



## EFEITOS DO JEJUM ASSOCIADO AO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO KLF15 E PROCESSO “BROWNING” DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

**Palavras-Chave:** jejum, exercício físico, *browning*

**Autor:**

**Rafael Lima Junqueira FCA – UNICAMP**

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Rodrigo Pauli FCA – UNICAMP**

### INTRODUÇÃO:

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem alertado sobre o impacto negativo da ingestão alimentar inadequada e inatividade física sobre a saúde metabólica e desenvolvimento de obesidade em grande parte do planeta. O número de pessoas obesas quase triplicou entre os anos de 1975 e 2016 e atinge atualmente 13% da população mundial <sup>1</sup>. A obesidade tem etiologia complexa e multifatorial, caracterizada por um balanço energético positivo e acúmulo excessivo de gordura corporal que está associada a diversas doenças como diabetes do tipo 2, hipertensão, dislipidemias, alguns tipos de câncer, entre outras <sup>2</sup>.

Neste cenário, surge a necessidade de expandir e aprofundar o conhecimento sobre os efeitos de intervenções não farmacológicas e que são de fácil acessibilidade as pessoas para tentar minimizar os impactos da obesidade. Dentre as intervenções com potencial para isso, há o jejum intermitente e o exercício físico, que em geral são realizados de maneira isoladas para atenuar os efeitos deletérios do excesso de adiposidade corporal <sup>3,4</sup>.

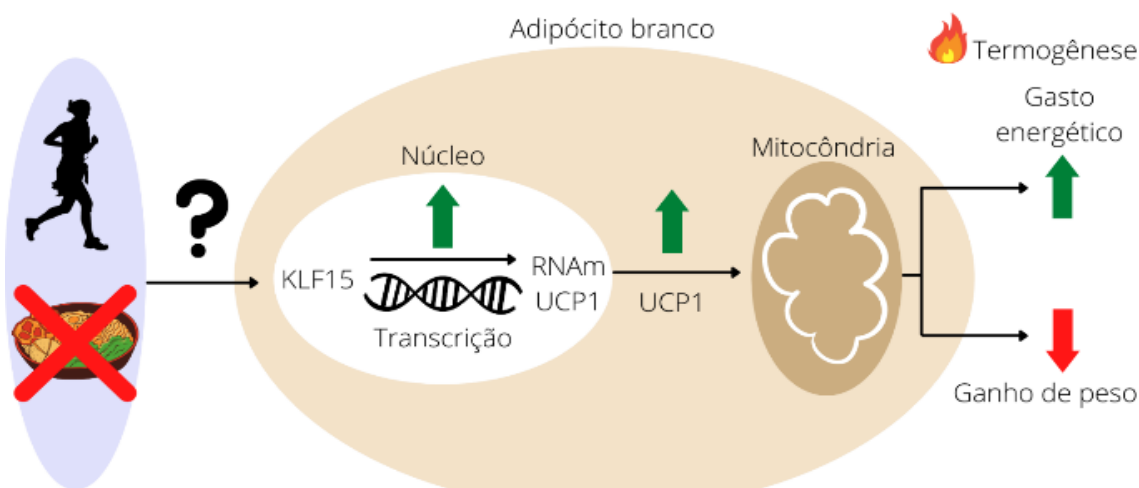
Atualmente, tem sido aplicado o jejum intermitente com diferentes períodos de acesso e restrição alimentar, com variação mais curta de 8 horas de jejum por dia, até períodos mais prolongados de jejum entre 24-36 h. O objetivo de aplicar uma restrição de tempo alimentar vai desde aumentar a utilização de gordura como fonte de energia (jejum mais curtos de 8-16 h), como também, induzir processos de autofagia e aumento da produção de corpos cetônicos (jejum mais longos acima de 24 h) no organismo. As evidências de modo geral demonstram que essa prática de realizar o jejum intermitente pode prover benefícios a saúde metabólica e diminuir os efeitos da obesidade <sup>5,6</sup>.

Além disso, a realização do exercício físico tem implicações positivas sobre o organismo, elevando o gasto energético e favorecendo o aumento do músculo esquelético <sup>7</sup>. Tanto durante o exercício como após o esforço o aumento do gasto energético pode positivamente contribuir para o déficit energético. Ademais, a melhora na capacidade oxidativa do músculo favorece a utilização de gordura como substrato energético favorecendo o emagrecimento a médio e longo prazo <sup>8</sup>. Mediante estes efeitos benéficos que podem ser obtidos através do jejum intermitente e exercício físico, as pesquisas tem se expandido nas análises dessas intervenções sobre outros tecidos do corpo. Dentre eles, destaca-se o papel do tecido adiposo marrom (TAM) e o processo de begeamento

(*Browning*) observado no tecido adiposo branco (TAB) que influencia no processo de termogênese e gasto energético do organismo <sup>9,10</sup>.

O TAM e o TAB exprimem funções diferentes no corpo, o primeiro tem uma função importante de termogênese e de manutenção da homeostase energética com maior capacidade de expressão de genes de proteínas envolvidas no processo de lipólise, já o TAB tem função de estoque de energia em forma de gordura <sup>10</sup>. A função termogênica do tecido adiposo marrom é ativada através da ação da proteína desacopladora 1 (do inglês, *Uncoupling protein 1 - UCP1*) mitocondrial, uma importante proteína que gera calor por meio da dissociação da respiração celular da produção de adenosina trifosfato (ATP) na membrana interna da mitocôndria, porém essa característica de produção de calor também pode ser observada no TAB em situações específicas, como por exemplo: exercício e em alguns casos sob privação de nutrientes ou exposição ao frio, e isso acontece por conta do processo *Browning* <sup>9</sup>.

Portanto, compreender novos mecanismos de regulação do processo *browning* do TAB se torna relevante na perspectiva de criação de novos alvos para combater a obesidade. Estudo recente demonstrou evidências de que proteína 15 similar a Kruppel (do inglês, *Krüppel-like factors - KLF15*) participa do processo *browning do TAB* <sup>11</sup>. Sua relação com o *browning* foi estabelecida pela ligação encontrada entre KLF15 e a região promotora da UCP1 servindo como fator de transcrição para UCP1 e um dos marcadores importantes do processo *Browning* <sup>10,11</sup>.



**Figura 1.** Figura ilustrativa da hipótese da presente proposta de pesquisa com a sinalização molecular e mecanismo de indução do processo *browning* do tecido adiposo branco através das intervenções jejum intermitente e exercício físico. UCP-1, proteína desacopladora 1 (do inglês, Uncoupling protein 1); KLF15, proteína 15 similar a Kruppel (do inglês, Krüppel-like factors).

Em um estudo feito com roedores, foi observado que oito semanas de jejum intermitente (JI) foi capaz de induzir um aumento nos níveis da proteína UCP1<sup>12</sup>, a respeito do fator de transcrição KLF15, foi encontrado um significativo aumento da proteína durante a condição de jejum prolongado (48 horas)<sup>13</sup>. Com relação aos efeitos do exercício sobre o processo *browning*, alguns achados demonstraram que exercício crônico promove o *browning* do TAB<sup>14</sup>, porém ainda não é claro os efeitos do exercício físico sobre a KLF15. Deste modo, embora se saiba que tanto o jejum quanto o exercício físico contribuem para redução da adiposidade, o impacto do jejum isoladamente ou combinado com o exercício físico sobre a proteína KLF15 não está totalmente esclarecido. Portanto, o intuito da presente proposta de pesquisa foi investigar os efeitos do jejum e do jejum associado ao exercício físico sobre o fator de transcrição KLF15 no processo *browning* do tecido adiposo branco de camundongos. A figura 1, ilustra a via de sinalização molecular de interesse de investigação dessa presente proposta de pesquisa.

## METODOLOGIA:

### Animais experimentais e procedimentos éticos

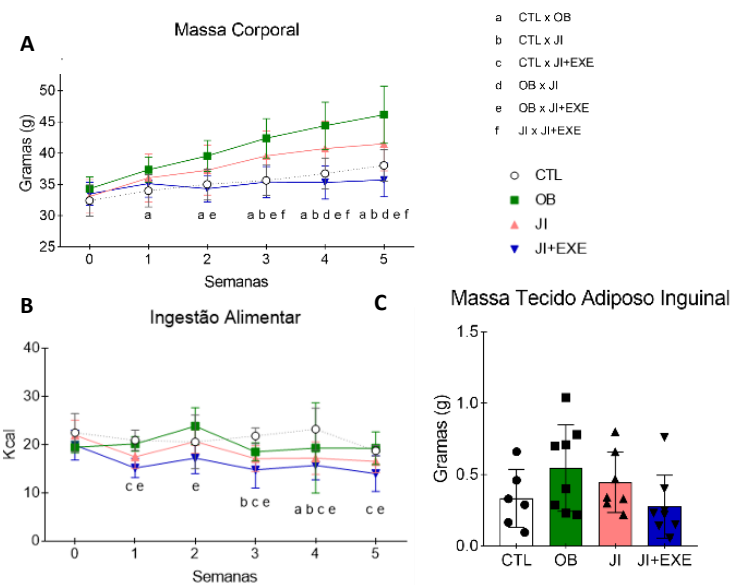
Foram utilizados camundongos *Swiss* com 4 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIBE). Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). Todos os protocolos experimentais foram submetidos à anuência da Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP – Campinas-SP e aprovados (processo n° 4175-1/2019/5185-1(A)/2020). Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob as condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso à água e ração convencional ou hiperlipídica<sup>15</sup>, salvo àqueles sob condição de experimentação.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo denominado controle, constituído de animais que receberam dieta convencional para roedores durante 5 semanas (CTL);
2. Grupo denominado obeso, constituído de animais que receberam dieta hiperlipídica para roedores durante 5 semanas (OB);
3. Grupo denominado obeso jejum intermitente, constituído de animais que receberam dieta hiperlipídica para roedores durante 5 semanas, no entanto, a dieta foi oferecida somente por um período de 8 horas (JI);
4. Grupo denominando obeso jejum intermitente exercitado, constituído de animais que receberam dieta hiperlipídica para roedores durante 5 semanas, no entanto, a dieta foi oferecida somente por um período de 8 horas e também foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio de corrida (JI+EXE) no mesmo período.

Sendo que os animais tiveram acesso ao alimento entre 5 horas após as luzes apagarem e 1 hora após acenderem. Dessa forma, esses animais realizaram ciclos de estado de jejum/alimentado de 16/8 horas/dia.

### Protocolo de exercício físico aeróbio



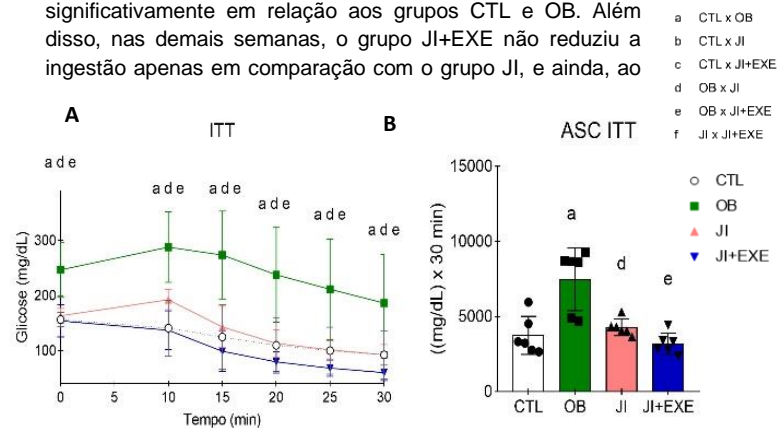
dois grupos. Para análises envolvendo mais de dois grupos, foi utilizado o teste de “Análise de Variância (ANOVA)” ou “Kruskal Wallis”, seguido do teste de Bonferroni. A significância estatística adotada foi de  $p < 0.05$ . O programa “GraphPad Prism 6.0” foi empregado para efetuar as análises e elaborar os gráficos.

## RESULTADOS:

### Jejum intermitente associado ao exercício físico foi mais eficiente em atenuar o ganho de peso corporal e em aumentar a sensibilidade à insulina nos camundongos.

A partir da primeira semana da etapa experimental, o grupo OB exibiu um aumento significativo da massa corporal total em relação ao grupo CTL, e a diferença entre esses dois grupos se manteve até a oitava semana. Da segunda semana em diante, o grupo OB apresentou um aumento significativo no ganho de massa corporal em comparação ao grupo JI+EXE. O grupo CTL apresentou um aumento no ganho de massa corporal maior do que o grupo JI na terceira semana, assim como o grupo OB diferiu significativamente do grupo JI+EXE, e, curiosamente o grupo JI também exibiu diferença significativa em comparação ao grupo JI+EXE. Na quarta e quinta semana, além das diferenças supracitadas, o grupo OB apresentou maior ganho de massa corporal do que o grupo JI (Fig. 2A).

Nas análises de ingestão alimentar, na primeira, terceira e quinta semana o grupo JI+EXE diminuiu a ingestão significativamente em relação aos grupos CTL e OB. Além disso, nas demais semanas, o grupo JI+EXE não reduziu a ingestão apenas em comparação com o grupo JI, e ainda, ao



**Figura 3.** A, curva do teste de tolerância a insulina; B área sob a curva do teste de tolerância a insulina; (n = 6). Significância adotada de  $p < 0,05$ .

longo de todo experimento, exibiu uma leve tendência a queda de ingestão alimentar (Fig. 2B).

**Figura 2.** A, evolução da massa corporal por semana; B, peso do resto da ração dos animais analisado por semana; C, massa do tecido adiposo; (n = 6-14). Significância adotada de  $p < 0,05$ .

Foi realizada uma adaptação dos animais em esteira rolante para camundongos, em seguida foi realizado teste para determinar a velocidade máxima dos animais, para então iniciar o treinamento. Tanto a adaptação, quanto o teste e o treinamento foram realizados de acordo com estudo prévio <sup>16</sup>.

### Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (TTIip)

O teste de tolerância à insulina foi realizado conforme descrito em estudo prévio <sup>17</sup>. A glicose plasmática t1/2 foi calculada a partir da inclinação da última análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear <sup>18</sup>.

### Análise de ingestão alimentar

Foi realizado o controle de ingestão alimentar semanalmente pesando o resto da ração dos animais em balança de precisão.

### Immunoblot

Foram realizados ensaios de imunoblot e análise do tecido adiposo branco de acordo com estudo prévio <sup>16</sup>. Os anticorpos usados para imunoblotting foram: anti-KLF15, anti-UCP1 e anti- $\beta$ -actina (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

### Análise histológica dos cortes pelo método da hematoxilina e eosina (HE)

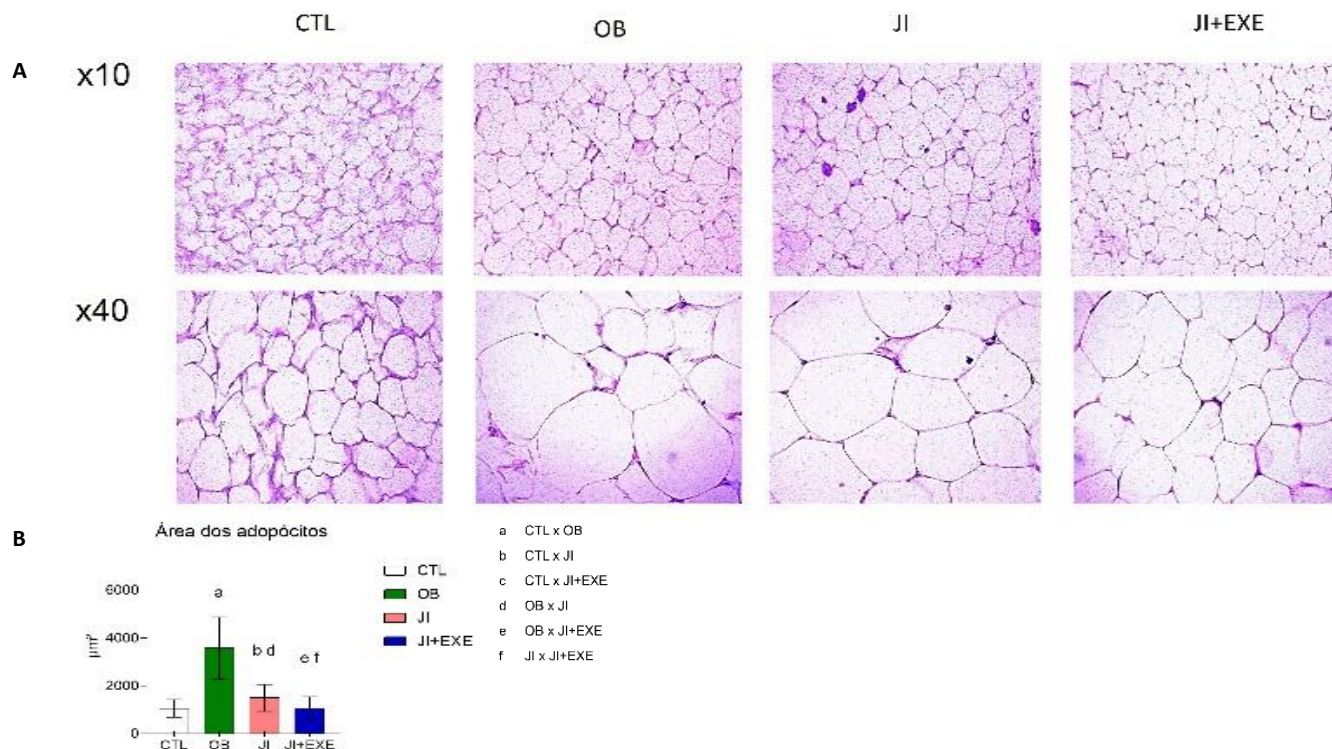
Para análise histológica, o tecido adiposo foi fixado em formaldeído a 4% e incorporado em parafina. Secções de tecido adiposo branco inguinal embutidas em parafina (5  $\mu$ m de espessura) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

### Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Os resultados das proteínas obtidas através de imunoblotting foram apresentados como comparações diretas das bandas proteicas em fotodocumentador, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa Un-Scan-It Gel 6.1®. Para a análise estatística foi testada a normalidade dos dados e posteriormente foi realizado o teste “t de Student” ou “Mann-Whitney” quando comparados

Em relação a massa do tecido adiposo inguinal, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos, houve maior tendência no grupo OB de aumento e no grupo JI+EXE de diminuição de massa (Fig. 2C).

x10, foi observado que o grupo obeso apresentou maiores adipócitos em comparação com o grupo CTL e JI, enquanto o grupo JI+EXE, apresentou menores adipócitos em relação aos grupos OB e JI (Fig. 4B).



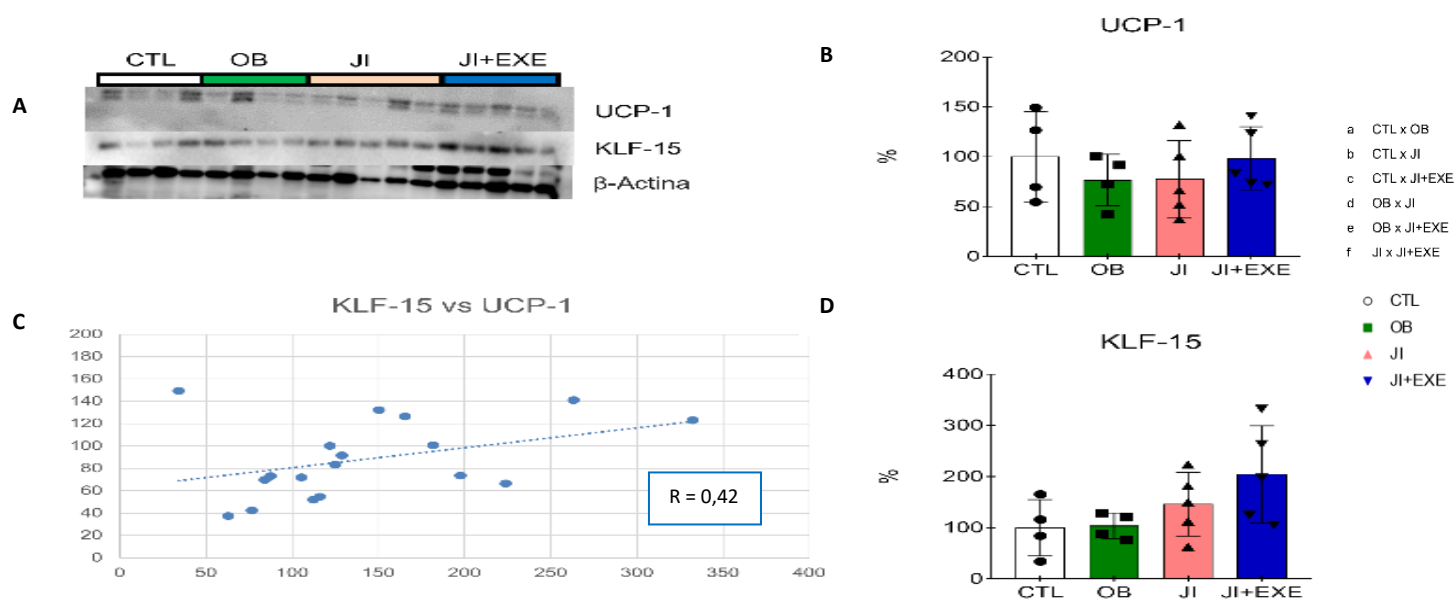
**Figura 4. A**, Imagens histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E); **B**, quantificação da área dos adipócitos em  $\mu\text{m}^2$ . Significância adotada de  $p < 0,05$ .

No teste de tolerância a insulina, a glicemia em jejum do grupo OB foi significativamente maior do que os grupos CTL, JI e JI+EXE, assim como em todos os tempos analisados, por outro lado, ao final do teste de tolerância a glicose, no tempo 120, a curva glicêmica exibiu uma queda mais expressiva do grupo JI em relação ao grupo CTL (Fig. 3A).

A partir da análise histológica, visualizado com ampliação de x10 e x40 (Fig. 5A), e quantificado em ampliação

#### Jejum intermitente associado ao exercício físico não foi capaz de alterar o conteúdo proteico de KLF15, mas aumentou os níveis de UCP-1 no tecido adiposo branco dos camundongos

Níveis de UCP-1 maiores, indicariam maior presença do processo Browning no tecido adiposo branco inguinal, e uma correlação positiva forte com a KLF-15, evidenciaria uma



**Figura 5. A**, níveis das proteínas UCP-1, KLF-15 e  $\beta$ -Actina no tecido adiposo inguinal; **B** e **D**, percentual das proteínas KLF-15 e UCP-1 no tecido adiposo inguinal; **C**, gráfico de correlação (Pearson) entre a KLF-15 e UCP-1; (n = 5-6). Significância adotada de  $p < 0,05$ .



modulação também positiva sobre a UCP-1, porém, foi encontrado um aumento significativo do grupo JI+EXE apenas para os níveis de UCP-1 (Fig. 5B), para a análise de KLF-15 no tecido adiposo branco não foram encontradas diferenças estatísticas para os grupos estudados (Fig. 5D).

## DISCUSSÃO:

A presente proposta de pesquisa procurou explorar os efeitos do jejum intermitente associado ao exercício físico aeróbio sobre a expressão proteica de KLF-15 e UCP-1 no tecido adiposo branco. Durante a fase experimental, foi observado que o JI+EXE foi capaz de prevenir o ganho acentuado de peso corporal total mediante a oferta de uma dieta hiperlipídica e melhorou a sensibilidade à insulina. Esses resultados obtidos corroboram com estudo realizado recentemente que demonstrou que o exercício físico aeróbio teve efeito agonista quando realizado em concomitância com jejum intermitente <sup>16</sup>.

Em relação a ingestão alimentar dos animais, os camundongos do grupo JI se diferenciaram significativamente apenas do grupo controle, enquanto que os animais submetidos ao jejum e ao exercício exibiram uma menor ingestão alimentar em comparação aos demais, indo ao encontro com resultados previamente encontrados <sup>16</sup>. No entanto, experimento realizado comparando animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção com animais submetidos ao jejum e ao jejum concomitante ao exercício físico de alta intensidade, nenhuma diferença significativa foi encontrada em um período de 12 semanas de intervenções <sup>19</sup>. Isso demonstra que mais estudos precisam ser realizados avaliando a ingestão alimentar para verificar se as intervenções com jejum intermitente e exercício aeróbio não impactam na ingestão calórica diária dos camundongos.

Por outro lado, nas análises de peso do tecido adiposo branco inguinal, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Nesse sentido, o que pode explicar a redução da massa corporal total dos animais e a não redução do tecido adiposo na mesma proporção, é a proteólise do músculo esquelético, que é um dos efeitos da privação de nutrientes gerada pelo jejum <sup>20</sup>. No entanto, nesse estudo não fizemos a análise morfológica ou do *turnover* proteico do músculo esquelético dos animais.

No entanto, as análises histológicas mostraram que o jejum e o jejum combinado com o exercício físico foram capazes de proteger os animais da expansão dos adipócitos em comparação aos que não realizaram nenhuma intervenção. Isso demonstra que a combinação destas intervenções pode ser significativa para a prevenção de desenvolvimento da obesidade.

Para as análises de Western Blotting observamos apenas tendência de aumento nos níveis de KLF-15 no tecido adiposo branco nos grupos JI e JI+EXE. Não foi verificado também correlação forte de KLF-15 com os níveis de UCP-1 dos adipócitos analisados. Tais diferenças ao que foi encontrado previamente na literatura pode estar relacionado ao tempo de jejum intermitente aplicado (16/8) e do tipo de exercício aeróbio em que os animais foram submetidos (aeróbio de moderada intensidade) <sup>13</sup>. Nossas análises ocorreram 24 horas após a última sessão de exercício, experimento do tipo tempo-resposta pode ser significativo para compreender se de fato as intervenções propostas nesse estudo não são

suficientes para induzir aumento no conteúdo proteico de KLF-15 e UCP-1 no tecido adiposo branco inguinal. A análise de outras isoformas de KLF-15 podem também agregar informações sobre o papel destes fatores de transcrição sobre a UCP-1 e processo browning do tecido adiposo branco <sup>21</sup>. Em conclusão, nossos achados demonstram que o protocolo de jejum intermitente associado ao exercício físico aeróbio diminuiu os efeitos da obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica sobre o peso corporal e sensibilidade a insulina, no entanto, não foi capaz de alterar os níveis de KLF-15, mas aumentou significativamente a expressão de UCP-1 no adipócito branco de camundongos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Levesque, R. J. R. Obesity and Overweight. *Encycl. Adolesc.* 2561–2565 (2018) doi:10.1007/978-3-319-33228-4\_447.
2. Davoudi, A. & Davoudi, S. Alloimmunization in Thalassemia Patients : New Insight for Healthcare. 1–4 (2017) doi:10.4103/ijpvm.IJPVM.
3. Steig, A. J. *et al.* Exercise reduces appetite and traffics excess nutrients away from energetically efficient pathways of lipid deposition during the early stages of weight regain. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**, (2011).
4. Harrison, S. A. & Day, C. P. RECENT ADVANCES IN CLINICAL PRACTICE BENEFITS OF LIFESTYLE MODIFICATION. **6**, (2007).
5. Zhang, X. *et al.* Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. *Redox Biol.* **32**, 101535 (2020).
6. Moro, T. *et al.* Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *J. Transl. Med.* **14**, 1–10 (2016).
7. Konopka, A. R. & Harber, M. P. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **42**, 53–61 (2014).
8. Fritzen, A. M., Lundsgaard, A. M. & Kiens, B. Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 683–696 (2020).
9. Gavrilova, O. *et al.* Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab.* **26**, 672-685.e4 (2017).
10. Lee, J. H. *et al.* The Role of Adipose Tissue Mitochondria : Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. (2019).
11. Lee, C. G., Rhee, D. K., Kim, B. O., Um, S. H. & Pyo, S. Allicin induces beige-like adipocytes via KLF15 signal cascade. *J. Nutr. Biochem.* **64**, 13–24 (2019).
12. Liu, B. *et al.* Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. **66**, 38–43 (2019).
13. Liu, Y. *et al.* Branched-chain amino acid negatively regulates KLF15 expression via PI3K-AKT pathway. *Front. Physiol.* **8**, 1–9 (2017).
14. Rats, M. The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese.
15. Pauli, R. *et al.* Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **7**, (2012).
16. Vieira, R. F. L. *et al.* Time-restricted feeding combined with aerobic exercise training can prevent weight gain and improve metabolic disorders in mice fed a high-fat diet. *J. Physiol.* **0**, 1–17 (2021).
17. Muñoz, V. R. *et al.* Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* **233**, 4791–4800 (2018).
18. Bonora, E. *et al.* Estimates of In Vivo Insulin Action in Man : Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose Clamp Studies \*. **68**, 374–378 (1989).
19. Wilson, R. A., Deasy, W., Stathis, C. G., Hayes, A. & Cooke, M. B. Intermittent fasting with or without exercise prevents weight gain and improves lipids in diet-induced obese mice. *Nutrients* **10**, (2018).
20. Sandri, M. *et al.* Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. **117**, 399–412 (2004).
21. Yamamoto, K. *et al.* Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 175–180 (2010).