



# PRÁTICA REGULAR DE EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO COMO PREVENÇÃO DE ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO- ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS

**Palavras-Chave: OBESIDADE, ESTEATOSE HEPÁTICA, EXERCÍCIO FÍSICO**

**Autores(as):**

**Guilherme Soderini Erlich, FCA – UNICAMP**

**Guilherme Domingos Brisque (coautor), FCA - UNICAMP**

**Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (orientador), FCA - UNICAMP**

---

## **INTRODUÇÃO:**

Inatividade física e padrões alimentares com consumo demasiado de gorduras saturadas e açúcares simples são hábitos diretamente relacionados com o desenvolvimento de obesidade e outras diversas doenças crônicas não-transmissíveis. Dentre elas está a esteatose hepática, atualmente denominada como doença hepática esteatótica metabólica (DHEM) devido à sua relevante relação com outros distúrbios do metabolismo. Esta condição histopatológica pode ser caracterizada por um acúmulo lipídico superior a 5% do peso do tecido hepático (1-3).

A obesidade e o estilo de vida sedentário são fatores de risco notáveis para o desenvolvimento dessa patologia, isso se deve principalmente pela resposta inflamatória desencadeada no organismo por esses fatores (4). Em contrapartida, a prática regular de exercício físico é evidenciada como uma estratégia não-farmacológica eficaz tanto na prevenção como no tratamento de DHEM e de diversos outros distúrbios metabólicos. Esse efeito benéfico se deve majoritariamente pelo estímulo à expressão gênica e atividade da Lipase de Lipoproteína (LPL), responsável pela hidrólise de triacilgliceróis (TAG), ou seja, ocorre uma redução nos níveis plasmáticos de TAG, levando a um menor armazenamento hepático de lipídeos (5).

A proteína 15 similar a Kruppel (KLF-15) é um fator de transcrição fundamental na regulação do metabolismo hepático, dentre suas principais funções, está a regulação gênica de enzimas ligadas à via da gliconeogênese (6). Camundongos deficientes em KLF-15 hepática apresentaram diminuição na expressão de genes relacionados à gliconeogênese, assim como menores níveis de glicemia de jejum e após estímulo com piruvato (7, 8). Também foi manifestada menor expressão gênica de enzimas degradadoras de aminoácidos, sendo esse, um dos mecanismos pelo qual a KLF-15 é capaz de regular a gliconeogênese no fígado (8).

Diante do exposto, o principal desafio proposto ao longo da iniciação científica foi avaliar os efeitos do protocolo de treinamento físico resistido de corrida atada sobre o metabolismo hepático de camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica. Também foi investigado o impacto do protocolo sob os níveis hepáticos de KLF-15, buscando estabelecer uma possível relação entre esse fator de transcrição e a redução do acúmulo de gordura no fígado dos animais.

## **METODOLOGIA:**

Para o estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com 10 semanas de vida ao início do período experimental, onde os animais foram divididos em três grupos experimentais com 6 animais em cada ( $n = 6$ ), sendo eles grupo Controle (CTL); grupo Obeso (OB), alimentado com dieta hiperlipídica; e grupo Obeso Exercício (OBEX), alimentado com dieta hiperlipídica e submetido ao protocolo de treinamento físico resistido. Todos os camundongos foram pesados semanalmente, assim como sua ingestão alimentar. A duração do período experimental foi de 8 semanas, onde, após período de adaptação de cinco dias, o grupo OBEX realizou quatro sessões de treinamento de corrida atada por semana, totalizando 32 sessões de treinamento resistido.

Vale destacar que previamente ao início do protocolo, foi realizado um teste de determinação da Capacidade de Carga Máxima Voluntária (MVCC) com os animais para determinar a carga para cada animal, correspondente a 85% da MVCC. Esse teste foi repetido na quarta semana de período experimental, visando análise de desempenho e ajuste de carga. As sessões de treinamento resistido eram constituídas por vinte séries de corrida atada em uma pista de madeira de sessenta centímetros, com intervalo de um minuto entre elas. Outra análise de desempenho realizada com os animais na primeira e oitava semanas foi o Teste de Força de Preensão (*Hand Grip*) utilizando o equipamento Grip Strength System. Esse teste visa quantificar a força do animal em segurar a grade do equipamento, que é aferida e registrada como força de preensão (N).

Além das análises de desempenho, também foram realizadas outras duas análises fisiológicas nos camundongos. A primeira delas foi a aferição da glicemia de jejum utilizando um glicosímetro, após período de doze horas sem alimentação. A segunda foi o Teste de Tolerância à Insulina (TTI), com jejum prévio de quatro horas, onde foi aferida a glicemia dos animais previamente a administração intraperitoneal de insulina recombinante humana e posteriormente a administração, a cada cinco minutos.

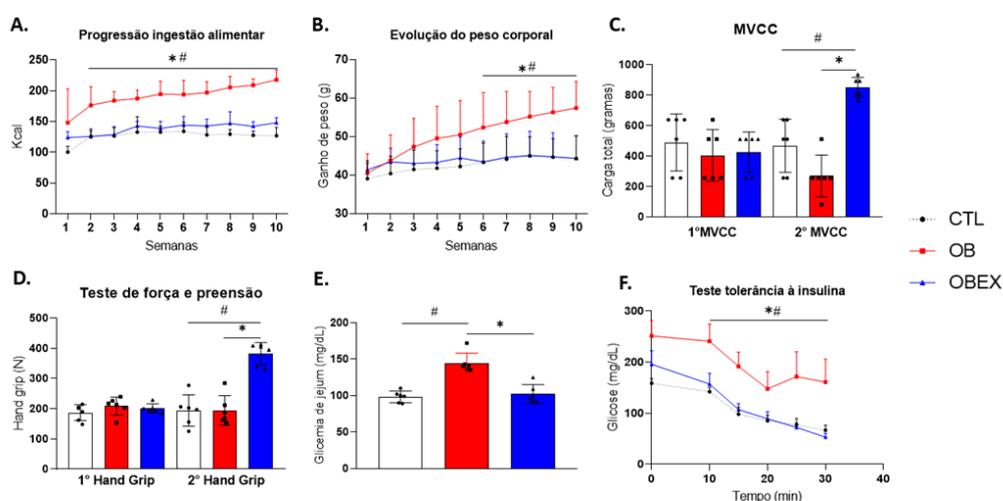
Após vinte e quatro horas da última sessão de exercício e em estado de jejum de quatro horas, foi realizada a eutanásia dos animais por aprofundamento de anestesia. Em seguida, os animais foram medidos e pesados e depois foi realizada a extração dos tecidos, onde o tecido hepático e adiposo epididimal foram pesados isoladamente. Os tecidos extraídos foram prontamente congelados com nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para as análises histológicas, o tecido hepático ainda congelado foi cortado em segmentos de  $10\ \mu\text{m}$  utilizando um criostato e colocados em lâminas de adesão. Estas foram coradas utilizando soluções de Oil Red O e hematoxilina-eosina. As imagens obtidas das lâminas foram quantificadas através de software, visando analisar a presença de DHEM no tecido hepático e a comparação entre os grupos. Para as análises moleculares, foi realizado Western Blotting (WB) com anticorpo específico para o gene da KLF-15 visando investigar os efeitos do exercício no conteúdo hepático dessa proteína. Também foi realizado Real Time PCR quantitativo (RT-qPCR), com primer específico, visando investigar os efeitos do exercício físico na expressão gênica da KLF-15. Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e utilizados para comparação entre os três grupos experimentais.

## **RESULTADOS:**

- 1. O treinamento resistido de corrida atada foi eficaz na prevenção do ganho de peso corporal, na redução da ingestão alimentar, aumento da performance e na melhora da homeostase glicêmica em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.**

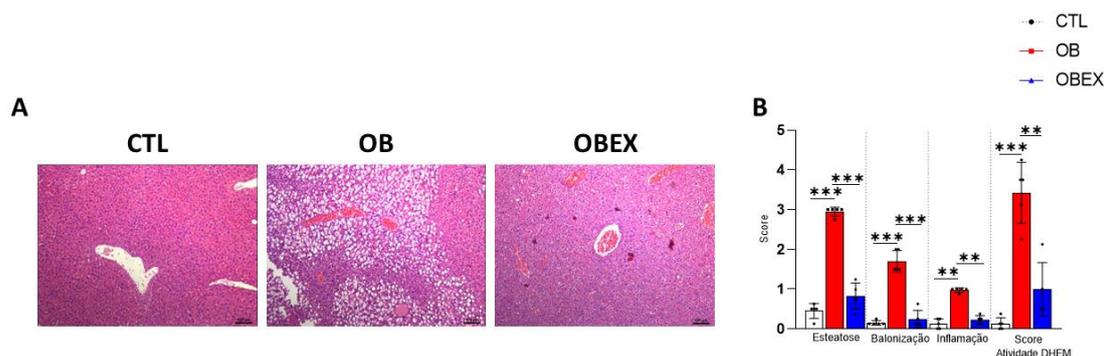
A análise da ingestão cumulativa de alimentos evidenciou que o grupo OB apresentou um maior consumo alimentar do que os demais grupos experimentais (CTL e OBEX) ao longo das dez semanas de período experimental (Figura 1A). Além disso, grupo OB apresentou uma evolução no peso corporal significativamente maior em comparação aos demais grupos. A partir da sexta semana, o grupo OB apresentou maior ganho de peso do que os demais grupos (Figura 1B). O teste de Capacidade de Carga Máxima Voluntária (MVCC) realizado na quarta semana evidenciou uma melhora significativa no desempenho do grupo OBEX em relação aos demais grupos (Figura 1C). O Teste de Força de Preensão (*Hand Grip*) realizado na oitava semana evidenciou uma maior força de preensão (N) do grupo OBEX em relação aos demais grupos (Figura 1D). O grupo OB apresentou uma glicemia de jejum significativamente maior do que os demais grupos experimentais (Figura 1E). Além disso, o grupo OB apresentou glicemia significativamente maior do que os demais grupos em todos os tempos do Teste de Tolerância à Insulina (Figura 1F).



**Figura 1.** Resultados das análises fisiológicas e de desempenho. Progressão de ingestão alimentar (A). Evolução do peso corporal (B). Determinação da carga máxima voluntária (C). Teste de força e preensão (D). Glicemia em jejum (E). Teste de tolerância à insulina. (F). Significância estatística: \* $p < 0,05$ .

## 2. O treinamento resistido de corrida atada diminui o acúmulo de gordura no tecido hepático dos camundongos.

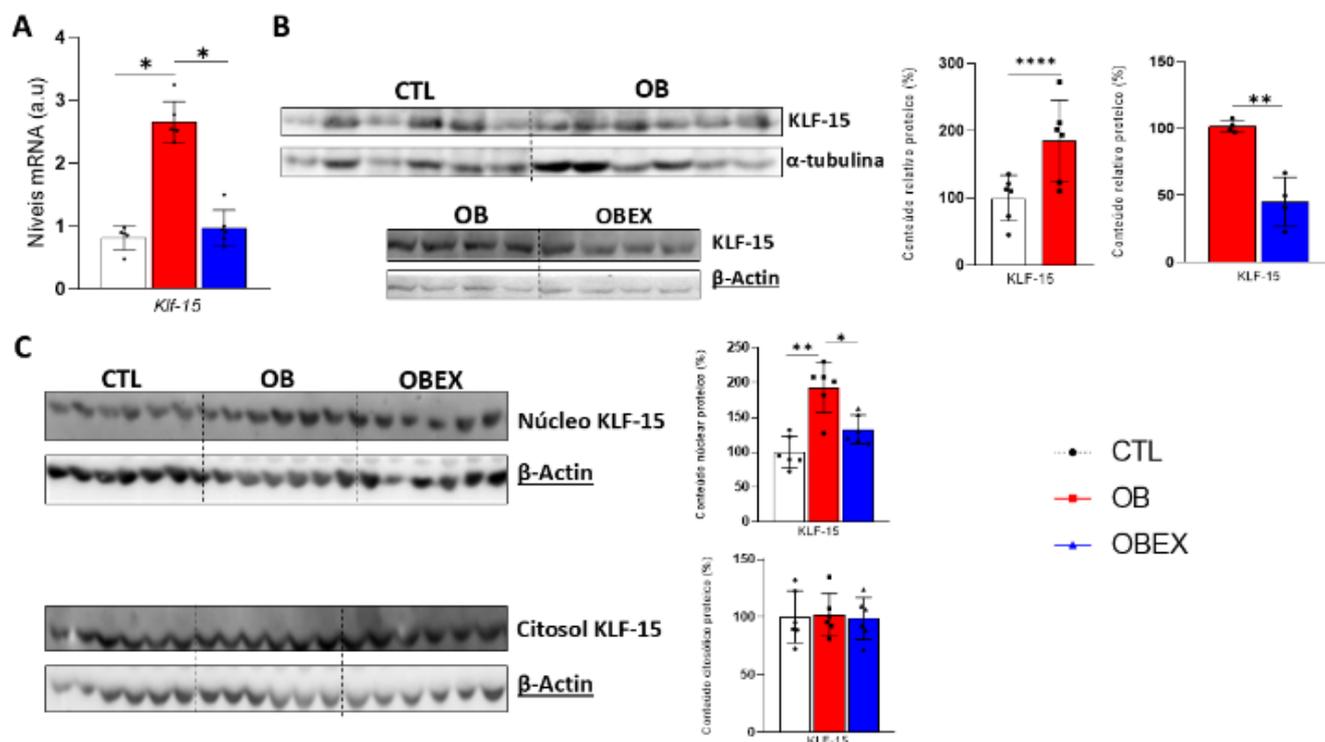
Após análise histológica e avaliação do escore total de atividade da doença hepática esteatótica metabólica, foi evidenciado aumento significativo dos critérios de esteatose, balonização hepatocelular, inflamação lobular e escore total no fígado do grupo OB quando comparado com grupo CTL e OBEX (Figura 2B).



**Figura 2.** Cortes histológicos representativos do tecido hepático e escore total de atividade de DHEM. Imagens coradas por hematoxilina-eosina (A). Escore atividade de DHEM (n = 6) (B). Significância estatística: \* $p > 0,05$ .

### 3. O treinamento físico resistido de corrida atada reduz a expressão gênica e o conteúdo proteico de KLF-15 no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

A análise molecular de Real Time PCR quantitativo (RT-qPCR) evidenciou que os níveis de mRNA de *KLF-15* foram significativamente mais elevados no grupo OB em relação aos demais grupos (Figura 3A). Os resultados do conteúdo proteico corroboram com os resultados do RT-qPCR, demonstrando menor conteúdo de KLF-15 total (Figura 3B) e nuclear (Figura 3C) dos grupos CTL e OBEX quando comparado com o grupo OB. Além disso, não houve diferença estatística dos grupos experimentais em relação ao conteúdo de KLF-15 no citosol (Figura 3C).



**Figura 3.** Resultado das análises de Real Time PCR quantitativo e Western Blotting. Níveis de mRNA de *KLF-15* (A). Conteúdo relativo proteico de KLF-15 (B). Conteúdo proteico nuclear e citosólico de KLF-15 (C). Significância estatística: \* $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Este estudo investigou o impacto do exercício físico resistido de corrida atada sobre o desempenho, a homeostase glicêmica e o metabolismo hepático de camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica. O exercício resistido se mostrou eficiente em mitigar os impactos negativos da dieta rica em gordura. O protocolo de exercício físico adotado no estudo preveniu o aumento da ingestão alimentar e o ganho de peso nos camundongos. Além disso, o treinamento de corrida atada aumentou o desempenho e a força de preensão nas análises de Capacidade de Carga Máxima Voluntária (MVCC) e Teste de Força de Preensão (*Hand Grip*), realizadas ao longo do período experimental, onde o grupo OBEX apresentou níveis de desempenho significativamente maiores em relação aos demais grupos experimentais. Esses resultados indicam que, além de evitar o ganho de peso proveniente de uma alimentação rica em lipídeos, o exercício físico resistido também é capaz de aumentar a força e desempenho físico.

Em relação ao metabolismo da glicose, o protocolo de exercício resistido foi eficiente em prevenir o aumento dos níveis de glicemia de jejum, onde o grupo OB apresentou resultados significativamente superiores aos grupos CTL e OBEX, que não apresentaram diferença estatística entre eles. Ademais, no Teste de Tolerância à Insulina, o

grupo OB também obteve resultados de glicemia mais elevados que os outros grupos em todos os tempos de aferição. Esses resultados indicam que o protocolo de exercício resistido preveniu a hiperglicemia de jejum e a resistência à insulina dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

As análises histológicas evidenciaram um menor acúmulo de gordura no tecido hepático do grupo OBEX em relação ao grupo OB. No teste de escore total de atividade de DHEM, o grupo OB apresentou níveis significativamente maiores em todos os critérios do escore em relação aos grupos CTL e OBEX. Os resultados histológicos indicam que o exercício resistido preveniu o acúmulo hepático de gordura ocasionado pela dieta hiperlipídica. Em relação às análises moleculares, foi evidenciado maior nível de mRNA de *KLF-15* no grupo OB em relação aos demais, além de diferença significativa na localização subcelular de KLF-15, onde, por mais que o conteúdo proteico citosólico não apresentasse diferença entre os grupos, o conteúdo proteico nuclear se mostrou elevado no grupo OB, sugerindo uma maior atividade nuclear desse fator de transcrição no grupo experimental alimentado com dieta hiperlipídica que não foi submetido à intervenção de exercício resistido.

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o exercício físico resistido de corrida atada apresentou impactos positivos no peso corporal, homeostase glicêmica e prevenção da doença hepática esteatótica metabólica em camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica. Esses achados foram acompanhados por uma menor expressão gênica e conteúdo nuclear da proteína 15 similar a Kruppel no grupo experimental submetido ao exercício resistido em comparação com o grupo Obeso, sugerindo que em um contexto obesogênico, a regulação desse fator de transcrição está desequilibrada, promovendo maior lipogênese. Portanto, a redução no conteúdo proteico de KLF-15 no tecido hepático como resultado da prática de exercício resistido pode explicar, pelo menos em parte, a redução do acúmulo de gordura no fígado dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

## BIBLIOGRAFIA:

1. TUOMILEHTO, J. et al. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1343–1350, 2001.
2. NOCON, M. et al. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. **European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology**, v. 15, n. 3, p. 239–46, 2008.
3. SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. **Cell Metab**, v. 27, n. 1, p. 22–41, 2018.
4. NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic Steatohepatitis: An Evolving Diagnosis. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 4, p. 321–326, 2000.
5. MADAN, K.; SAWHNEY, J. P. S. Exercise and lipids. **Indian Heart Journal**, v. 76, p. S73-S74, 2024.
6. GRAY, S. H. et al. Regulation of Gluconeogenesis by Krüppel-like Factor 15. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 305–312, 2007.
7. LU, J.; DONG, L.; MONTGOMERY, M. K. The GR-KLF15 axis promotes suppression of hepatic lipogenesis during fasting. **The FEBS journal**, v. 291, n. 2, p. 256–258, 2023.
8. FERREIRA, M. M. Treinamento físico aeróbio e prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica: papel da lipogênese e do estresse de retículo no fígado. 2019. Dissertação (Mestrado em Atividade Física e Saúde) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.