pain* **2020**, *161*, 2353–2363. [CrossRef]
29. Shojaie, M.; Ghanbari, F.; Shojaie, N. Intermittent fasting could ameliorate cognitive function against distress by regulation of inflammatory response pathway. *J. Adv. Res.* **2017**, *8*, 697–701. [CrossRef]
30. Ma, J.; Cheng, Y.; Su, Q.; Ai, W.; Gong, L.; Wang, Y.; Li, L.; Ma, Z.; Pan, Q.; Qiao, Z.; et al. Effects of intermittent fasting on liver physiology and metabolism in mice. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 950. [CrossRef]
31. Patel, S.; Srivastava, S.; Singh, M.R.; Singh, D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *112*, 108615. [CrossRef] [PubMed]
32. Luo, M.J.; Rao, S.S.; Tan, Y.J.; Yin, H.; Hu, X.K.; Zhang, Y.; Liu, Y.W.; Yue, T.; Chen, L.J.; Li, L.; et al. Fasting before or after wound injury accelerates wound healing through the activation of pro-angiogenic SMO1 and SCG2. *Thrombostics* **2020**, *10*, 3779–3792. [CrossRef] [PubMed]
33. Rojas-Morales, P.; León-Contreras, J.C.; Aparicio-Trejo, O.E.; Reyes-Ocampo, J.G.; Medina-Campos, O.N.; Jiménez-Osorio, A.S.; González-Reyes, S.; Marquina-Castillo, B.; Hernández-Pando, R.; Barrera-Oviedo, D.; et al. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *135*, 60–67. [CrossRef]
34. Saat, T.C.; van der Pluijm, I.; Ridwan, Y.; van Damme-van den Engel, S.; van Heijningen, P.M.; Clahsen-van Groningen, M.C.; Verhagen, H.J.M.; Ijzermans, J.N.M.; Essers, J.; de Bruin, R.W.F. Pre-Operative Fasting Provides Long Term Protection Against Chronic Renal Damage Induced by Ischaemia Reperfusion Injury in Wild Type and Aneurysm Prone Fibulin-4 Mice. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2020**, *60*, 905–915. [CrossRef]

35. Marinho, T.S.; Ornellas, E.; Barbosa-da-Silva, S.; Mandarim-de-Lacerda, C.A.; Aguilá, M.B. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition* **2019**, *65*, 103–112. [[CrossRef](#)]
36. Rojas-Morales, P.; Tapia, E.; León-Contreras, J.C.; González-Reyes, S.; Jiménez-Osorio, A.S.; Trujillo, J.; Pavón, N.; Granados-Pineda, J.; Hernández-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; et al. Mechanisms of Fasting-Mediated Protection against Renal Injury and Fibrosis Development after Ischemic Acute Kidney Injury. *Biomolecules* **2019**, *9*, 404. [[CrossRef](#)]
37. Conrad, C.; Eltzschig, H.K. Disease Mechanisms of Perioperative Organ Injury. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1730–1750. [[CrossRef](#)]