



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Rafael Lima Junqueira

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



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Rafael Lima Junqueira

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

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências do Esporte à
Faculdade de Ciências Aplicadas da
Universidade Estadual de Campinas.

Orientador(a): Prof. Dr. José Rodrigo Pauli
Coorientador: Prof. Me. Vitor Rosetto Muñoz

Limeira
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

J968e Junqueira, Rafael Lima, 1998-
Efeitos do jejum associado ao exercício físico aeróbio sobre a expressão do fator de transcrição KLF15 e processo "browning" do tecido adiposo branco / Rafael Lima Junqueira. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: José Rodrigo Pauli.

Coorientador: Vitor Rosetto Muñoz.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Jejum. 2. Exercícios aeróbios. 3. Metabolismo energético. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Muñoz, Vitor Rosetto, 1993-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Renan Fudoli Lins Vieira

Rafael Calais Gaspar

Data de entrega do trabalho definitivo: 13-12-2021

Autor: Rafael Lima Junqueira

Título: Efeitos do jejum associado ao exercício físico aeróbio sobre o fator de transcrição KLF15 e processo “browning” do tecido adiposo branco.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Me. Vitor Rosetto Munoz – Coorientador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Renan Fudoli Lins Vieira – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof(a). Dr(a). José Rodrigo Pauli (Orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Discorrem-se aqui os agradecimentos aos alunos e professores do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício (LABMEX) que participaram deste projeto e que contribuíram imensamente para sua realização.

JUNQUEIRA, Rafael. Efeitos do jejum associado ao exercício físico aeróbio sobre o fator de transcrição KLF15 e processo “browning” do tecido adiposo branco. 2021. 31. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade estadual de Campinas. Limeira, 2021.

RESUMO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que ocasiona prejuízos à saúde das pessoas acometidas. Assim, estratégias como exercício físico e o jejum intermitente tem sido alvo de investigações na ciência atual por trazer inúmeros benefícios a saúde. Dentre as adaptações positivas promovidas pelo exercício e o jejum, tem se destacado o aumento da capacidade termogênica do tecido adiposo branco através de um processo denominado browning. Essa adaptação induz alterações moleculares que elevam a capacidade oxidativa do tecido adiposo branco, relacionado com aumento do conteúdo da proteína desacopladora 1 (UCP1) mitocondrial, com consequente aumento do gasto calórico do organismo. O fator transcricional 15 similar a Krüppel (KLF15) presente no adipócito parece ser capaz de induzir aumento da expressão de UCP-1. No entanto, ainda não é claro os mecanismos atrelados a essa adaptação no tecido adiposo branco e se pode ser alcançado pelo exercício físico ou pelo jejum intermitente. O presente estudo investigou os efeitos do jejum intermitente associado ou não ao exercício físico aeróbio sobre o eixo KLF15/UCP1 no tecido adiposo branco de camundongos Swiss. Os roedores foram distribuídos nos grupos: controle (CTL) alimentados com dieta padrão; grupo obeso (OB) alimentados com dieta hiperlipídica; grupo jejum intermitente (JI) alimentados com dieta hiperlipídica, com período de jejum de 16 horas diárias; grupo jejum intermitente exercitado (JI+EXE), alimentados com dieta hiperlipídica, com período de jejum de 16 horas diárias e exercitados no mesmo período. O experimento teve duração total de 5 semanas. O protocolo de exercício físico aeróbio foi de corrida em esteira ergométrica, duração de 60 minutos e na intensidade de 60% da velocidade máxima de corrida. Ao final do experimento foram realizadas as análises de composição corporal, fisiológicas, moleculares e histológicas (Immunoblot e H&E) nos diferentes grupos

experimentais. Os nossos resultados revelaram que o exercício gerou efeitos agonistas aos benefícios observados pelo jejum, controlando glicemia, ganho de massa corporal e hipertrofia dos adipócitos. Além disso, o exercício também foi capaz de aumentar os níveis proteicos de UCP1, indicando que possivelmente o jejum e exercício estavam gerando browning no tecido adiposo.

Palavras-chave: jejum intermitente, exercício aeróbio, *Browning*, tecido adiposo, gasto energético.

JUNQUEIRA, Rafael. Intermittent fasting effect associated with aerobic exercise on transcription factor KLF15 and White adipose tissue Browning process. 2021. 31. Completion of course work (graduation on Science of Sport) – School of Applied Science. Campinas State University. Limeira, 2021.

ABSTRACT

Obesity is a disease characterized by the excessive accumulation of body fat, which damages the health of affected people. Thus, strategies such as physical exercise and intermittent fasting have been the target of investigations in current science for bringing countless health benefits. Among the positive adaptations promoted by exercise and fasting, the increase in the thermogenic capacity of white adipose tissue through a process called browning has been highlighted. This adaptation induces molecular alterations that increase the oxidative capacity of white adipose tissue, related to an increase in the content of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1), with a consequent increase in the body's caloric expenditure. The Krüppel-like transcription factor 15 (KLF15) present in adipocytes seems to be able to induce increased expression of UCP1. However, the mechanisms linked to this adaptation in white adipose tissue are still unclear and whether it can be achieved by physical exercise or intermittent fasting. The present study aims to investigate the effects of intermittent fasting associated or not with aerobic exercise on the KLF15/UCP1 axis in white adipose tissue of Swiss mice. Rodents were distributed into groups: control (CTL) fed a standard diet; obese group (OB) fed a high-fat diet; intermittent fasting (JI) group fed a high-fat diet, with a fasting period of 16 hours per day; group exercised intermittent fasting (JI+EXE), fed a high-fat diet, with a fasting period of 16 hours and exercised in the same period. The experiment lasted a total of 5 weeks. The aerobic physical exercise protocol consisted of running on a treadmill, lasting 60 minutes and at an intensity of 60% of the maximum running speed. At the end of the experiment, analyzes of body composition, physiological, molecular and histological (Immunoblot and H&E) were carried out in the different experimental groups. Our results revealed that exercise generated agonist effects to the benefits observed by fasting, controlling glycemia, body mass gain and adipocyte hypertrophy. In addition, exercise was also able to increase UCP1 protein levels,

possibly indicating that fasting and exercise were causing browning in adipose tissue.

Keywords: intermittent fasting, aerobic exercise, Browning, adipose tissue, energy expenditure

ILUSTRAÇÃO

Figura 1 Figura ilustrativa da hipótese da proposta de pesquisa

GRÁFICOS

- Figura 2** Massa corporal; Delta da massa corporal; Índice de Lee
- Figura 3** Ingestão alimentar; Massa do tecido adiposo inguinal
- Figura 4** TTI; ASC TTI
- Figura 5** Área dos adipócitos
- Figura 6** Níveis proteicos de UCP1; Correlação KLF15/UCP1; Níveis proteicos de KLF15

IMAGENS

Figura 5 Imagens histológicas

Figura 6 Imagens do immunoblot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. MATERIAIS E MÉTODOS
 - 2.2. Grupos de animais e etapas experimentais
 - 2.3. Protocolo de treinamento físico aeróbio
 - 2.4. Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (TTlip)
 - 2.5. Eutanásia e extração dos tecidos dos animais
 - 2.6. Immunoblot
 - 2.7. Análise histológica dos cortes pelo método da hematoxilina e eosina (HE)
 - 2.8. Análise Estatística
3. RESULTADOS
 - 3.1. Efeitos das intervenções de jejum intermitente e exercício físico aeróbio no ganho de adiposidade, massa corporal, homeostase glicêmica e ingestão alimentar
 - 3.2. Efeitos das intervenções de jejum intermitente e exercício físico aeróbio sobre o conteúdo proteico de da KLF-15 e UCP-1
4. DISCUSSÃO
5. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em decorrência do comportamento alimentar hipercalórico e inatividade física atual de grande parte da população, a obesidade se tornou uma doença pandêmica quase triplicando o número de pessoas obesas entre os anos de 1975 e 2016 e atingindo 13% da população mundial ¹. A obesidade é resultante de inúmeros fatores (comportamentais, ambientais e genéticos); caracterizada por um balanço energético positivo e acúmulo excessivo de adiposidade corporal, inflamação subclínica e está associada a diversas doenças como diabetes do tipo 2, hipertensão esteatose hepática não alcoólica, problemas cardiovasculares, alguns tipos de câncer, entre outras ².

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. O exercício físico pode gerar alguns efeitos no corpo de extrema importância como redução de peso, redução de gordura ³ e melhora da sensibilidade à insulina corporal ⁴. Em obesos não diabéticos a atividade física regular é capaz de reduzir o risco de desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em até 46%, e a prática de exercícios aeróbios por 20 minutos, três vezes por semana durante um período de quatro semanas é o suficiente para reduzir peso e gordura corporal ⁵. Além disso, a realização do exercício físico tem implicações positivas sobre o organismo, elevando o gasto energético e favorecendo a hipertrofia do músculo esquelético ⁶. 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 contribuindo para o emagrecimento a médio e longo prazo ⁷.

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 além disso, induzir processos de autofagia e aumento da produção de corpos cetônicos (jejum mais longos acima de 24 h) no organismo ⁸. Este tempo de jejum é capaz de motivar comportamentos e ativar vias catabólicas que não são ativadas em um padrão alimentar comum, podendo prover alguns benefícios sobre a saúde metabólica ⁹. Em um estudo feito com humanos, a restrição do tempo alimentar de 16 horas sem limitar a ingestão de caloria diária total foi suficiente para diminuir a gordura corporal ¹⁰. Em um estudo realizado envolvendo jejum intermitente foi relatado efeito de proteção de doenças cardiovasculares em modelos animais ¹¹; efeitos anti-inflamatórios periféricos e centrais em ratos ¹² e se aliado a práticas de exercícios físicos, um outro estudo em humanos exibiu melhorias na plasticidade sináptica e fatores associados ao aumento da longevidade ². 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, e dessa forma tem se buscado verificar o impacto dessas medidas sobre o processo *browning* do tecido adiposo branco (TAB).

O tecido adiposo marrom (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 nutrientes em forma de gordura ¹³. 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: exposição a baixas temperaturas, tratamentos farmacêuticos, exercício e em alguns casos sob privação de nutrientes, e isso acontece por conta do processo *browning* ¹⁴. Essa adaptação no TAB promove alteração na coloração tornando-se bege e por isso o termo *browning* é

empregado, onde o TAB assume algumas características de tecido adiposo marrom. Este processo é regulado por moléculas como o coativador-1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1 α)¹⁵.

Além disso, em estudo recente foi mostrado uma forte relação entre a proteína 15 similar a Kruppel (do inglês, *Krüppel-like factors* - KLF15) com o processo *browning do TAB*¹⁶. A KLF15 é um fator de transcrição presente em vários processos metabólicos em diferentes tecidos (fígado, rim, coração, músculo esquelético e tecido adiposo), como por exemplo, envolvido na proteólise muscular para regulação da glicemia por meio da gliconeogênese¹⁷. Sua relação com o *browning* foi estabelecida pela ligação encontrada entre KLF15 e a região promotora da UCP1 servindo como fator de transcrição para proteína desacopladora e um dos marcadores importantes do processo *browning*^{13,16}. Nesse sentido, tem se buscado entender os efeitos que o jejum e o exercício físico aeróbio exercem na expressão das proteínas envolvidas no processo *browning* do tecido adiposo branco.

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 e na expressão de seu RNAm no tecido adiposo branco inguinal (TABi)¹⁸, a respeito do fator de transcrição KLF15, foi encontrado um significativo aumento da proteína durante a condição de jejum (48 horas)¹⁹. Com relação aos efeitos do exercício sobre o processo *browning*, alguns achados demonstraram que exercício crônico promove o *browning* do TAB²⁰, dentre eles, em um estudo realizado com camundongos, 10 semanas de exercício voluntário também foi capaz de aumentar a quantidade de UCP1 mitocondrial²¹, 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 contribuam para redução da adiposidade, através do processo de *browning* e consequente aumento da termogênese, o impacto do jejum isoladamente ou combinado com o exercício físico sobre a proteína KLF15 e seu papel na manutenção da perda de peso e gasto energético não está totalmente esclarecido. Portanto, o intuito da presente proposta de pesquisa foi investigar os efeitos do jejum isoladamente e associado ao exercício físico sobre o fator de

transcrição KLF15 e no processo *browning* do tecido adiposo branco de camundongos. A figura 1, ilustra a via de sinalização molecular de interesse de investigação da pesquisa realizada.

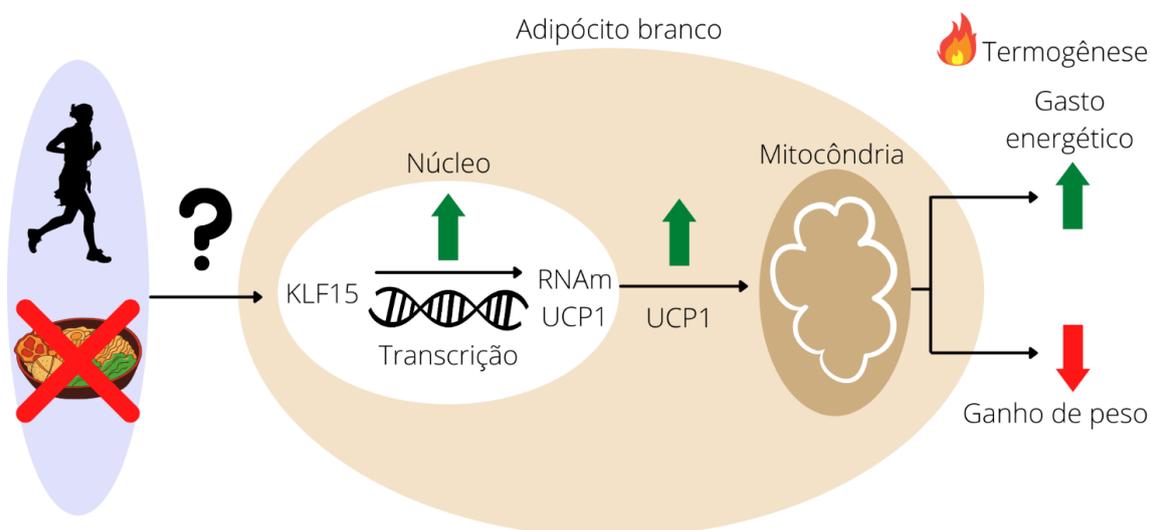


Figura 1. Figura ilustrativa da hipótese da presente proposta de pesquisa com a sinalização molecular e mecanismo de indução do processo *browning* do tecido adiposo branco através das intervenções jejum intermitente e exercício físico. UCP-1, proteína desacopladora 1 (do inglês, Uncoupling protein 1);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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. 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 nº 4175-1/2019/5185-1(A)/2020). Todos os experimentos previstos neste projeto foram aprovados pelo CEUA-UNICAMP (ver documento e anexo).

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 ²², salvo àqueles sob condição de experimentação. Em todas as etapas os animais foram pesados semanalmente e foi realizado o controle da ingestão alimentar. A análise da ingestão alimentar foi realizada através do monitoramento e peso da ração oferecida antes e após período de 24 horas. As sobras de ração nesse período foram pesadas em balança de precisão, oferecendo o valor de alimento ingerido. Os animais dos grupos experimentais tiveram acesso ao alimento entre 5 h após as luzes apagarem (as luzes se apagam às 18h00) e 1 h após as luzes acenderem (as luzes se acendem às 6h00) ²³, totalizando 16h de jejum diário. Os camundongos foram distribuídos em diferentes grupos experimentais, conforme descrito a seguir.

2.2. Grupos de animais e etapas experimentais

Para o presente estudo os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: grupo denominado controle, constituído de animais que receberam dieta convencional para roedores durante 5 semanas (CTL); grupo denominado obeso induzido por dieta hiperlipídica, constituído de animais que receberam dieta hiperlipídica para roedores durante 5 semanas (OB); grupo denominado 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); grupo denominando 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 restrito ao alimento conforme previamente informado. A dieta hiperlipídica tem sido previamente utilizada em estudo prévio ²².

Foram realizadas as análises de peso corporal e tamanho do animal (comprimento naso-anal) para que fosse feito o cálculo do índice de Lee (divisão da raiz cúbica do peso em gramas pelo comprimento em milímetro multiplicado por mil) e sensibilidade à insulina através do teste de tolerância à insulina. As

análises fisiológicas foram realizadas após jejum prévio dos animais por período de 6 horas.

2.3. Protocolo de treinamento físico aeróbio

Foi feito um teste incremental para definição da velocidade máxima de corrida de cada animal. Tanto o teste incremental quanto o protocolo de treinamento físico foram realizados em esteira ergométrica para camundongos (AVS Projetos, São Carlos, São Paulo, Brasil). Previamente ao teste os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 4 dias a fim de minimizar o estresse do animal perante o ergômetro ²⁴, 10min/dia na velocidade de 3m/min. Após a adaptação, o teste foi iniciado na velocidade de 6m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3m/min a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os animais encostaram 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min. A potência máxima (P_{máx}) foi definida como a velocidade (m/min) de exaustão obtida por cada animal. Após 24 horas do teste incremental os animais deram início ao protocolo de treinamento físico. Os camundongos deram início ao treinamento correndo por período de 30 minutos na primeira semana, depois por 45 minutos na segunda semana e por 60 minutos na terceira semana em diante até a quinta semana, na intensidade de 60% da P_{máx}. Houve um teste incremental na quinta semana para readaptação da velocidade máxima dos animais prevendo adaptação aos exercícios.

2.4. Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (TTIip)

Com jejum prévio de 6 horas, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (TTI). Para isso, os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a partir da cauda dos animais para a determinação da glicemia. O tempo 0 representa o valor basal de glicose (e a glicemia de jejum) no sangue dos animais e que antecede a injeção de insulina. A taxa constante de captação da glicose plasmática (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/\text{meia-vida biológica}$ ($t_{1/2}$). A glicose plasmática $t_{1/2}$ foi calculada a partir da inclinação da última

análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear ²⁵.

2.5. Eutanásia e extração dos tecidos dos animais

Os camundongos receberam previamente aos procedimentos cirúrgicos e de extração dos tecidos, injeção intraperitoneal (i.p.) de *ketamine chlorohydrate* (50 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) e *xylazine* (20 mg/kg; Rompun; Bayer, Leverkusen), e eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os animais permaneceram em jejum de 6 horas antes dos procedimentos de extração dos tecidos. Amostras do tecido adiposo branco inguinal foram retiradas dos animais dos diferentes grupos experimentais. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados em tampão de extração como descrito por Muñoz (2018) ²⁶. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método de Bicinchoninic Acid (BCA) (Sigma-Aldrich(r)), enquanto a outra parte foi submetida à técnica de imunoblot (IB) com anticorpos específicos.

2.6. Imunoblot

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (80 ug) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Por fim, as membranas de nitrocelulose foram incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce Reagents(r)) por 5 minutos e expostas a filmes fotossensíveis de RX Kodak(r) e revelados por método tradicional (máquina de Raios-X). As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa Color Page HR6X (Genius(r)) e o programa Un-Scan-It Gel 6.1(r). Os anticorpos usados para imunoblot foram: anti-KLF15, anti-UCP1 e anti- β -Actina (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

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

Para análise histológica, tecido adiposo foi fixado em formaldeído a 4% e incorporado em parafina. Seções iWAT embutidas em parafina (5- μ m de espessura) foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média. Os resultados das proteínas obtidas através de immunoblot foram apresentados como comparações diretas das bandas proteicas nas autorradiografias, 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 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.

3. RESULTADOS

3.1. Efeitos das intervenções de jejum intermitente e exercício físico aeróbio no ganho de adiposidade, massa corporal, homeostase glicêmica e ingestão alimentar

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 quinta 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). O delta da massa corporal dos animais foi avaliado a fim de analisar o ganho ou a perda de peso no experimento. Dessa forma, o grupo JI+EXE foi o que

menos ganhou massa corporal total em comparação com os grupos CTL, OB e JI, além disso, foi o único grupo que, curiosamente, apresentou animais com delta negativo (Fig 2B). Já na análise de índice de Lee, realizada para estimar a gordura corporal dos animais de maneira mais simples quanto avaliações mais invasivas, porém mais precisas ²⁷, somente o grupo JI+EXE apresentou valores inferiores em relação ao grupo OB (Fig 2C).

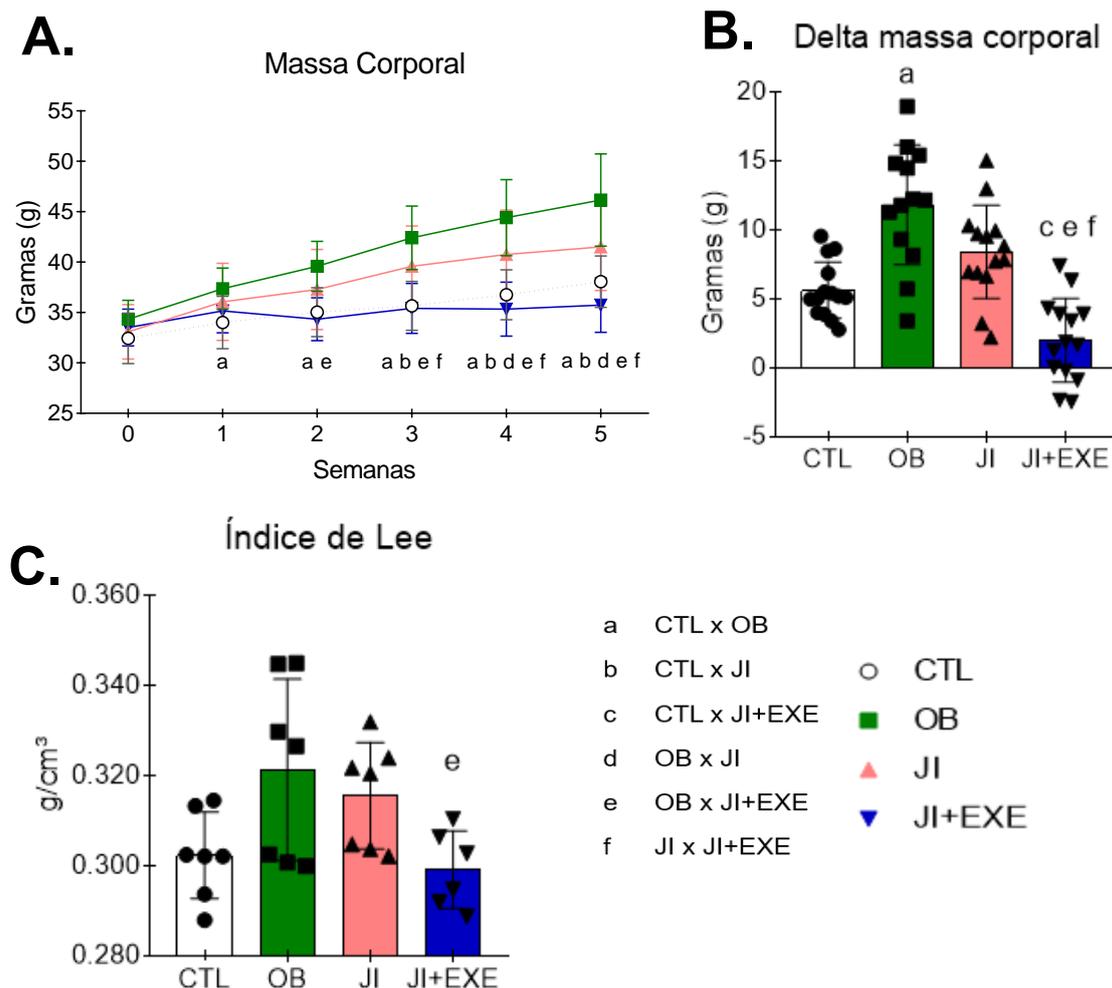


Figura 2. A, evolução da massa corporal por semana; B, massa corporal inicial menos final; C, raiz cúbica do peso corporal sobre o comprimento nasoanal dos animais; (n = 6-14). Significância adotada de $p < 0,05$.

Nas análises de ingestão alimentar, o grupo OB exibiu maior ingestão em comparação ao grupo JI+EXE durante as 5 semanas de análise, e ao longo de todo experimento, exibiu uma leve tendência a queda de ingestão alimentar (Fig. 3A). A respeito da massa do tecido adiposo branco inguinal, apesar de ser

possível observar uma tendência de aumento do peso do tecido adiposo do grupo OB e de redução do grupo JI+EXE, não foram encontradas nenhuma diferença significativa entre os grupos (Fig. 3B).

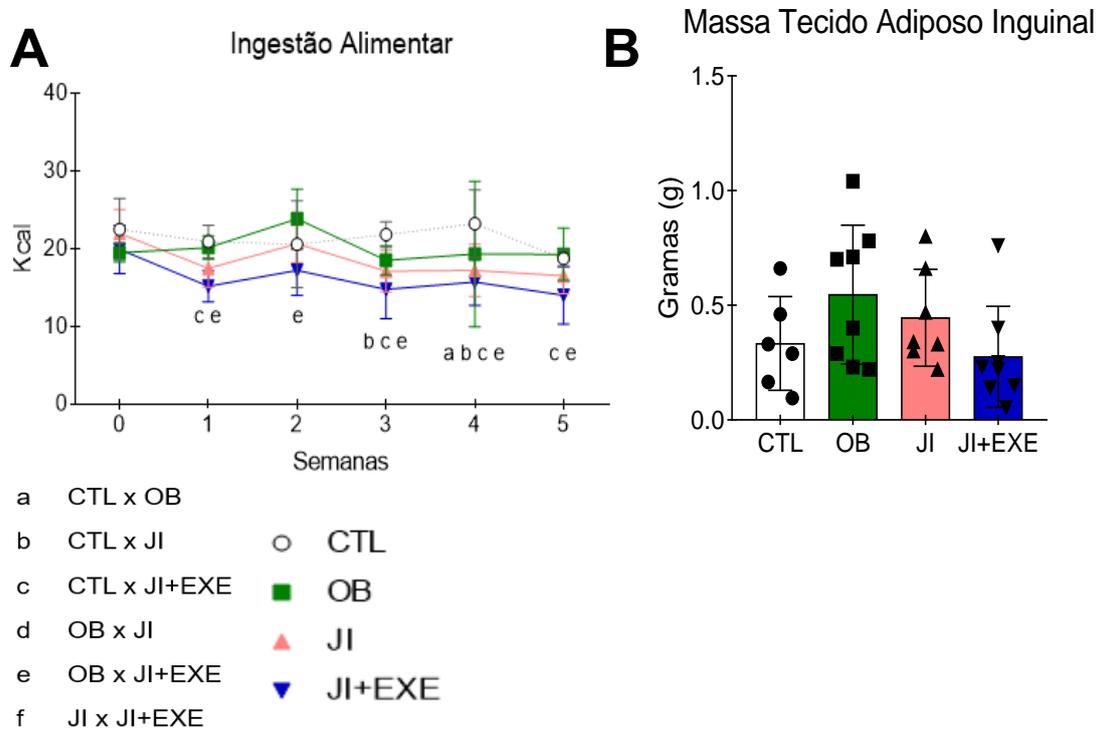


Figura 3. A, ingestão alimentar dos animais; B, massa do tecido adiposo; (n = 6-14). Significância adotada de $p < 0,05$.

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 em todos os tempos coletados (Fig. 4A). Assim como a sua área sob a curva glicêmica que também foi maior que os demais grupos estudados (Fig. 4B).

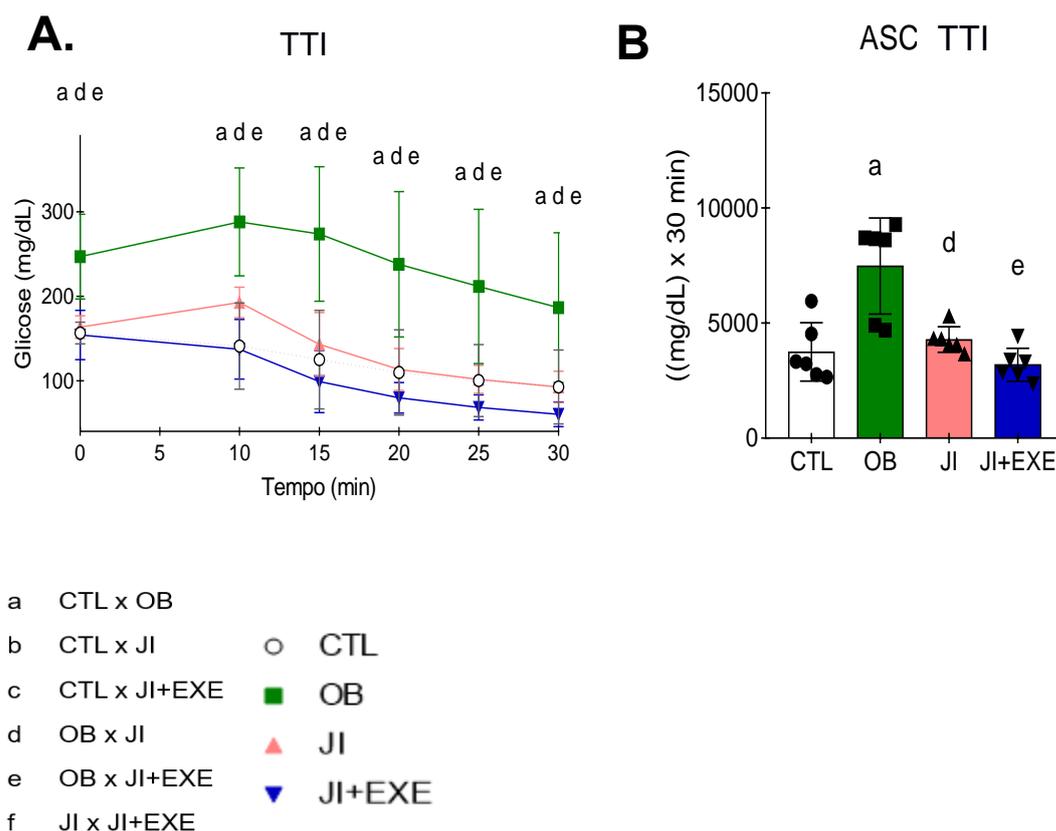


Figura 4. A, Curva glicêmica no teste de tolerância à insulina; B área sob a curva do teste de tolerância a insulina; (n = 6). Significância adotada de $p < 0,05$.

A partir da análise histológica, visualizado com ampliação de x10 e x40 (Fig. 5A), e quantificado em ampliação x10, foi observado que o grupo OB 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. 5B).

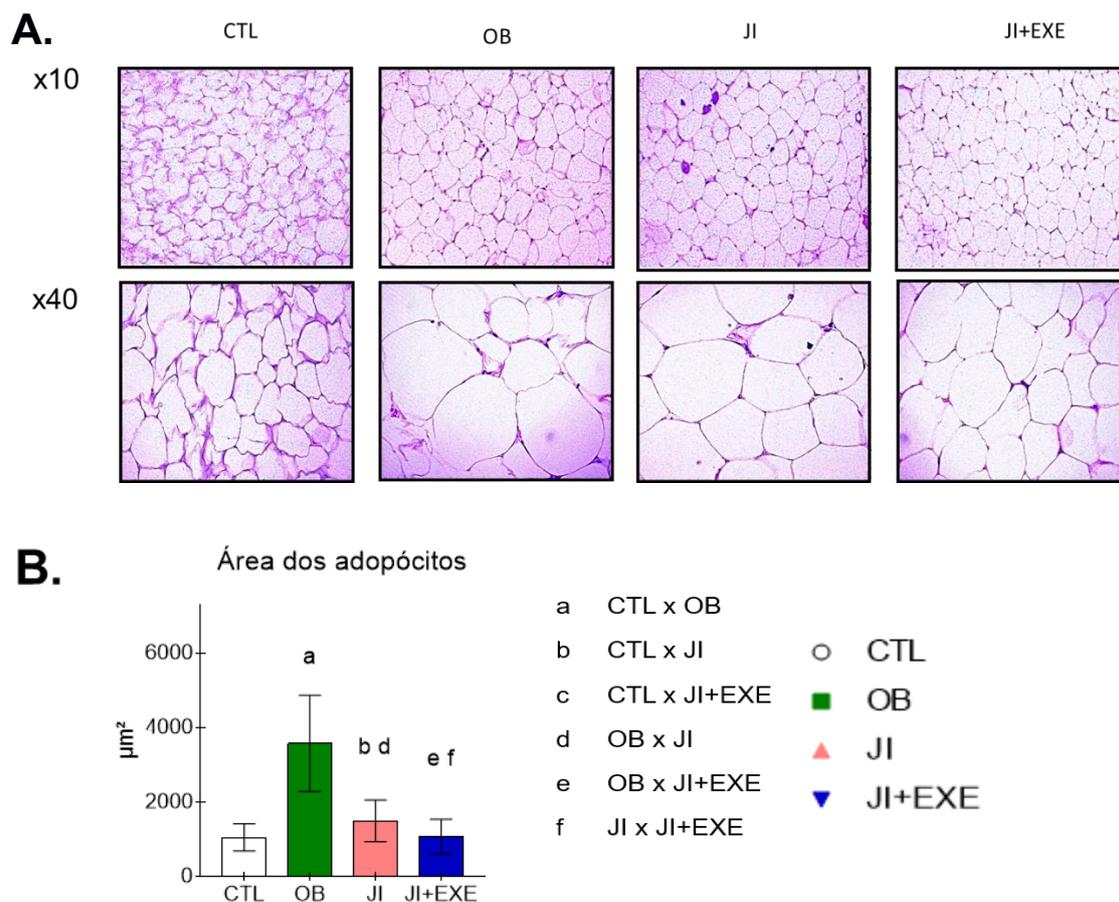


Figura 5. A, Imagens histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E); B, quantificação da área dos adipócitos em μm^2 . Significância adotada de $p < 0,05$.

3.2. Efeitos das intervenções de jejum intermitente e exercício físico aeróbico sobre o conteúdo proteico de da KLF-15 e UCP-1

Níveis de UCP-1 maiores, indicariam maior presença do processo *browning* no tecido adiposo branco inguinal, já uma correlação positiva forte com a KLF-15, evidenciaria uma modulação também positiva sobre a proteína UCP-1. Nossos dados demonstram que houve um aumento de UCP-1 somente no grupo JI+EXE (Fig. 6B). No grupo JI tanto a UCP-1 quanto a KLF-15 tiveram apenas tendência de aumento do seu conteúdo proteico no TAB, assim como o grupo JI+EXE nas observações feitas sobre os níveis proteicos de KLF15. Enquanto que os níveis de UCP1 e KLF-15 no grupo OB apresentou tendência de diminuição (Fig. 6B e 6D).

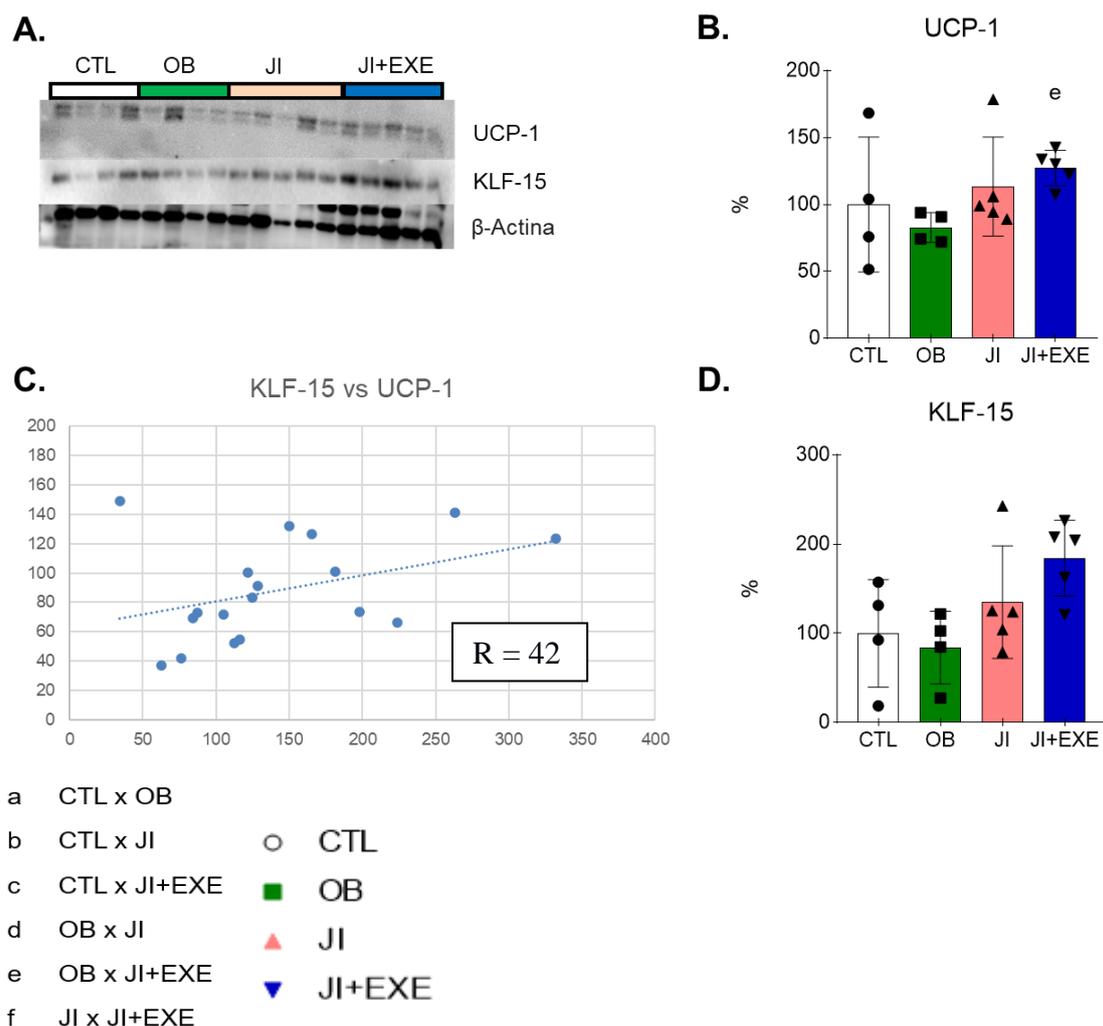


Figura 6. A, níveis das proteínas UCP-1, KLF-15 e β -Actina no tecido adiposo inguinal; B e D, percentual das proteínas KLF-15 e UCP-1 no tecido adiposo inguinal; C, gráfico de correlação (Pearson) entre a KLF-15 e UCP-1; (n = 4-5). Significância adotada de $p < 0,05$.

4. Discussão

A presente pesquisa explorou os efeitos do jejum intermitente associado ao exercício físico aeróbio sobre a expressão proteica da KLF15 e UCP-1 e geração do processo *browning* no tecido adiposo branco inguinal. Durante a fase experimental, foi observado que o JI+EXE foi capaz de prevenir o ganho de peso total dos camundongos, assim como o JI e o JI+EXE foram capazes de melhorar a sensibilidade à insulina, corroborando com um estudo realizado recentemente

que mostrou que o exercício físico aeróbio agiu como agonista aos benefícios do jejum intermitente quando realizados em concomitância, controlando também a massa corporal e prevenindo o ganho de peso dos animais ²⁸.

Nesse sentido, os benefícios acentuados do jejum associado ao exercício aeróbio também foram observados na ingestão alimentar dos animais na presente pesquisa, visto que os animais submetidos ao jejum e ao exercício exibiram uma menor ingestão alimentar em comparação aos demais, indo novamente ao encontro dos resultados previamente encontrados ²⁸. Contudo, 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 ²⁹. 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, um achado na literatura que também pode explicar a prevenção do ganho de peso dos animais além do menor consumo alimentar, é a troca do consumo de substratos de lipídios e carboidratos entre os estados de jejum e alimentado respectivamente, uma vez que os animais submetidos a restrição alimentar e ao exercício, exibiram maior utilização de lipídios de jejum, e de carboidratos após a refeição, indicando uma melhor eficiência da troca metabólica ^{28,30}.

Em contrapartida, nas análises de peso do tecido adiposo branco inguinal, apesar de haver uma tendência a redução de peso do tecido adiposo dos grupos submetidos as intervenções, 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 ³¹. Apesar disso, nesse estudo não fizemos a análise morfológica ou do *turnover* proteico do músculo esquelético dos animais. Além do mais, em um estudo que analisou a massa gorda total de camundongos machos submetidos a 12 semanas de jejum e exercício de alta intensidade, foi encontrado que as intervenções foram capazes de reduzir o peso

do tecido adiposo dos animais, demonstrando que a longo prazo ambos são eficientes para reduzir a gordura corporal ²⁹. Ademais, a análise de outros depósitos de gordura poderá contribuir para confirmar se as intervenções propostas nesse presente estudo não foi capaz de reduzir a adiposidade corporal dos camundongos.

A hipertrofia do adipócitos é o principal fator de expansão do tecido adiposo branco inguinal, está intimamente ligado a disfunção do tecido adiposo, e além disso, é o processo mais aparente na síndrome metabólica em obesos ^{32,33}. Nesse sentido, nossas 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 relação aos animais que não realizaram nenhuma intervenção, evitando o acúmulo ectópico de gordura e exibindo por outro ângulo o efeito da privação de comida e atividade física aeróbia, demonstrando que a combinação destas intervenções pode ser significativa para a prevenção de desenvolvimento da obesidade.

Para as análises de Immunoblot 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 como encontrado na literatura em camundongos tratados com ¹⁶.

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. Entretanto, as proteínas analisadas não apresentaram aumento e redução simultânea como visto em estudo prévio realizado utilizando animais tratados com extrato de erva-mate e resveratrol, em que o tratamento gerou aumento da UCP1 e diminuição da KLF15 no tecido adiposo, indicando que as diferentes vias que agem fármacos e exercício são capazes de modular ambas de maneiras distintas, dependendo da abordagem e ensaio empregados, e sugerindo que possivelmente há outras moléculas que agem sobre a UCP1 na condição de jejum e exercitado ³⁴.

Ainda em relação a KLF15, em um estudo, animais transgênicos superexpressos com o fator de transcrição KLF15 apresentaram proteção contra obesidade, porém, a isoforma da proteína desacopladora expressa pelo tecido adiposo branco desses animais transgênicos, curiosamente, foi a UCP2, indicando novamente que há alguma via pouco esclarecida até o momento que relaciona a KLF15 e UCP1 ao jejum e exercício ³⁵. Apesar disso, há também outros fatores que possivelmente podem justificar a correlação insuficiente entre essas duas moléculas, como por exemplo, a KLF-11, que no tecido adiposo marrom, exibiu uma maior interação com a UCP-1 ³⁶. E em um estudo que analisou a expressão de genes adipogênicos nos tecidos adiposos inguinal e epididimal imediatamente após uma única sessão de exercício, foi mostrado que a KLF15 foi mais expressa no tecido adiposo branco epididimal em comparação ao inguinal, assim como a UCP-1 que foi exclusivamente expressa no tecido adiposo epididimal ³², sugerindo que talvez essas duas proteínas respondam menos no tecido adiposo inguinal em resposta ao exercício.

Dessa forma, mais estudos visando analisar os níveis de KLF-15 e UCP-1, assim como análises de outras isoformas de KLF15 e outros tecidos adiposos podem também agregar informações sobre o papel destes fatores de transcrição sobre a UCP-1 e processo browning do tecido adiposo branco sob condições de jejum intermitente e exercício físico.

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.

5. Bibliografia

1. Levesque RJR. Obesity and Overweight. *Encycl Adolesc.* 2018;(March):2561-2565. doi:10.1007/978-3-319-33228-4_447
2. Davoudi A, Davoudi S. Alloimmunization in Thalassemia Patients : New Insight for Healthcare. Published online 2017:1-4. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM
3. Steig AJ, Jackman MR, Giles ED, 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.* 2011;301(3).

doi:10.1152/ajpregu.00212.2011

4. Muñoz VR, Gaspar RC, Crisol BM, et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. *J Physiol Sci.* 2018;68(4):493-501. doi:10.1007/s12576-017-0559-3
5. Harrison SA, Day CP. RECENT ADVANCES IN CLINICAL PRACTICE BENEFITS OF LIFESTYLE MODIFICATION. 2007;6(fig 1). doi:10.1136/gut.2006.112094
6. Konopka AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2014;42(2):53-61. doi:10.1249/JES.0000000000000007
7. Fritzen AM, Lundsgaard AM, Kiens B. Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(12):683-696. doi:10.1038/s41574-020-0405-1
8. la Fuente FP, Quezada L, Sepúlveda C, et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. *Biochim Biophys Acta Mol cell Biol lipids.* Published online 2019:158519. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158519
9. Zhang X, Zou Q, Zhao B, et al. Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. *Redox Biol.* 2020;32(March):101535. doi:10.1016/j.redox.2020.101535
10. Moro T, Tinsley G, Bianco A, 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.* 2016;14(1):1-10. doi:10.1186/s12967-016-1044-0
11. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation.* 2005;112(20):3115-3121. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563817
12. Fann DYW, Ng GYQ, Poh L, Arumugam T V. Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke. *Exp Gerontol.* 2017;89:93-102. doi:10.1016/j.exger.2017.01.014
13. Lee JH, Park A, Oh K, Lee SC, Kim WK, Bae K. The Role of Adipose Tissue Mitochondria : Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. Published online 2019.
14. Gavrilova O, Patterson AD, Gonzalez FJ, 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.* 2017;26(4):672-685.e4. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.019
15. Xiong Y, Wu Z, Zhang B, et al. Fndc5 loss-of-function attenuates exercise-induced browning of white adipose tissue in mice. *FASEB J.* 2019;33(5):5876-5886. doi:10.1096/fj.201801754RR
16. Lee CG, Rhee DK, Kim BO, Um SH, Pyo S. Allicin induces beige-like adipocytes via KLF15 signal cascade. *J Nutr Biochem.* 2019;64:13-24. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.09.014
17. Hirata Y, Hosooka T, Ogawa W, et al. Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via

- a WWP1 / KLF15 axis Graphical abstract Find the latest version : Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1 / KLF15 axis. *JCI insight*. 2019;4(4).
18. Liu B, Ph D, Page AJ, et al. Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. 2019;66:38-43.
doi:10.1016/j.nut.2019.03.015
 19. Liu Y, Dong W, Shao J, Wang Y, Zhou M, Sun H. Branched-chain amino acid negatively regulates KLF15 expression via PI3K-AKT pathway. *Front Physiol*. 2017;8(OCT):1-9.
doi:10.3389/fphys.2017.00853
 20. Rats M. The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese.
 21. Townsend LK, Wright DC. Looking on the “brite” side exercise-induced browning of white adipose tissue. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2019;471(3):455-465. doi:10.1007/s00424-018-2177-1
 22. Pauli R, Morari J, Claudio T, et al. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030571
 23. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al. Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. 15.
 24. Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE : EFFECT OF EXERCISE TRAINING. 2007;(January):760-765. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x
 25. Bonora E, Moghetti P, Zaccaro C, et al. Estimates of In Vivo Insulin Action in Man : Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose Clamp Studies *. 1989;68(2):374-378.
 26. Muñoz VR, Gaspar RC, Kuga GK, et al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4791-4800.
doi:10.1002/jcp.26278
 27. Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr*. 1980;43(1):83-86. doi:10.1079/bjn19800066
 28. Vieira RFL, Muñoz VR, Junqueira RL, 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*. 2021;0:1-17. doi:10.1113/JP280820
 29. Wilson RA, Deasy W, Stathis CG, Hayes A, Cooke MB. Intermittent fasting with or without exercise prevents weight gain and improves lipids in diet-induced obese mice. *Nutrients*. 2018;10(3). doi:10.3390/nu10030346
 30. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 2012;15(6):848-860. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019
 31. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. 2004;117:399-412.

32. Shen Y, Zhou H, Jin W, Lee HJ. Acute exercise regulates adipogenic gene expression in white adipose tissue. *Biol Sport*. 2016;33(4):381-391. doi:10.5604/20831862.1224395
33. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19(10):1338-1344. doi:10.1038/nm.3324
34. Santos JC, Gotardo EMF, Brianti MT, Pirae M, Gambero A, Ribeiro ML. Effects of yerba maté, a plant extract formulation ("YGD") and resveratrol in 3T3-L1 adipogenesis. *Molecules*. 2014;19(10):16909-16924. doi:10.3390/molecules191016909
35. Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, et al. Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 2011;286(43):37458-37469. doi:10.1074/jbc.M111.242651
36. Yamamoto K ichi, Sakaguchi M, Medina RJ, et al. Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400(1):175-180. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.039