



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Carolline Santos Miranda

**Efeitos da ativação do PPAR-alfa no remodelamento do tecido
adiposo marrom de camundongos alimentados com dieta rica em
lipídio ou frutose**

Rio de Janeiro
2020

Carolline Santos Miranda

**Efeitos da ativação do PPAR-alfa no remodelamento do tecido adiposo marrom
de camundongos alimentados com dieta rica em lipídio ou frutose**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M672 Miranda, Caroline Santos.

Efeitos da ativação do PPAR-alfa no remodelamento do tecido adiposo marrom de camundongos alimentados com dieta rica em lipídio ou frutose / Caroline Santos Miranda. – 2020.

76 f.

Orientadora: Vanessa de Souza Mello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Receptores de células - Teses. 2. PPAR alfa – Teses. 3. Tecido adiposo marrom - Teses. 4. Obesidade – Metabolismo - Teses. 5. Lipídios - Metabolismo – Teses. 6. Termogênese – Teses. 7. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Souza-Mello, Vanessa de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 577.25:616.399

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carolline Santos Miranda

**Efeitos da ativação do PPAR-alfa no remodelamento do tecido adiposo marrom
de camundongos alimentados com dieta rica em lipídio ou frutose**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Júlio Beltrame Daleprane
Instituto de Nutrição - UERJ

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

A minha família pelo exemplo de amor que são para mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho e dedicação ao educarem a mim e minha irmã. Vocês nos deram a vida e nos ensinaram a viver ela baseada em amor, respeito e união. Amo vocês!

A minha tia Sandra, que além de colaborar com meus estudos, me ajuda com ensinamentos diários a ser uma pessoa melhor, me sinto grata de ter você em minha vida e dedico grande parte dessa conquista a você, uma das minhas maiores incentivadoras.

A minha avó Norma, que se fez presente desde a minha infância com seu amor incondicional, você é a base da nossa família. Ao meu avô Antônio, que mesmo não estando presente fisicamente, me ensinou que desistir nunca é a solução e sempre será nossa maior referência de força e dedicação.

A minha irmã, pela amizade e amor, e a Nanda, por tornar tudo na minha vida mais leve, você me fez ter o sentimento mais puro e sua chegada floresceu nossa família.

Ao Caio, pelo companheirismo, amor e amizade durante esses 11 anos que estamos juntos. Obrigada por acreditar em mim e me dar forças nos momentos difíceis. Me sinto feliz de viver cada dia ao seu lado.

As minhas amigas da escola, que levarei para minha vida, em especial a Annie, que se tornou uma irmã que sempre pude confiar e a Brenda que sempre foi uma amiga presente e que hoje partilhamos além da vida pessoal, a vida científica.

As minhas amigas da faculdade (Adriana, Luna e Aline), por tornarem essa jornada ainda mais incrível.

Aos meus colegas de laboratório, pelos ensinamentos e pela ajuda, nada seria possível sem o auxílio que me deram, em especial (Thatianny Marinho, Tamiris Ingrid, Aline Penna e Fabiane Martins). A minha dupla Flávia, que me ajudou e continua me ajudando em todos os momentos. Aos orientados da Vanessa (Vanessetes), pela parceria e por compartilharem não só a orientadora comigo, mas também diversos sonhos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda e a Prof^a. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda, por me receberem no LMMC como aluna de

iniciação científica e monitora, e por contribuírem com o meu crescimento e com o desenvolvimento desse trabalho.

Ao corpo docente que integra o programa de pós-graduação, em especial a Prof^a. Dra. Sandra Barbosa que sempre incentiva e torce pelo crescimento dos alunos.

Aos técnicos e funcionários da UERJ por todo suporte oferecido.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Vanessa Souza-Mello, que me acompanhou desde a iniciação científica, que me acolheu para viver esse sonho, que me ensina e estimula diariamente a ser uma aluna e pessoa melhor. Você é um modelo para todos os seus alunos e me sinto grata por tudo que aprendi e aprendo estando ao seu lado.

A minha coorientadora Prof.^a Dra. Tamiris Rachid, que foi a minha inspiração desde quando fui sua IC em 2013, além de ótima profissional, se tornou uma amiga. Obrigada por partilhar seus conhecimentos e se fazer presente ao longo desses anos, seus conselhos e atitudes foram me guiando para chegar até esse momento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

MIRANDA, Carolline Santos. **Efeitos da ativação do PPAR-alfa no remodelamento do tecido adiposo marrom de camundongos alimentados com dieta rica em lipídio ou frutose.** 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos de um agonista seletivo do PPAR-alfa (PPAR α) sobre o remodelamento adverso do tecido adiposo marrom (TAM) (*whitening*) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose, com ênfase na termogênese, beta-oxidação (β -oxidação) e lipólise. Cinquenta animais foram designados aleatoriamente para receber dieta controle (C, 10% de lipídios como energia), dieta hiperlipídica (HF, 50% de lipídios como energia) ou dieta rica em frutose (HFRU, 50% de frutose como energia) por 12 semanas. Os grupos HF e HFRU foram redivididos para iniciar o tratamento de 5 semanas: C, HF, HF-a, HFRU e HFRU-a. O agonista PPAR α (WY-14643) foi misturado à dieta na dose de 3,5 mg/kg da massa corporal (MC). Foram realizadas as seguintes análises: MC, ingestão alimentar, TOTG, calorimetria indireta, termografia, microscopia de luz e confocal, análise plasmática e q-PCR. O grupo HF apresentou aumento da MC, enquanto os grupos HF e HFRU apresentaram intolerância oral à glicose e alterações metabólicas, as quais foram atenuadas pela ativação do PPAR α . Os grupos HF e HFRU apresentaram imunomarcagem reduzida de UCP1 e VEGFA, mas apenas o grupo HF apresentou um padrão de acúmulo de gotículas lipídicas que se assemelhava ao tecido adiposo branco (TAB), caracterizando o *whitening*. O *whitening* no grupo HF foi acompanhado pela diminuição da expressão de genes relacionados à termogênese, β -oxidação e lipólise. Todos esses foram aumentados pela ativação do PPAR α . Os grupos tratados também mostraram uma taxa de troca respiratória menor do que os não tratados, sugerindo que lipídios foram utilizados como combustível para a termogênese. Em conclusão, agonista do PPAR α reverteu o *whitening* do TAM interescapular (TAMi) e atenuou as alterações histológicas no grupo HFRU, induzindo a via termogênica, reduzindo o tamanho das gotículas lipídicas, além do aumento do estímulo adrenérgico e lipólise no grupo HF tratado.

Palavras-chave: PPAR-alfa. Tecido adiposo marrom. *Whitening*. Obesidade. Termogênese.

ABSTRACT

MIRANDA, Carolline Santos. **Effects of PPAR-alpha activation on brown adipose tissue remodeling in mice fed a high fat or fructose diet.** 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

This work aimed to analyze the effects of a selective PPAR-alpha agonist on the adverse remodeling of brown adipose tissue (TAM) (whitening) in mice fed a high fat or high fructose diet, with emphasis on thermogenesis, beta-oxidation and lipolysis. Fifty animals were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% lipid as energy), hyperlipid diet (HF, 50% lipid as energy) or high fructose diet (HFRU, 50% fructose as energy). 12 weeks The HF and HFRU groups were redivided to initiate 5-week treatment: C, HF, HF-a, HFRU and HFRU-a. The PPAR-alpha agonist (WY14643) was mixed with the diet at a dose of 3.5 mg/kg body mass (BM). The following analyses were performed: BM, food intake, OGTT, indirect calorimetry, thermography, light and confocal microscopy, plasma analyses and q-PCR. The HF group had overweight, while the HF and HFRU groups presented oral glucose intolerance and metabolic alterations, which were attenuated by PPAR α activation. The HF and HFRU groups showed reduced immunostaining of UCP1 and VEGFA, but only the HF group showed a pattern of lipid droplet accumulation that resembled white adipose tissue (TAB), characterizing whitening. Whitening in the HF group was accompanied by decreased expression of genes related to thermogenesis, β -oxidation and lipolysis. All of these were increased by PPAR α activation. The treated groups also showed a lower respiratory exchange rate than the untreated groups, suggesting that lipids were used as fuel for thermogenesis. In conclusion, the PPAR α agonist reversed the interscapular TAM (TAMi) whitening and attenuated the histological changes in the HFRU group, inducing the thermogenic pathway, reducing the size of lipid droplets, and increasing the adrenergic stimulus and lipolysis in the treated HF group.

Keywords: PPAR-alpha. Interscapular brown adipose tissue. Whitening. Obesity. Thermogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Eutrofia x Obesidade.....	18
Figura 2 - Causas da SM.....	20
Figura 3 - Metabolismo da frutose e malefícios do seu excesso.....	23
Figura 4 - Esquema com diferentes depósitos de gordura.....	26
Figura 5 - Mecanismo de ação do PPAR.....	32
Figura 6 - Desenho experimental.....	36
Quadro 1 - Composição nutricional das dietas experimentais.....	37
Quadro 2 - Detalhamento dos primers utilizados.....	42
Figura 7 - Evolução da Massa Corporal.....	43
Quadro 3 - Comportamento alimentar.....	44
Figura 8 - Quociente respiratório.....	45
Figura 9 - Distribuição de tecido adiposo branco e triacilglicerol plasmático....	46
Figura 10 - Curva glicêmica.....	47
Figura 11 - Área sob a curva.....	48
Figura 12 - Morfologia do TAMi.....	49
Figura 13 - Imunofluorescência para PPAR α e para UCP1 e imagens termográficas.....	50
Figura 14 - Imunofluorescência para VEGFA.....	51
Figura 15 - Expressão gênica por q-PCR no TA.....	54
Figura 16 - Resumo gráfico dos resultados.....	59

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASC	Área sob a curva do TOTG
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo alimentado com dieta controle
cDNA	DNA complementa
CPT1B	Carnitina palmitol transferase 1 B
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DIU	Obesidade induzida por dieta
DM2	Diabetes mellitus tipo 1
F1F	Frutose-1-fosfato
GE	Gasto energético
GLUT	Transportador de glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (High-fat)
HF-a	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (High-fat) tratado com PPAR- α
HFRU	Grupo alimentado com dieta rica em frutose
HFRU-a	Grupo alimentado com dieta rica em frutose tratado com PPAR- α
IMC	Índice de massa corporal
MC	Massa corporal
NRF1	Fator respiratório nuclear 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGC1 α	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PLIN1	Perilipina 1
PPAR	Receptor ativado por proliferação de peroxissoma
PPAR α	Receptores ativado por proliferador de peroxissoma alfa
PPERs	Elementos responsivos ao PPAR
q-PCR	PCR quantitativo em tempo real

QR	Quociente respiratório
RNAm	RNA mensageiro
R β 3A	Receptor beta-3 adrenérgico
SM	Síndrome metabólica
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Tecido adiposo marrom
TAMi	Tecido adiposo marrom interescapular
TFAM	Fator transcricional mitocondrial A
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
UCP1	Proteína desacopladora 1
VCO ₂	Volume de gás carbônico produzido
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VO ₂	Volume de oxigênio consumido

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	Obesidade	16
1.2	Síndrome metabólica	19
1.3	Frutose	21
1.4	Tecido adiposo	24
1.4.1	<u>Tecido adiposo marrom</u>	26
1.4.2	<u>Whitening</u>	28
1.5	PPAR	30
1.5.1	<u>PPARα</u>	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivo específico	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Animais e Dieta	35
3.2	Massa Corporal e Ingestão Alimentar	37
3.3	Teste de tolerância oral à glicose	38
3.4	Calorimetria Indireta	38
3.5	Termografia	39
3.6	Eutanásia	39
3.7	Análise Plasmática	39
3.8	Histologia do tecido adiposo marrom interescapular	40
3.9	Imunofluorescência	40
3.10	PCR quantitativo em tempo real	41
3.11	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Comportamento alimentar e Massa corporal	43
4.2	Calorimetria indireta	44
4.3	Distribuição de gordura e triacilgliceróis plasmático	45
4.4	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	46

4.5	Morfologia do TAMi.....	48
4.6	Imunofluorescência e termografia.....	50
4.7	PCR quantitativo em tempo real.....	51
5	DISCUSSÃO.....	55
	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A – Comitê de ética.....	75
	ANEXO B – Submissão do artigo.....	76

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença de caráter epidêmico no mundo, cuja prevalência vem aumentando nos países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (1). O consumo de açúcares refinados em alimentos e bebidas aumentaram de forma abundante nas últimas décadas e acredita-se que colabore de maneira importante para a atual epidemia de obesidade e doenças cardiometabólicas (2). A obesidade e, especialmente, o acúmulo excessivo de gordura intra-abdominal são as principais causas predisponentes para o desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) (3).

O ganho de peso excessivo proporciona a hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, secreção de adipocinas alteradas, redução da sensibilidade à insulina, mudança no perfil das células imunes residentes no tecido adiposo (TA) com resultante inflamação crônica de baixo grau (4). A descoberta recente de que uma grande fração de humanos adultos apresenta tecido adiposo marrom (TAM) fez com que estudos experimentais que ambicionam desvendar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade, ganhassem relevância científica (5).

O TAM apresenta o adipócito menor que o branco e possui várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos (multilocular), citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que produzem energia pela oxidação de ácidos (5). A coloração amarronzada do TAM é gerada por uma elevada presença de mitocôndrias. Além disso, tem sido demonstrado que a proteína desacopladora-1 (UCP1 ou termogenina) é um dos principais marcadores para a identificação do TAM (6, 7).

A partir do conhecimento de que o TAM é um potencial regulador da função metabólica sistêmica, estudos avaliaram o *browning* do TAB como uma estratégia para conter a obesidade (8-10). No entanto, tem sido argumentado que esta ação não é capaz de forma quantitativa de impactar significativamente para o metabolismo sistêmico, devido à capacidade termogênica diminuída desse *browning* quando comparados àquela expressa pelos depósitos clássicos do TAM (11).

Recentemente, estudos experimentais mostraram que a obesidade induzida por dieta resultou em intolerância à glicose e hipóxia funcional do TAM,

desencadeando o branqueamento (*whitening*) estrutural, acarretando uma mudança funcional da termogênese e no armazenamento de lipídios (12, 13). Porém, os mecanismos moleculares que influenciam na redução da atividade do TAM na obesidade e suas implicações fisiológicas são amplamente desconhecidos.

No sentido de propor uma estratégia para conter as alterações do TAM na obesidade, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-alfa (PPAR- α) em humanos é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e gordura marrom (14, 15). Atualmente, efeitos de agonistas PPAR- α vem sendo descritos no mecanismo do *browning* no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) favorecendo o aumento do GE e redução na massa corporal através da termogênese adaptativa, beneficiando assim modelos experimentais de obesidade (16).

Neste cenário, foi recentemente demonstrado que a ativação do PPAR- α por um agente farmacológico (fenofibrato) foi capaz de ativar a termogênese adaptativa e a biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom interescapular (TAMi) de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por um período que não foi capaz de promover o *whitening* nesse tecido (17). No sentido de testar um possível efeito da ativação seletiva do PPAR- α na reversão do *whitening* do TAM, avaliamos no presente estudo os efeitos de um tratamento crônico com o agonista seletivo WY14643 no remodelamento adverso do TAM causado pelo consumo excessivo de lipídio ou frutose na dieta de camundongos C57BL/6 por um tempo maior que o anteriormente utilizado.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Obesidade

A obesidade é considerada um agravo de caráter multifatorial decorrente de balanço energético positivo que favorece o acúmulo de gordura, associado a riscos para a saúde devido à sua relação com complicações metabólicas. Já existe uma descrição aprofundada na literatura que o excesso de peso e obesidade contribuem para o aumento da mortalidade por sua associação com doenças crônicas não transmissíveis como diabetes tipo 2 (DM2) (18), doenças cardiovasculares (DCV) (19), câncer (20), e hipertensão (21). Entre as causas da obesidade, estão relacionados fatores biológicos, históricos, econômicos, sociais, culturais, entre outros (22).

Sendo assim, é considerada uma doença de caráter epidêmico no mundo cuja prevalência vem aumentando nos países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (1). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 2015 e 2016, aproximadamente dois bilhões de indivíduos adultos possuíam sobrepeso, sendo um terço desse grupo portador de obesidade - esse valor representa cerca de 13% da população mundial acima de 18 anos (23).

No Brasil, os dados relativos ao crescimento da prevalência de sobrepeso e obesidade são igualmente preocupantes. O último Vigitel Brasil (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico) realizado em 2018 pelo Ministério da Saúde (24), a frequência de excesso de peso foi de 55,7%, sendo maior entre homens (57,8%) do que entre mulheres (53,9%) e a frequência de adultos obesos foi de 19,8%, sendo ligeiramente maior entre as mulheres (20,7%) do que entre os homens (18,7%).

Diversos estudos demonstraram que a obesidade causa inflamação sistêmica através da ação de vários mecanismos. Os depósitos de TA contêm múltiplas células imunes que se encontram exacerbadas na obesidade. Um exemplo, são os macrófagos que apresentam um fenótipo pró-inflamatório e secretam citocinas, como TNF- α (25). Assim, a secreção dessa citocina é um dos mecanismos que causam inflamação sistêmica em camundongos (26).

Vários parâmetros de avaliação são utilizados com o intuito de determinar de forma adequada quais pessoas com sobrepeso ou obesidade correm risco de sérias consequências para a saúde (27). As formas de avaliação facilmente aplicáveis são as medidas antropométricas, como a mensuração da MC total, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril ou cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) (28). O IMC é o indicador mais utilizado para avaliar o grau de obesidade, tendo como principal vantagem a possibilidade de ser interpretado em correlação com dados de referências nacionais dos níveis de adiposidade, morbidade, mortalidade em adultos (29).

No entanto, o IMC sozinho não fornece informações sobre a composição corporal e respectiva contribuição de massa livre de gordura ou massa gorda para o peso corporal, sugerindo a utilização de indicadores adicionais para avaliar adiposidade central em pessoas com sobrepeso e obesidade. A circunferência da cintura é um indicador do TA visceral, mas também inclui gordura abdominal subcutânea que diminui sua sensibilidade para prever complicações relacionadas à obesidade (28).

Nas últimas décadas, a população vem aumentando o consumo de alimentos com elevada densidade energética, alta palatabilidade, baixo poder sacietógeno e de fácil absorção e digestão. Esses atributos favorecem o aumento da ingestão alimentar e, portanto, contribuem para o desequilíbrio energético (30). Prevenir precocemente a obesidade se torna muito importante para a promoção da saúde e redução de morbimortalidade, não só por ser um fator de risco importante para diversas doenças, mas também por interferir na expectativa e qualidade de vida (23).

Muitas estratégias de perda de peso têm sido tentadas, porém perder peso e mantê-lo é extremamente difícil na maioria dos casos. O emagrecimento está diretamente relacionado ao quadro de balanço energético negativo, caracterizado pela redução na ingestão alimentar em relação ao gasto energético. O balanço energético positivo causa um desequilíbrio no organismo, ocasionando um estoque de energia em excesso em forma de gordura e causando um aumento da MC total (31, 32).

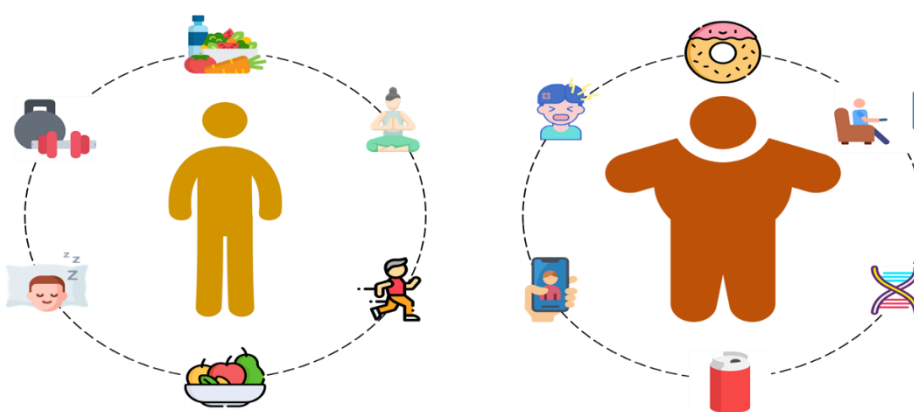
Para o tratamento da obesidade, e conseqüente redução dos riscos de doenças associadas, é importante que se reduza a MC. As atuais estratégias de manejo da obesidade e transtornos relacionados à obesidade são classificadas em

três categorias principais: mudanças de estilo de vida, terapia farmacológica e cirurgia bariátrica (33). Modificação do estilo de vida envolve uma combinação de mudanças comportamentais, dieta e atividade física (34, 35).

Sendo assim, dietas com restrições calóricas e aumento na atividade física diária são as medidas de primeira linha para o tratamento da obesidade, mas exigem um período de meses para obter os primeiros resultados significativos. A adição de medicamentos antiobesidade às intervenções no estilo de vida aumenta a perda de peso em cerca de 3% a 5% em comparação com dieta ou exercícios isolados (36).

A dieta saudável ideal é a que compreende o equilíbrio dos macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios), bem como, os micronutrientes e vitaminas necessários para o organismo. Para o sucesso do tratamento dietético, devem-se manter mudanças na alimentação por toda a vida. Um planejamento alimentar flexível, que objetive reeducação, geralmente obtém mais sucesso, devendo considerar, além da quantidade de calorias, as preferências alimentares do indivíduo, o aspecto financeiro, o estilo de vida e o requerimento energético para a manutenção da saúde (Figura 1) (30).

Figura 1 - Eutrofia x Obesidade



Nota: Esquema representativo de fatores que podem atenuar a obesidade como uma alimentação equilibrada, atividade física e sono adequado. À direita, observamos fatores que podem causar a obesidade como alimentação baseada em bebidas açucaradas e *fast-food*, sedentarismo, estresse e genética.

Fonte: A autora, 2019.

O modelo experimental mais utilizado para estudos em obesidade e SM em geral são camundongos da linhagem C57BL/6, que são mais adequados, pois quando alimentados com dieta hiperenergética (que mimetiza as dietas ocidentais),

desenvolvem obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão semelhante à de humanos. Esse modelo é conhecido como “obesidade induzida por dieta” (DIO) e é utilizado em larga escala na literatura científica (37).

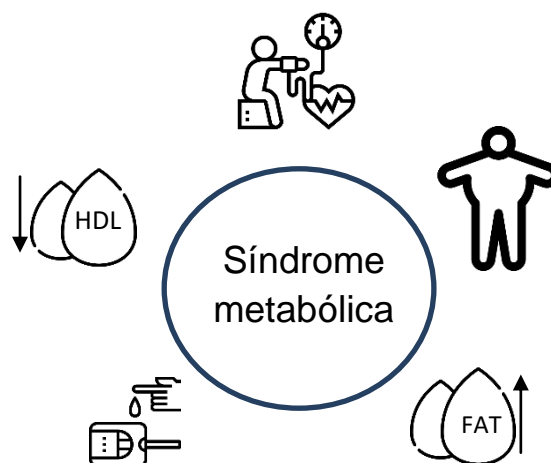
1.2. Síndrome metabólica

Atualmente, a SM é reconhecida como uma entidade nosológica pela OMS (38). Esta síndrome é diagnosticada pela concordância de pelo menos três das seguintes doenças: obesidade, pressão arterial elevada, resistência à insulina, triacilgliceróis (TAG) séricos elevados e lipoproteína de alta densidade (HDL-C) baixa. Na última década, a prevalência de SM aumentou de forma acentuada (39). Os eventos da SM estão intimamente relacionados e frequentemente iniciam e se agravam em paralelo (40).

As modificações ocorridas nos padrões socioeconômicos e culturais das populações, conseqüentes da rápida urbanização e do desenvolvimento econômico, resultaram em mudanças significativas nos hábitos de vida dos diferentes grupos da população (41). Essa nova forma de organização da sociedade, em adição à transição alimentar e ao envelhecimento populacional, promoveu transformações na maneira de adoecer das pessoas, aumentando a morbimortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (42).

No que se refere às DCV, a presença concomitante de fatores de risco, como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes, resistência insulínica e deposição central de gordura está associada ao aumento de aproximadamente 2,5 vezes no risco de morbimortalidade cardiovascular (IDF, 2006). Esse conjunto de fatores predisponentes das DCV constitui a condição definida como SM (Figura 2) (43).

Figura 2 - Causas da SM



Nota: Esquema representativo de fatores que estão envolvidos no surgimento da SM.

Fonte: A autora, 2019.

Os critérios diagnósticos mais utilizados são os da OMS (44) e os do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) (OMS, 2000), e algumas diferenças entre eles são observadas. A definição da OMS requer a avaliação da resistência à insulina ou do distúrbio do metabolismo da glicose. Por outro lado, a definição da NCEP-ATP III não exige a mensuração de resistência à insulina, facilitando sua utilização em estudos epidemiológicos (45).

A obesidade e, especialmente, o acúmulo excessivo de gordura intra-abdominal são os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento da SM. (3). Além disso, outras comorbidades relacionadas à obesidade podem contribuir para o desenvolvimento da SM como distúrbios endócrinos, problemas respiratórios, DCV, transtornos de humor e certos tipos de câncer (46).

Tanto a prevalência não ajustada quanto a prevalência ajustada pela idade cresceram de acordo com o NHANES III e o NHANES 1999–2006 (47). No Brasil, aproximadamente 9% da população brasileira apresentou a condição de SM, de acordo com a definição de harmonização dos consensos (43). Um estudo revelou dados preocupantes, ao contabilizar que somente 23,8% da população não apresenta nenhum dos componentes da SM, e que 67,3% apresentam entre um e dois componentes para caracterizar este desfecho, o que demonstra elevado número de indivíduos sob o risco de desenvolver a SM propriamente dita (48).

Outros trabalhos em diversas populações, como a mexicana, norte-americana e asiática, revelam prevalências elevadas da SM, dependendo do critério utilizado e das características da população estudada, variando as taxas de 12,4% a 28,5% em homens e de 10,7% a 40,5% em mulheres (37, 49-51).

O grande interesse no estudo da SM nas últimas décadas tem auxiliado para o entendimento da sua fisiologia integrativa complexa e as suas consequências (52). As mudanças nos hábitos alimentares nas últimas décadas estão entre os principais fatores que colaboram para a crescente prevalência da SM no mundo. Tais mudanças são caracterizadas pelo aumento da ingestão alimentar de gordura e açúcares refinados, particularmente a frutose (19). Uma dieta persistente com alto teor de frutose pode levar a resistência à insulina, obesidade abdominal e hiperlipidemia. A adição de frutose na dieta é usada de forma extensiva para estabelecer modelos de SM e conseqüentemente sua investigação (53, 54).

1.3. Frutose

A frutose, também conhecida como levulose, é um açúcar bastante solúvel e o mais doce dos açúcares simples – classificada como monossacarídeo (55). O consumo de açúcares refinados em alimentos e bebidas cresceu acentuadamente nas últimas décadas e, acredita-se, que contribua de maneira importante para a atual epidemia de obesidade e doenças cardiometabólicas (2).

Embora a frutose, em virtude de suas baixas respostas glicêmicas e insulínicas pós-prandiais (isto é, baixo índice glicêmico) e maior termogênese pós-prandial do que a glicose, seja inicialmente considerada aconselhável para pacientes diabéticos e benéfica para o controle de peso, é hoje considerada o açúcar mais nocivo (56). De fato, o alto consumo de frutose cronicamente em substituição à glicose na dieta mostrou levar a um perfil lipídico mais adverso e a maiores riscos para obesidade central, DM2 e DCV (56, 57).

Até a década de 1960, a sacarose era considerada quase que um adoçante exclusivo, porém a indústria alimentícia desenvolveu tecnologias que permitiram extrair o amido do milho promovendo a hidrólise e a sua conversão em glicose, sendo parte desta glicose convertida em frutose através de isomerização enzimática

e isso resultou na produção de adoçantes derivados de milho, entre os quais o xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS). O HFCS é muito utilizado em produtos industrializados por apresentar baixo custo e um alto poder adoçante, ele está presente em doces, pães, bebidas adoçadas e temperos prontos, sendo a principal forma da ingestão excessiva da frutose pela população (57).

Antes da industrialização de alimentos, o consumo médio de frutose era de 15g de frutose por dia, porém atualmente o consumo médio de um adolescente é de 72,8g/dia, isso porque a frutose tem sido utilizada em diversos alimentos e, assim, tem aumentando drasticamente o seu consumo nas últimas décadas. As pesquisas mostram que o alto consumo de frutose (maior que 50g/dia) pode estar relacionado com o desenvolvimento da SM (58).

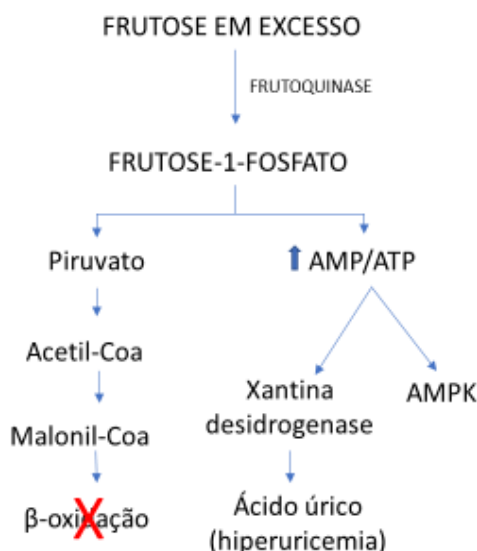
A frutose é absorvida no enterócito por seus receptores de transporte de glicose (GLUT) 5, localizados no polo apical da célula. Posteriormente, segue para a circulação porta através de seus receptores GLUT2 na superfície basolateral do enterócito, sendo, conduzida ao fígado onde sofrerá sua metabolização (59). Ao entrar no hepatócito por seus receptores GLUT2, a frutose é fosforilada a frutose-1-fosfato (F1F) por ação da frutoquinase. A frutoquinase não é inibida pela adenosina difosfato (ADP) ou por concentrações de citrato e, assim, não é regulada pelo estado energético celular.

Nesse sentido, a frutose difere da glicose, já que tanto o ADP quanto as concentrações de citrato exercem um feedback negativo sobre as enzimas dos passos iniciais da glicólise. Consequentemente, a falta do feedback negativo faz com que, possivelmente, toda a frutose ingerida seja rapidamente convertida em F1F (57). A rápida conversão de frutose em F1F conduz a um desequilíbrio entre adenosina monofosfato (AMP) e adenosina trifosfato (ATP), aumentando a razão AMP/ATP. O destino deste AMP é definido por duas enzimas: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a xantina desidrogenase. Quando a xantina desidrogenase é mais ativa que a AMPK, o AMP é convertido em ácido úrico, gerando hiperuricemia, uma das condições encontradas na SM (60).

Além da formação de ácido úrico, a frutose é incorporada na via glicolítica após sua fosforilação. O excesso de frutose gera um aumento da produção de acetil-Coa que acaba excedendo a habilidade do ciclo tricarboxílico de metabolizá-la. O excesso de acetil-Coa no citoplasma é utilizado como um substrato para a lipogênese de novo. Essa molécula é convertida pela Acetil-Coa Carboxilase (ACC)

em malonil-Coa que inibe a β -oxidação mitocondrial, como observado na Figura 3 (61).

Figura 3 - Metabolismo da frutose e malefícios do seu excesso



Legenda: Aadenina trifosfato (ATP); adenina difosfato (ADP); adenina monofosfato (AMP); proteína quinase ativada por AMP (AMPK); transportador de glicose 2 (GLUT2); frutose-1-fosfato (F1F).

Nota: Esquema da metabolização da frutose. Ao entrar no hepatócito pelo GLUT2, a frutose é rapidamente metabolizada pela frutoquinase em frutose-1-fosfato (F1F). A grande atividade da frutoquinase diante do excesso de frutose leva a um aumento da razão AMP/ATP que resulta na formação de ácido úrico pela xantina desidrogenase, podendo levar a hiperuricemia. De maneira semelhante, a F1F segue a via glicolítica até a formação do piruvato, o excesso de frutose leva a uma intensa formação de acetil-Coa no interior das células. Esse acetil-CoA é convertido em malonil-CoA que inibe diretamente a β -oxidação. Adaptado de (Tappy e Le, 2010).

Fonte: A autora, 2019.

Em modelos animais, o consumo crônico de frutose foi associado ao aumento da concentração sanguínea de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 18 (IL-18), TNF. A elevação de IL-1, IL-6, IL-18 e da expressão de TNF,

molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e enzima mieloperoxidase (MPO) foi observada no tecido renal. No tecido hepático, foi verificado aumento da quantidade de neutrófilos e ICAM-1. Destaca-se também a diminuição das concentrações de adiponectina e a elevação de leptina plasmática associadas à oferta da frutose (62).

Na prática nutricional, a ingestão moderada de frutose, presente nos alimentos naturais, tem efeitos benéficos a partir da sua utilização como elemento energético (63). Torna-se importante destacar que o crescente aumento no uso de frutose como adoçante em produtos industrializados faz com que exista a possibilidade de produzir lipídios por meio dos seus compostos intermediários como o glicerol e o gliceraldeído, acarretando um aumento dos lipídios plasmáticos (64).

Embora venha ocorrendo o acentuado aumento da obesidade e consumo de frutose na população, não há evidências diretas relacionando a obesidade à ingestão de quantidades fisiológicas de frutose em seres humanos ($\leq 100\text{g/dia}$). O consumo de uma dose moderada de frutose ($\leq 50\text{g/dia}$ ou aproximadamente 10% do total de calorias da dieta) parece não provocar qualquer efeito deletério na concentração de TAG em jejum e pós-prandial, controle glicêmico e resistência à insulina (65).

1.4. **Tecido adiposo**

As espécies animais precisam garantir a sobrevivência sob condições agravantes. Os vertebrados e mamíferos em particular, por apresentarem TA, possuem a capacidade de armazenar o excesso de energia como lipídios na forma TAG (66). O TA exerce um papel central no balanço energético, sendo importante na gênese da obesidade (67).

Nos mamíferos, existem dois tipos de TA: TAB e TAM. Os adipócitos destes tecidos possuem diferenças importantes. Sabe-se que, conforme a origem do TA (por exemplo, gonadal ou subcutâneo), ocorrem diferenças na sua capacidade lipolítica ou lipogênica. O tecido gonadal, em roedores em geral, foi amplamente utilizado como padrão para avaliar respostas induzidas por condições normais ou patológicas por mimetizar a gordura abdominal humana (66).

Os adipócitos são as únicas células que possuem especialização para armazenar lipídios, sem que isso comprometa a sua integridade funcional. Possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos e estocar TAG, quando a oferta de energia for abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit energético (67).

O sistema nervoso autônomo atua diretamente sobre o TA. O sistema nervoso simpático (SNS) promove ações catabólicas (lipólise), via estimulação adrenérgica, que ativa a enzima lipase hormônio-sensível (LHS) (68). O sistema nervoso parassimpático (SNP) promove ações anabólicas por estimular a secreção de insulina, aumentando a captação de glicose e de ácidos graxos que podem ser estocados sob a forma de TAG (69).

Os adipócitos não são responsáveis somente pelo metabolismo e acúmulo de gordura, mas também possuem funções secretoras de caráter autócrino, parácrino e endócrino (7). O ganho de peso excessivo promove a hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, secreção alterada de adipocinas (perfil pró-inflamatório), diminuição da sensibilidade à insulina, e mudança no perfil das células imunes residentes no TA, o que leva a uma inflamação crônica de baixo grau (4).

Em relação às diferenças entre os adipócitos, já foi observado que o adipócito branco maduro armazena TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa a porção central da célula, o que promove o deslocamento do núcleo para a periferia e seu conseqüente achatamento. A existência de uma única gotícula lipídica, a qual ocupa entre 85-95% do volume celular, caracteriza o adipócito branco como unilocular (70, 71).

Já o TAM apresenta o adipócito menor que o branco, os quais possuem várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos (multilocular), citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que produzem energia pela oxidação de ácidos (5).

Os adipócitos beges, descritos como um novo tipo celular, foram descobertos no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) e possuem as propriedades e características oxidativas do TAM. São, portanto, células que constituem um tecido especializado no gasto energético, mediante variados estímulos. São originados frente a estímulo adrenérgico, através de transdiferenciação de pré-adipócitos brancos ou da diferenciação a partir de pré-adipócitos beges, não possuindo precursor comum com os adipócitos marrons (10, 72).

Recentemente, os adipócitos beges foram descritos como um novo tipo celular presentes no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) – processo conhecido como amarronzamento (*browning*) – e possuem as propriedades e características oxidativas do TAM. São, portanto, células que constituem um tecido especializado no gasto energético, mediante variados estímulos. São originados frente a estímulo adrenérgico, através de transdiferenciação de pré-adipócitos brancos ou da diferenciação a partir de pré-adipócitos beges, não possuindo precursor comum com os adipócitos marrons (10, 72). A Figura 4 esquematiza os tecidos adiposos branco, marrom e bege.

Figura 4 - Esquema com diferentes depósitos de gordura



Nota: Esquema representativo dos respectivos tecidos adiposos, e suas configurações estruturais.

Fonte: A autora, 2019.

A recente descoberta de que uma grande fração de humanos adultos apresenta TAM fez com que estudos experimentais que ambicionam desvendar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade, ganhassem relevância científica (73).

1.4.1. Tecido adiposo marrom

O TAM, especializado na produção de calor - termogênese - está praticamente ausente em humanos adultos, mas é encontrado em fetos e recém-nascidos. Foi inicialmente descrito pela sua função em mamíferos hibernantes e

crianças, dada sua capacidade de liberação de calor para manutenção da temperatura corporal em resposta ao frio (10, 74).

Os adipócitos marrons têm origem a partir de células progenitoras de miócitos (células musculares), chamadas de mioblastos, que expressam o fator miogênico 5 positivo (Myf5+) (75). Além disso, esse tecido é altamente vascularizado e innervado pelo SNS. A localização clássica do TAM em humanos é na região interescapular, e podendo ser encontrado em sítios cervicais, paravertebrais e perirrenais em menor quantidade (10, 76-78).

Além disso, o TAM ainda desempenha papéis autócrinos, parácrinos e endócrinos. Dentro de seu papel autócrino, o TAM pode secretar proteína de membrana basal, como o colágeno IV e fibronectina (79, 80). Ademais, pode sintetizar e secretar adiposina (também conhecida como fator de complemento D), fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento semelhante à insulina I, prostaglandinas e adenosina (81, 82). No que tange à sua função parácrina, o TAM pode secretar o fator de crescimento nervoso, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o óxido nítrico e o angiotensinogênio (83, 84). Por último, como órgão endócrino, produz ácido graxo, e somente em circunstâncias especiais, produz leptina, adiponectina e resistina (85).

Já foi descrito que a coloração amarronzada do TAM é acarretada por uma elevada presença de mitocôndrias. Tem sido demonstrado que a UCP1 é um dos principais marcadores para a identificação do TAM (6, 7). A UCP1 se encontra na membrana mitocondrial interna, atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de ATP e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (5).

A termogênese acontece através de estímulos a receptores adrenérgicos constantes (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1). Em seguida, inicia-se uma cascata de reações que se seguem com o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ativação da proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) e indução da lipólise. Os ácidos graxos livres (AGLs), por sua vez, ativam uma série de marcadores que levam à ativação da proteína efetora da termogênese, a UCP1. (78, 86-89).

Embora, a massa total de TAM em mamíferos seja pequena, pesquisas anteriores já demonstraram que sua estimulação poderia quadruplicar o gasto

energético (GE) de um animal, à medida que ocorre um aumento na perfusão tecidual (73, 90, 91). Não somente a gordura armazenada em suas gotículas lipídicas é usada para gerar calor, mas também AGLs e glicose da circulação sistêmica, aumentando exponencialmente sua capacidade termogênica (73).

Para sustentar sua atividade metabólica oxidativa, o TAM utiliza vastas quantidades de nutrientes intracelulares e circulantes (92), fazendo com que a sua atividade exerça efeitos metabólicos benéficos sobre a obesidade (92), resistência à insulina (93) e aterosclerose (94, 95). Durante a aclimatação ao frio, o TAM sofre um processo de recrutamento adaptativo e o tecido cresce em tamanho e em capacidade metabólica total. Esse processo envolve tanto a diferenciação de novos adipócitos quanto o aumento da atividade metabólica dos adipócitos existentes (74, 96, 97).

1.4.2. Whitening

Com base na crescente percepção de que o TAM é um potencial regulador da função metabólica sistêmica, estudos analisaram o *browning* do TABs, como uma estratégia para combater a obesidade (8-10). No entanto, tem sido argumentado que estas ações são quantitativamente incapazes de impactar de forma significativa para o metabolismo sistêmico, devido à baixa capacidade termogênica desse “amarronzamento” em relação àquela exibida pelos depósitos clássicos do TAM (11).

Recentemente, estudos experimentais relataram que a obesidade induzida por dieta resultou em intolerância à glicose, hipóxia funcional do TAM e consequentemente no “branqueamento” estrutural que resultou em uma mudança funcional da termogênese e armazenamento de lipídios (12, 13). Contudo, os mecanismos moleculares que levam à redução da atividade do TAM na obesidade e suas implicações fisiológicas são amplamente desconhecidos.

Estudos mostram que adultos humanos possuem 50-80 g de TAM ativo. A exposição aguda ao frio (18°C por 3 h) aumenta a captação de glicose e ácidos graxos por esse tecido, o que está relacionado ao aumento do gasto energético em seres humanos (98). A exposição crônica à temperatura fria também possui relação

com o recrutamento de novas mitocôndrias em humanos e, conseqüentemente, com o aumento da termogênese adaptativa (99).

Em camundongos alimentados com dieta padrão e mantidos à temperatura ambiente, os adipócitos brancos e marrons são encontrados em vários depósitos subcutâneos e viscerais (100). Porém, no órgão adiposo de animais e humanos obesos, adipócitos marrons são dificilmente encontrados, pois a maioria passa por uma conversão pouco explicada para um fenótipo “branco” (101, 102). Esse *whitening* pode ocorrer por alguns mecanismos, como: baixa atividade do SNS (74, 103), cuja sinalização noradrenérgica é essencial para a manutenção do fenótipo marrom (104, 105), a atividade da enzima lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) que é fundamental para a morfologia e função normais do TAM (106, 107), temperatura ambiente (74, 103), entre outros.

O impacto da temperatura ambiente na infiltração de macrófagos no TAMi, em estudos experimentais anteriores em camundongos magros aclimatados a temperaturas frias (6°C) e quentes (28°C), mostraram que o TAMi de camundongos aclimatados ao frio era composto de adipócitos multiloculares típicos que apresentavam uma alta imunorreatividade à UCP1. Em contraste, o TAMi de camundongos magros mantidos a 28°C, adquiriram um fenótipo de adipócito unilocular tipo branco e esse *whitening* envolveu aumento da infiltração de macrófagos (108).

Em comparação com o TAB, o TAM é mais extensivamente vascularizado, e a angiogênese dependente do VEGFA tem se mostrado importante para a resposta termogênica (109). O *whitening* já foi associado à perda da vascularização das mitocôndrias e no desenvolvimento de hipóxia. Tem sido demonstrado que o microambiente hipóxico no TAM, devido à obesidade, leva a uma perda acelerada de mitocôndrias e, à medida que a capacidade oxidativa é perdida, as gotículas lipídicas se acumulam, gerando o fenótipo branco (12).

A sinalização β -adrenérgica é reconhecida como um ativador central da expressão de VEGFA em adipócitos marrons (110). Vários estudos associaram a vascularização do tecido adiposo à homeostase metabólica sistêmica (111-117). A maior parte destes estudos concentrou-se na vascularização do TAB e o papel da vascularização do TAM no controle metabólico sistêmico não foi investigado profundamente. Em uma comparação, a ablação de VEGFA nos tecidos adiposos

tem mostrado afetar predominantemente o TAM, mas tem efeitos mínimos sobre o TAB (12).

Recentemente, foi feita uma projeção de que a presença de 63g de TAM com atividade termogênica na região cervical de indivíduos adultos é capaz de evitar o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano (118). Logo, a descoberta de fármacos que ativem a termogênese adaptativa e combatam o *whitening* são pertinentes para o controle do sobrepeso e/ou comorbidades associadas.

1.5. PPAR

Os PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) são uma família de fatores de transcrição ligados ao metabolismo celular de lipídios, carboidratos, proteínas e proliferação celular, existentes em três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Os PPARs são moléculas compactas, possuindo, o PPAR α , 468 resíduos de aminoácidos comparados com 441 do PPAR β/δ e 479 do PPAR γ , sendo encontrados em diversas espécies animais, desde o *Xenopus laevis* até o ser humano (119).

O termo “ativadores de proliferação peroxissomal” foi utilizado inicialmente para designar este grupo de fatores que tinham em comum a promoção da proliferação de peroxissomos, que foi primeiramente reportada em ratos tratados com clofibrato em 1960 (120).

O PPAR α é predominantemente expresso no fígado, músculo e coração e sua ativação, segundo estudos já realizados, sugere uma participação desse receptor no metabolismo lipídico. O PPAR γ é expresso principalmente nos tecidos adiposo branco e marrom, sendo responsável, dentre outras funções, pela lipogênese. Enfim, o PPAR β/δ apresenta uma ampla distribuição corporal com diversas funções como a oxidação de ácidos graxos no músculo e regulação geral de energia (119).

A utilização de agonistas dos PPARs tem sido descrita na literatura com efeitos benéficos sobre a ingestão alimentar, massa corporal, mobilização da deposição de gordura e sobre a esteatose pancreática e hepática, geradas a partir da administração de diferentes dietas (121, 122).

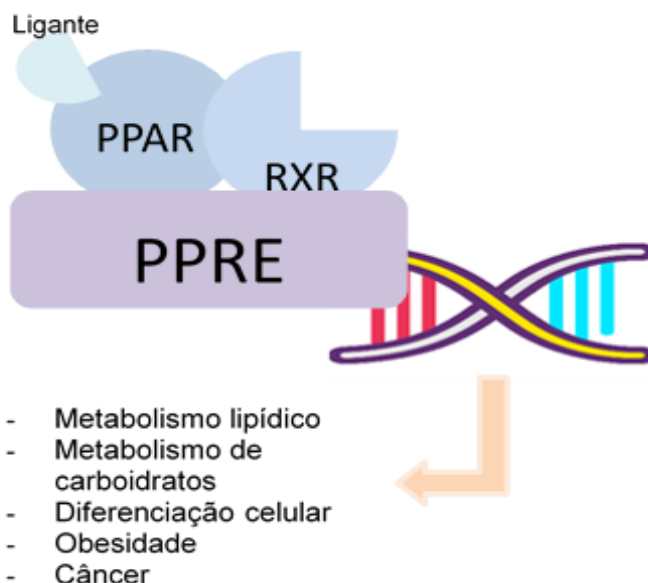
As maiores atividades fisiológicas dos PPARs estão ligadas à transcrição dos seus genes alvo e, desta forma, regulam o metabolismo lipídico, a homeostase da glicose, diferenciação celular, obesidade e câncer. Além disso, os PPARs podem participar diretamente de respostas imunológicas e dos mecanismos de inflamação (123).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR, em que X pode ser α , β/δ ou γ) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes-alvo. Esse mecanismo de ação dos PPARs é conhecido como o mecanismo de trans-ativação (Figura 5).

Em situações específicas, a ação dos PPARs também pode depender de vários fatores como a sua expressão relativa, a região promotora do gene estar ou não acessível e a presença de cofatores de ativação, como o PGC1 α , que é o co-ativador de PPARs mais descrito na literatura (124).

Além dessa forma de ação, os PPARs podem regular a expressão gênica independentemente de ligação ao PPREs, através do mecanismo de trans-repressão. Existe um *cross-talk* entre os PPARs e outros fatores de transcrição que influencia e regula a expressão gênica deles, e a maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos PPARs podem provavelmente ser explicados por esse mecanismo (125, 126).

Figura 5 - Mecanismo de ação do PPAR



Legenda: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs); Receptor X retinóide (RXR); Elementos responsivos ao PPAR (PPREs).

Nota: Ligação do PPAR ao RXR e PPER codificando a transcrição de genes alvo envolvidos em diversas rotas metabólicas.

Fonte: A autora, 2019.

1.5.1. PPAR α

O PPAR α foi o primeiro receptor descoberto, inicialmente visto em sapos, depois em ratos, coelhos e humanos. Em humanos, este receptor foi mapeado no cromossomo 22q12-13.1 e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e gordura marrom (14, 15).

Este receptor possui como ligantes naturais os ácidos graxos poli-insaturados e os leucotrienos, que são importantes mediadores inflamatórios; como ligantes farmacológicos, a família das drogas hipolipidêmicas (“fibratos”) é considerada um importante agonista PPAR α (127).

A ativação de PPAR α tem relação com o aumento do HDL e diminuição do LDL e TAG plasmáticos. Além disso, o PPAR α atua diretamente sobre a β -oxidação hepática, estimulando a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que

participam desse processo. Já foi visto que a expressão de CPT1 é extremamente aumentada com a ativação desse receptor (128, 129).

A participação do PPAR α na via termogênica passa pelo direcionamento dos AGLs, gerados após estímulo adrenérgico, para a via de β -oxidação, ao invés do direcionamento ao efluxo celular. Em condições normais, a maioria dos AGLs mobilizados através do estímulo β -adrenérgico acaba sendo liberado da célula, e acredita-se que essa mobilização tenha relação com a resposta inflamatória e com a redução da função celular a longo prazo. O estímulo crônico ao receptor beta-3 adrenérgico (R β 3A) regula positivamente a expressão de PPAR α , o que resulta em capacidade de oxidação aumentada no interior dos adipócitos (88).

A ativação do PPAR α ocorre principalmente sob privação de energia, conduzindo à regulação positiva do metabolismo energético intracelular, o que induz a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa (130). O catabolismo de ácidos graxos mediado por PPAR α é crucial para a síntese de vários metabólitos a serem usados como fontes de energia por outros tecidos, tais como corpos cetônicos no cérebro (131).

Um estudo anterior mostrou que o tratamento com WY-14643 (agonista PPAR α) apresentou efeitos lipolíticos com redução da massa gorda e aumento da oxidação de gordura no corpo todo. Estes resultados demonstram um novo papel da ativação do PPAR α na regulação beta-adrenérgica da lipólise do tecido adiposo (132). Além disso, o tratamento com WY-14643 já mostrou efeitos na diminuição da esteatose hepática, insulina sérica e inflamação no tecido adiposo, sendo essas alterações geralmente observadas em um quadro de obesidade (133, 134).

Neste cenário, foi recentemente demonstrado que a ativação do PPAR α por um agente farmacológico (fenofibrato) foi capaz de ativar a termogênese adaptativa e a biogênese mitocondrial no TAM de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por um período que não foi capaz de promover o *whitening* nesse tecido (135). Considerando o exposto, a hipótese do nosso trabalho é que a ativação do PPAR α , por ativar a via termogênica e a transcrição de genes relacionados a efeitos anti-inflamatórios e promotores do metabolismo lipídico mitocondrial (17), pode conter o *whitening* do TAM de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou frutose.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos de um agonista seletivo do PPAR-alfa sobre o remodelamento adverso do tecido adiposo marrom (*whitening*) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose, com ênfase na termogênese, beta-oxidação e lipólise.

2.2. Objetivos específicos:

- a) avaliar os efeitos do excesso de frutose e de lipídios sobre a MC, distribuição de gordura corporal, metabolismo lipídico e tolerância oral à glicose;
- b) examinar o efeito das dietas e do tratamento sobre a morfologia do TAM;
- c) determinar a expressão gênica de fatores implicados nas vias que podem contrapor o remodelamento adverso do TAM: termogênese, beta-oxidação e lipólise;
- d) utilizar a microscopia confocal a fim de caracterizar focos de termogênese ativada pela marcação da UCP1 (proteína efetora da termogênese) e VEGFA (relacionada à vascularização e estímulo adrenérgico no TAM).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Dieta

Os procedimentos realizados ocorreram de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996), além de seguirem as normas impostas no mundo e no Brasil e serem aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/041/2018.

Cinquenta camundongos C57BL/6 machos foram obtidos do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC) em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $60 \pm 10\%$, ciclo claro-escuro 12:12h), com livre acesso à alimentação e à água, em caixas “*pathogen-free*” durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

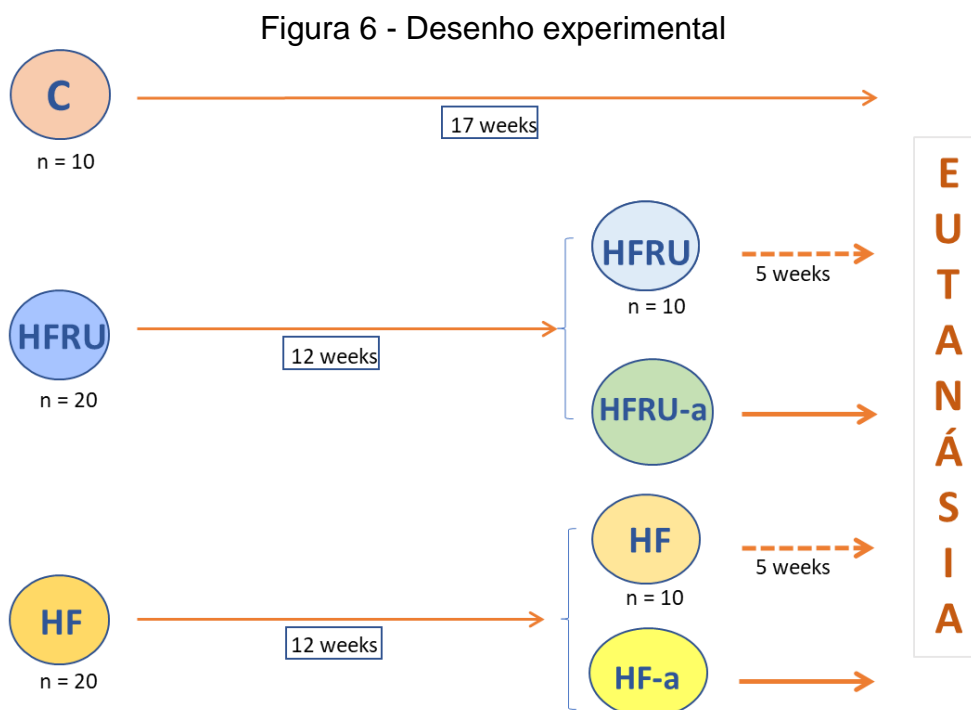
Aos três meses de idade, os camundongos foram aleatoriamente divididos em três grupos: grupo controle (C, $n=10$), alimentado com dieta padrão para roedores (14% da energia advinda de proteínas, 10% de lipídios e 76% de carboidratos; energia total de 15.884 kJ/kg); grupo dieta rica em frutose (HFRU, *high-fructose*, $n=20$), alimentado com uma dieta com excesso de frutose (14% da energia advinda de proteínas; 50% de frutose; 10% de lipídios e 26% de carboidrato; energia total de 15.884 kJ/kg); e o grupo dieta hiperlipídica (HF, *high-fat*, $n=20$), alimentado com uma dieta com excesso de lipídio (14% da energia advinda de proteínas; 50% de lipídios e 36% de carboidratos; energia total de 20.900 kJ/kg). As referidas dietas foram administradas durante 12 semanas.

Após esse período de 12 semanas, os grupos foram redivididos e o tratamento com agonista PPAR α iniciado, formando novos grupos, sendo os grupos tratados denominados HF-a (grupo hiperlipídico tratado com agonista PPAR α) e HFRU-a (grupo rico em frutose tratado com agonista PPAR α), conforme Figura 6. Os grupos C, HFRU e HF foram mantidos no mesmo esquema alimentar. O agonista PPAR α (WY-14643) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA) foi incorporado nas

respectivas dietas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil) na dose de 3,5 mg/kg de MC.

Os grupos experimentais então formados foram os seguintes:

- C:** dieta padrão ao longo de todo o experimento;
- HF:** dieta hiperlipídica ao longo de todo o experimento;
- HF-a:** dieta HF + tratamento com agonista PPAR α na dose de 3,5mg/kg massa corporal a partir dos seis meses de idade;
- HFRU:** dieta rica em frutose durante todo o experimento;
- HFRU-a:** dieta HFRU + tratamento com agonista PPAR α na dose de 3,5mg/kg massa corporal a partir dos seis meses de idade;



Legenda: Controle (C); Hiperlipídico (HF) e Hiperlipídico com agonista PPAR α (HF-a); Rico em frutose (HFRU) e Rico em frutose com agonista PPAR α (HFRU-a).

Nota: Esquema representativo dos grupos experimentais.

Fonte: A autora, 2019.

Considerando as diferenças na MC entre os animais HF-a e HFRU-a, diferentes quantidades de WY14643 foram adicionadas às respectivas dietas (3,2mg% na dieta HF-a e 2,8mg% na dieta HFRU-a) a fim de garantir que ambos os

grupos tratados, com sobrepeso ou não, mantivessem doses diárias comparadas do agonista, validando, assim, nosso tratamento.

É importante ressaltar que o conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas eram idênticos e estavam de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (136) para o período de manutenção dos animais a partir dos três meses de idade. As dietas foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil), tais dietas experimentais encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 - Composição nutricional das dietas experimentais

Nutrientes	Dietas		
	Controle	HFru	HF
Caseína	140,0	140,0	175,0
Amido de milho	620,7	146,4	347,7
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Banha de porco	---	---	238,0
Frutose	---	474,3	---
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	3802,8	5000
Carboidrato (% , energia)	76	26	36
Frutose (% , energia)	---	50	---
Proteína (% , energia)	14	14	14
Lipídios (% , energia)	10	10	50

Fonte: Instituto Americano de Nutrição (136).

3.2. Massa Corporal e Ingestão Alimentar

Durante todo o período experimental, a MC dos animais foi mensurada semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). A ingestão alimentar foi obtida diariamente durante todo o protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em

gramas). A ingestão energética foi realizada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias é convertido para quilojoules, medida universal de energia.

3.3. Teste de tolerância oral à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado nos camundongos na semana anterior à eutanásia. Os animais ficaram em jejum durante o período de 6 horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril – 0,9% NaCl) na dosagem de 2g/kg MC. O sangue dos animais foi obtido por ordenha da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após à sobrecarga de glicose para a verificação dos níveis glicêmicos com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). O tempo zero (0) foi utilizado para o cálculo da glicose em jejum. A área sob a curva (ASC) foi calculada usando a ferramenta trapezoide do programa GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4. Calorimetria Indireta

Uma semana antes do sacrifício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de calorimetria (Panlab Havard Apparatus) durante três dias com livre acesso à dieta e à água. Este sistema monitora o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2), a taxa de troca respiratória e a temperatura dos animais. Os dados foram coletados a cada 3 minutos durante 72 horas. O consumo de oxigênio é calculado por grama de massa corporal metabólico (MC)^{0,75}. O quociente respiratório (QR) foi calculado a partir dos dados coletados.

3.5. Termografia

Com auxílio da câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA), foi possível aferir a temperatura corporal dos animais. As imagens foram captadas em temperatura ambiente, com animais conscientes (sem utilização de sedativos), na 16^a semana de experimento.

3.6. Eutanásia

Após 17 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos a jejum de seis horas e, após administração de heparina, foram profundamente anestesiados em câmara de gás carbônico (CO₂). Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do átrio direito; as quais foram destinadas à centrifugação (3.500rpm, por 15 minutos) e congelamento (-80°C) para posterior análise bioquímica. O TAM foi obtido na região interescapular por cuidadosa dissecação, teve sua massa aferida em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) e fixado em formalina de Millonig (para técnica de microscopia de luz) ou congelado (-80°C, para análises moleculares). As gorduras retroperitoneal (ligada à parede posterior do abdômen e aos rins e ureteres), epididimária (ligada ao epidídimo, na porção inferior do abdômen) e gordura subcutânea (encontrada na parte proximal do membro inferior) foram cuidadosamente dissecadas e pesadas para avaliação da distribuição de gordura corporal.

3.7. Análise Plasmática

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120g por 15 minutos) e estocado em freezer -80°C até a realização das análises. A

concentração plasmática de TAG foi mensurada utilizando o Analisador Semi-Automático de Bioquímica (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil).

3.8. Histologia do tecido adiposo marrom interescapular

Após dissecação e pesagem, o TAMi dos animais foi fixado durante 48 horas em formalina de Millonig (formaldeído a 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2), desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Os fragmentos de tecido foram cortados com 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina, seguindo protocolos previamente estabelecidos para o tecido em questão. Foram realizadas imagens digitais em campos microscópicos aleatórios e não consecutivos, com microscópio Olympus BX51 e câmera acoplada (Infinity 15c, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada), através do software Image-Pro Plus (versão 7.0 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), sendo representativas de todos os grupos experimentais. As fotomicrografias foram obtidas no formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels, em aumento de 40x e 100x.

3.9. Imunofluorescência

Para realização da imunofluorescência, secções desparafinizadas e hidratadas de tecido (5 µm) foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0, a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e, então, com glicina 2% e PBS/BSA 5% para bloqueio das ligações inespecíficas. Os cortes foram incubados “*overnight*” à 4°C com o anticorpo para UCP1, PPARα e VEGFA na diluição 1:50 em PBS/BSA 1% e, em seguida, foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo, na diluição 1:50 em PBS/BSA 1% e, em seguida, foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo, na diluição 1:50 em PBS/BSA 1%. Posteriormente, foram lavadas com PBS e montadas com Slow Fade Antifade

(Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Imagens digitais imunofluorescentes foram obtidas utilizando a técnica de microscopia confocal (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Model C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

3.10. PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído do TAMi (alíquota de 30 mg) utilizando 700µl de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Posteriormente, foi adicionado 100µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, por dez minutos a 4°C). Em seguida, retirou-se o sobrenadante da fase aquosa correspondente ao RNA, foi adicionado 250 µL de álcool isopropílico seguido de centrifugação (11.200 rpm, por 10 minutos a 4°C) para precipitação e formação de um pellet de RNA. Em seguida, retirou-se o álcool isopropílico e o pellet foi ressuspendido com 500 µL de etanol (70%) com centrifugação (11.200 rpm, por 5 minutos a 4°C) para purificação do RNA. O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspendido em 40 µL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectrometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando Oligo (dT) e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA) para RNAm.

A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados (Quadro 2). A eficiência para o gene alvo e controle endógeno foram aproximadamente iguais e foram calculados através de uma série de diluição de cDNA. As reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95°C) com quarenta ciclos, cada ciclo consistindo de 95°C por 10s e 60°C por 15s, seguida pela curva de melt (60 a 95°C com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde $-\Delta Ct$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno (137). Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3 e estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Detalhamento dos primers utilizados

Primers		
Gene	Forward	Reverse
<i>Adiponectina</i>	GGAACTTGTGCAGGTTGGAT	TCTCTCCAGGAGTGCCATCT
<i>Beta-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Rβ3a</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGA
<i>Cidea</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAACTGTCCCGTCATCTGT
<i>Cpt1b</i>	GGCTGCCGTGGGACATT	TGCCTTGGCTACTTGGTACGA
<i>Nrf1</i>	GTTGGTACAGGGGCAACAGT	GTAACGTGGCCCAGTTTTGT
<i>Pgc1α</i>	AACCACACCCACAGGATCAGA	TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
<i>Plin1</i>	ACGACCAGACAGACACAGAG	GGCTGTAACCTCTCTGAGCA
<i>Ppara</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC

Fonte: A autora, 2019.

3.11. Análise Estatística

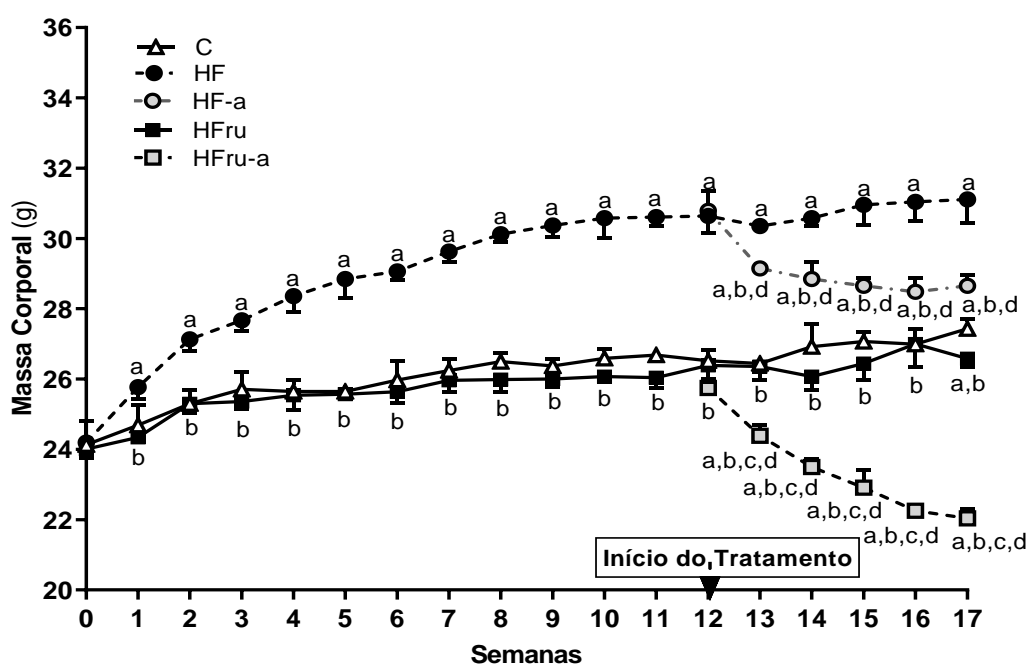
Os dados foram expressos como média e desvio padrão e analisados por análise de variância (ANOVA) de um fator com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos utilizando-se o índice de significância com $p < 0,05$ (GraphPadPrism, versão 8, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Comportamento alimentar e Massa corporal

Os grupos C, HF e HFRU iniciaram o experimento (semana 0) sem diferença estatística significativa da MC. Após uma semana de ingestão de dieta hiperlipídica, o grupo HF apresentou aumento da massa corporal quando comparado ao grupo C (+4,37%, $P=0,0020$, Figura 7) e este aumento perdurou até o final do experimento. Além disso, o grupo HFRU não apresentou diferença significativa da MC quando comparado ao grupo C durante o período de indução.

Figura 7 - Evolução da Massa Corporal



Legenda: Primeiras semanas (um a doze) referem-se ao período de indução, e as semanas seguintes (doze a dezessete) correspondem à fase de tratamento com PPAR α . Os valores são apresentados como média \pm DP, $n = 5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a; d \neq HFRU conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

Fonte: A autora, 2019.

O tratamento com PPAR α começou a apresentar diferenças na MC entre os grupos já na primeira semana de administração. A partir de então, e seguindo até o final do experimento, os grupos HF-a e HFRU-a tiveram redução da MC significativa em relação às suas contrapartes não tratadas (-7,91%, $P=0,0033$; -17,09%, $P<0,0001$), conforme exibido na Figura 7. Na última semana de tratamento, quando comparados ao grupo C, o grupo HF apresentou aumento de 13,41% na MC ($P=0,0005$) e o grupo HFRU apresentou redução de 3,1% da MC ($P=0,0186$).

Convertendo a gramatura ingerida para a energia que as dietas fornecem, com base em sua densidade energética (dieta padrão e rica em frutose, 15,88 KJ/g e dieta hiperlipídica, 20,90 KJ/g), obtêm-se que o grupo HF e o grupo HF-a apresentaram aumento na ingestão energética quando comparado ao grupo C (+30,17%, $P<0,0001$), conforme demonstrado no Quadro 3. Por outro lado, o grupo HFRU e o grupo HFRU-a não apresentaram diferença na ingestão energética quando comparado ao grupo C, devido ambas as dietas serem isoenergéticas. Estas observações excluem a necessidade de grupos de alimentação *pair-feeding* para isolar os efeitos da redução do consumo de energia sobre os resultados analisados.

Quadro 3 - Comportamento alimentar

Dados	C	HF	HF-a	HFRU	HFRU-a
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	3,10 \pm 0,12	3,08 \pm 0,05	3,07 \pm 0,05	3,09 \pm 0,14	3,10 \pm 0,14
Ingestão energética (kJ/dia/animal)	49,48 \pm 0,51	64,41 \pm 0,22 ^a	64,33 \pm 0,21 ^a	49,62 \pm 0,59 ^{b,c}	49,32 \pm 0,62 ^{b,c}

Legenda: Valores representados como média \pm DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

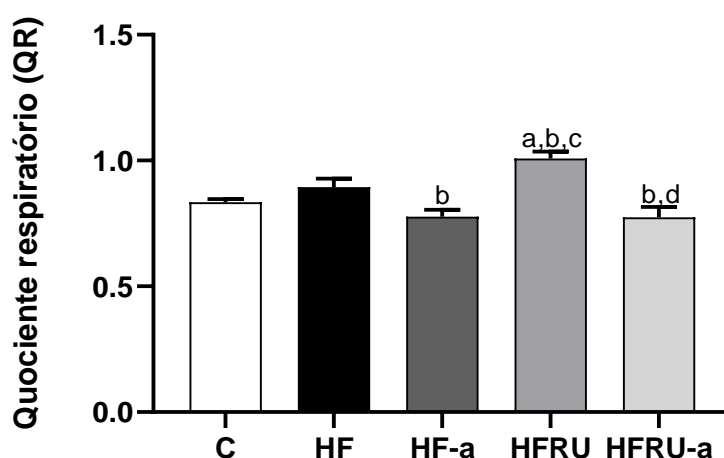
Fonte: A autora, 2019.

4.2. Calorimetria indireta

O ensaio de calorimetria indireta foi utilizado para o cálculo do quociente respiratório, estimado pela razão entre a produção de gás carbônico (VCO₂) e o consumo de oxigênio (VO₂), e pode ser um indicador do principal combustível para a manutenção do metabolismo basal dos animais. O grupo HFRU atingiu um maior quociente respiratório em comparação a todos os grupos; o grupo HFRU-a

apresentou a menor taxa, enquanto os grupos C e HF não apresentaram diferença significativa. O grupo HF-a apresentou redução nesse parâmetro (-13,14%) comparado a sua contraparte ($P=0,0038$), assim como o grupo HFRU-a (-23,21%) comparado a sua contraparte ($P=0,0001$). Com QR mais próximo de 1,0 pode-se inferir que o grupo HFRU utilizou, preferencialmente, carboidratos como principal fonte energética, enquanto que com o QR próximo ao valor 0,7 o grupo HF-a e HFRU-a possivelmente utilizou lipídios (Figura 8).

Figura 8 - Quociente respiratório



Legenda: Valores representados como média \pm DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a; d \neq HFRU conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

Fonte: A autora, 2019.

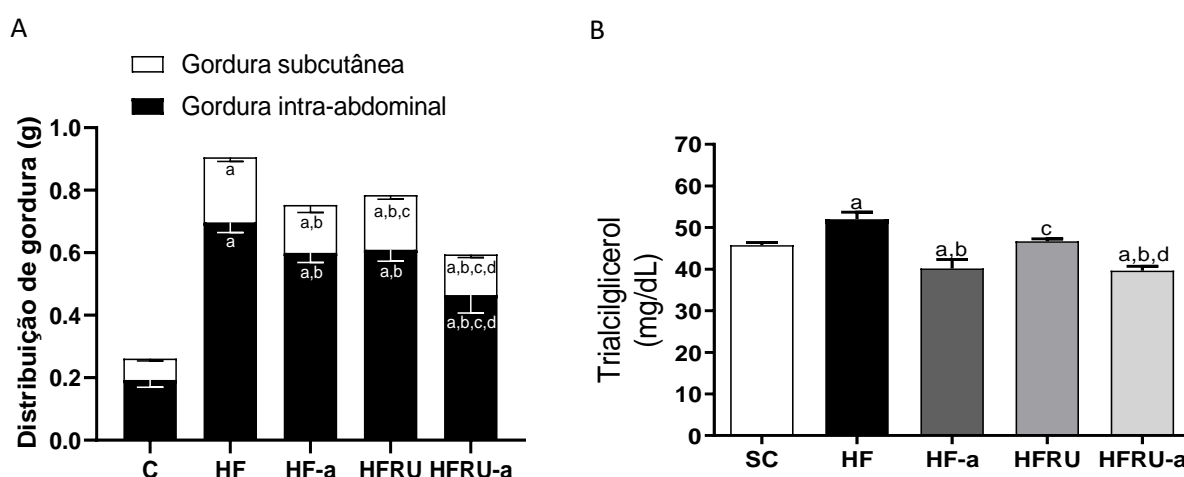
4.3. Distribuição de gordura e triacilgliceróis plasmático

A distribuição de gordura no compartimento intra-abdominal mostrou que o grupo HF apresentou maior acúmulo de gordura que o grupo C (+260,98%, $P<0,0001$), por outro lado o grupo HF-a apresentou redução significativa desse parâmetro (-13,96%, $P<0,0001$). O mesmo podemos observar no grupo HFRU quando comparado ao grupo C (+215,95%, $P<0,0001$) e quando comparado a sua contraparte (-23,77%, $P<0,0001$) (Figura 9A) comprovando o aumento da massa gorda e mostrando que a medicação foi capaz de reduzir esse depósito nos grupos

tratados. No caso da gordura subcutânea, o grupo HF apresentou um aumento quando comparado ao grupo C (+207,09%, $P < 0,0001$) e o tratamento reduziu esse acúmulo no HF-a (-26,65%, $P < 0,0001$). De forma similar, o grupo HFRU apresentou um acúmulo maior quando comparado ao grupo C (+156,62%, $P < 0,0001$) e o grupo HFRU-a uma redução desse depósito quando comparado a sua contraparte (-25,87%, $P = 0,0004$) (Figura 9A).

No que diz respeito aos resultados do TAG plasmático, os grupos HF-a e HFRU-a apresentaram diminuição na concentração de TAG quando comparados às suas contrapartes não tratadas (-22,78%, $P = 0,0017$; -15,17%, $P = 0,001$, respectivamente), dados que estão apresentados na Figura 9B.

Figura 9 - Distribuição de tecido adiposo branco e triacilglicerol plasmático



Legenda: Valores representados como média \pm DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a; d \neq HFRU conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

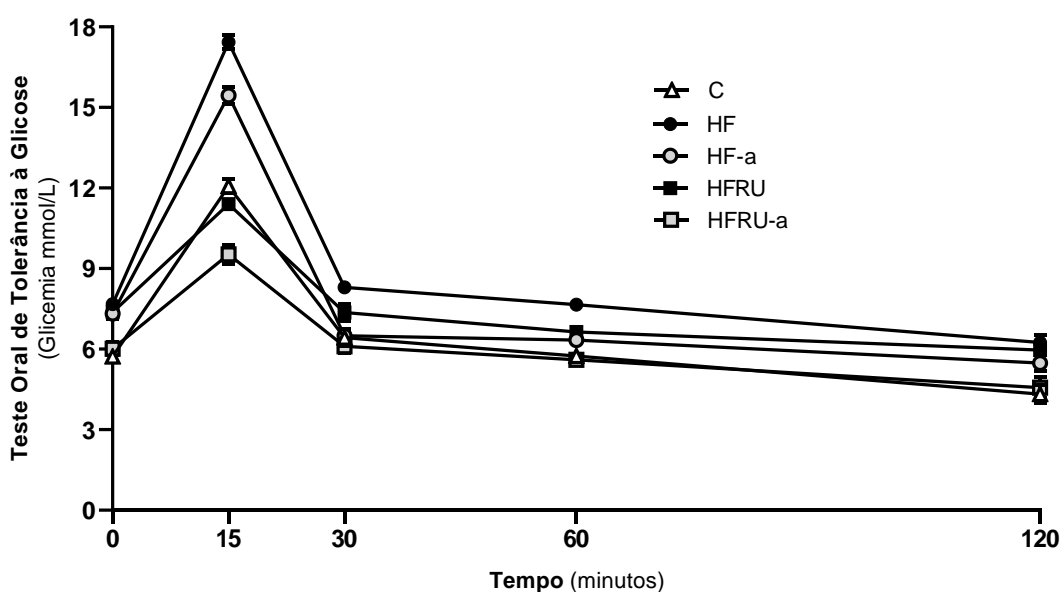
Fonte: A autora, 2019

4.4. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

A análise da área sob a curva (ASC) do TOTG (Figura 10) revelou que a dieta hiperlipídica promoveu intolerância oral à glicose nos animais do grupo HF por um aumento significativo na ASC quando comparado ao grupo C (+45,58%, $P = 0,0012$). O tratamento com agonista PPAR α foi capaz de reduzir a intolerância oral à glicose,

produzindo um valor menor da ASC no grupo HF-a quando comparado ao grupo HF (-14,98%, $P < 0,0001$), porém não houve normalização desse parâmetro no grupo HF-a quando comparado ao grupo C (+20,72%, $P = 0,0214$). De forma similar, o excesso de frutose na dieta promoveu intolerância oral à glicose no grupo HFRU quando comparado ao grupo controle (+18,99%, $P = 0,0241$), mas o tratamento com PPAR- α conseguiu reverter esse achado, uma vez que o grupo HFRU-a não apresentou diferença na ASC quando comparado ao grupo C (Figura 11).

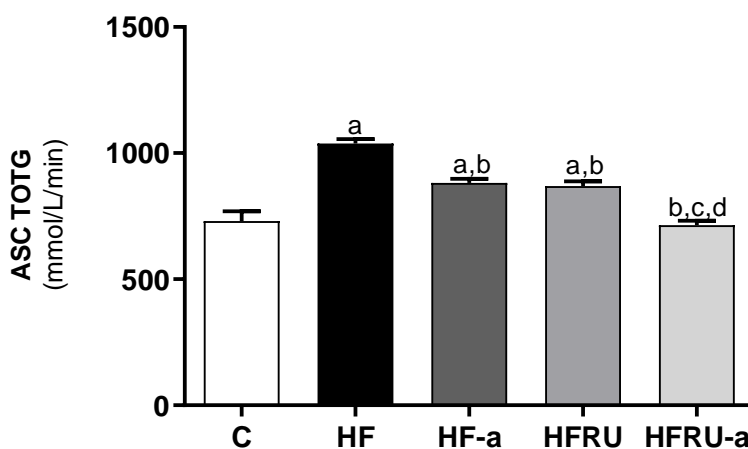
Figura 10 - Curva glicêmica



Legenda: Curva do TOTG na 16ª semana de protocolo experimental. Os valores são apresentados como médias \pm DP, $n = 5$. Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado (HF-a); Rico em frutose (HFRU); Rico em frutose tratado (HFRU-a).

Fonte: A autora, 2019.

Figura 11 - Área sob a curva



Legenda: Os valores são apresentados como média \pm DP, $n = 5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a; d \neq HFRU conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

Fonte: A autora, 2019.

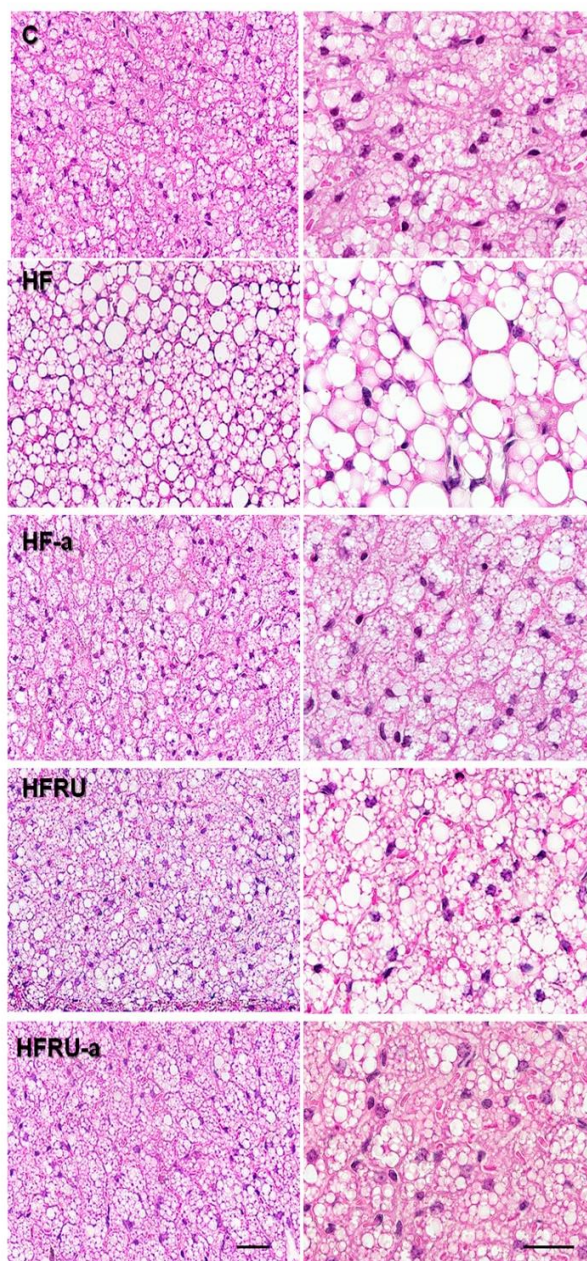
4.5. Morfologia do TAMi

No que se refere à histologia do TAMi, sabe-se que este, diferentemente do tecido adiposo branco, apresenta reserva lipídica multilocular e maior quantidade de mitocôndrias em sua estrutura, denotando maior capacidade termogênica. O grupo HF apresentou aumento pronunciado no acúmulo de gotículas de gordura quando comparado ao grupo C, de forma a dificultar a delimitação dos adipócitos marrons multiloculares que, frequentemente, passaram a lembrar um padrão de armazenamento lipídico de um adipócito branco, fenômeno denominado *whitening*. Entretanto, após o tratamento com o agonista PPAR α , foi observada redução expressiva no acúmulo de lipídios no interior dos adipócitos marrons do grupo HF-a, o que foi proporcional ao aumento do volume citoplasmático, sugerindo aumento da atividade metabólica nesse tecido, lembrando a citoarquitetura encontrada no grupo C (Figura 12).

Com relação ao grupo HFRU, apesar de não haver *whitening* tão pronunciado quanto o promovido pela dieta HF, foi observado um acúmulo maior de lipídios no interior dos seus adipócitos marrons multiloculares e um desarranjo estrutural que

dificulta também o estabelecimento dos limites de cada adipócito, o que não ocorreu no grupo C. Novamente, o tratamento com agonista PPAR α foi capaz de atenuar essas alterações desencadeadas pela dieta HFRU, uma vez que o grupo HFRU-a apresentou ao final do tratamento características histológicas do TAMi similares ao grupo C, ainda que com adipócitos maiores (Figura 12).

Figura 12 - Morfologia do TAMi



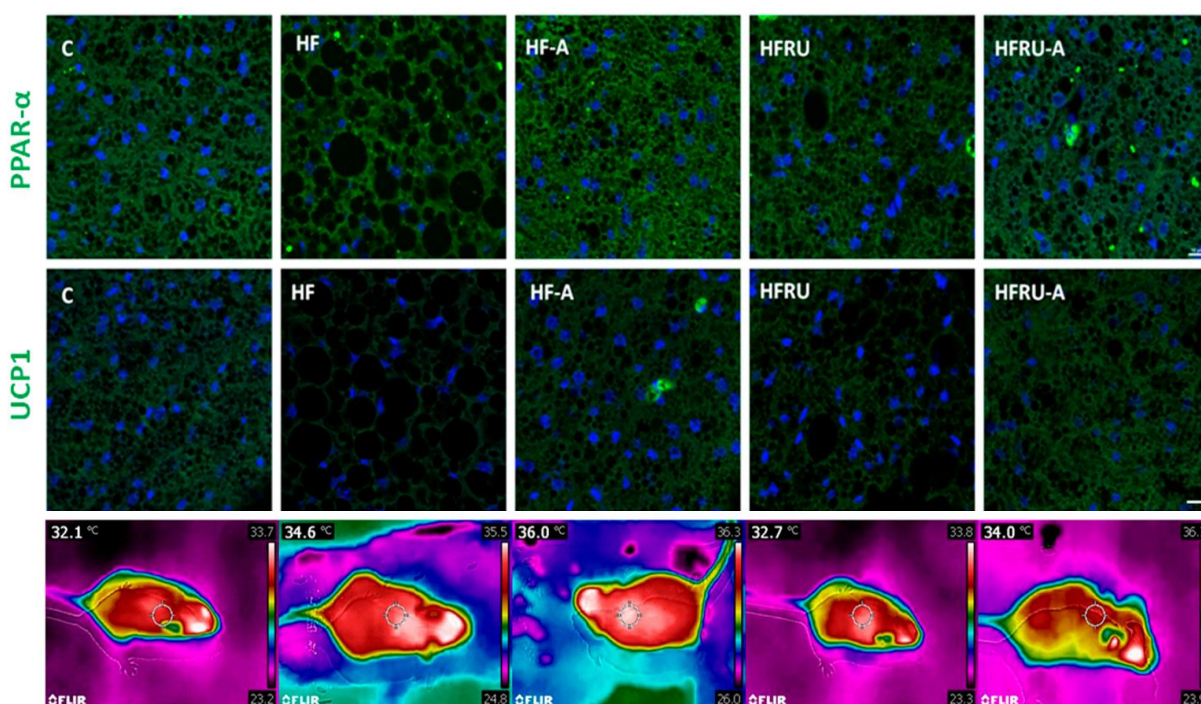
Legenda: Fotomicrografias representativas do TAMi dos grupos experimentais corado com hematoxilina-eosina. Fotos da primeira coluna objetiva de 40x e da segunda coluna objetiva de 100x (imersão). Barra de calibração = 50 μ m. Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado (HF-a); Rico em frutose (HFRU); Rico em frutose tratado (HFRU-a).

Fonte: A autora, 2019.

4.6. Imunofluorescência e termografia

A imunofluorescência (Figura 13) confirma os achados histológicos, uma vez que os animais alimentados com dieta HF e HFRU apresentaram imunomarcagem positiva para PPAR α , mas esta não é suficiente para aumentar a expressão proteica do seu transcrito UCP1. Além disso, os grupos que receberam tratamento (HF-a e HFRU-a) apresentaram imunomarcagem para PPAR α e UCP1 mais expressivas quando comparadas às suas contrapartes. A presença da UCP1 já era esperada, por ser uma proteína presente no TAM. No entanto, ao avaliar a expressão da UCP1 associada aos dados da termografia após o tratamento, percebe-se um aumento tanto na expressão dessa proteína quanto na temperatura corporal dos animais e, conseqüentemente, a sugestão de um aumento da atividade termogênica. Esses achados corroboram com os dados histológicos que demonstram uma atenuação do remodelamento adverso, com multilocularização mais expressiva dos adipócitos marrons após o tratamento.

Figura 13 - Imunofluorescência para PPAR α e para UCP1 e imagens termográficas

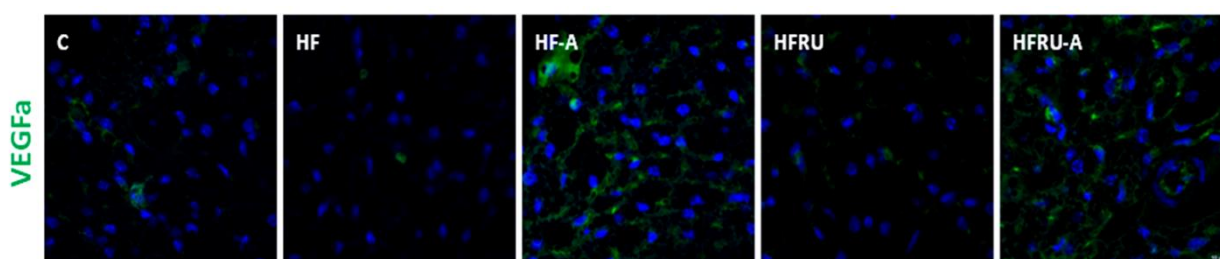


Legenda: Tecido adiposo marrom marcado com dapi (azul, núcleo) em ambas as linhas e anticorpo anti-PPAR α (verde, linha superior) e anticorpo anti-UCP1 (verde, linha inferior). Mesmo aumento para todas as fotos, barra de calibração = 10 μ m. A última linha é referente as imagens termográficas seguindo a ordem dos grupos das linhas superiores.

Fonte: A autora, 2019.

O *whitening* observado no grupo HF foi seguido por redução da imunomarcagem de VEGFA. O grupo HFRU também mostrou imunomarcagem reduzida para o VEGFA quando comparado ao grupo C. A ativação do PPAR α após o tratamento causou uma marcação mais expressiva de VEGFA em ambos os grupos tratados quando comparados as suas contrapartes. Estes resultados sugerem uma melhora da vascularização do TAMi após o tratamento (Figura 14).

Figura 14 - Imunofluorescência para VEGFA



Legenda: Tecido adiposo marrom marcado com dapi (azul, núcleo) e anticorpo anti-VEGFA (verde).
Mesmo aumento para todas as fotos, barra de calibração = 10 μ m.

Fonte: A autora, 2019.

4.7. PCR quantitativo em tempo real

Os resultados do ensaio de qPCR mostraram que a expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) para *Ppara*, um importante fator transcricional que possui marcadores termogênicos como genes alvo, foi menor no grupo HF quando comparado ao grupo C (-68,33%, $P=0,0005$), o grupo HFRU também apresentou uma expressão diminuída quando comparado ao grupo C (-73,48%, $P=0,0087$) e a expressão foi mais elevada nos grupos HF-a e HFRU-a quando comparados as suas contrapartes não tratadas: +373,22% no HF-a, $P<0,0001$, +148,40% no HFRU-a, $P<0,0001$; Figura 15. Esse resultado ressalta o sucesso do tratamento proposto nesse experimento.

O aumento na expressão gênica de *Ppara* teve relação direta com o aumento da expressão gênica de *Ucp1*, proteína responsável pela dissipação de calor na cadeia respiratória mitocondrial, que apresentou-se diminuída nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (-74,15%, $P<0,0001$; -24,25%, $P=0,0027$) e

aumentada nos grupos tratados quando comparado as suas contrapartes (+465,42% no HF-a; $P < 0,0001$ e +78,50% no HFRU-a; $P < 0,0001$), conforme a Figura 15.

De forma similar, a expressão relativa do RNAm para *Rβ3a* que regula positivamente a expressão de PPARα resultando numa capacidade de oxidação expandida no interior dos adipócitos, também apresentou uma diminuição nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (-55,07%, $P < 0,0001$; -30,44%, $P < 0,0001$) e foi maior nos grupos tratados, indicando que o tratamento pode ter ativado a via termogênica pelo aumento do estímulo simpático (+72,87% no HF-a; $P < 0,0001$ e +12,51% no HFRU-a; $P = 0,0494$), como mostra a Figura 15.

O *Bmp8b* é secretado pelo TAM para sensibilizá-lo para estimulação do SNS. Além disso, influencia na ativação e estimula a termogênese do TAM. A expressão relativa do RNAm para esse gene foi menor nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (-31,67%, $P < 0,0001$; 63,32%, $P = 0,0021$) e maior nos grupos que receberam tratamento quando comparados as suas contrapartes não tratadas (+147,96% no HF-a; $P < 0,0001$ e +111,31% no HFRU-a; $P < 0,0001$), como mostra a Figura 15.

Além disso, a expressão relativa do RNAm para o carnitina palmitol transferase 1-b (*Cpt1b*), que tem sua expressão aumentada pela ativação de *Ppara*, conduzindo a um maior influxo mitocondrial de ácidos graxos para serem metabolizados, apresentou um aumento nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (+23,04%, $P = 0,0377$; +38,19%, $P = 0,0069$). Por outro lado, os grupos tratados apresentaram aumento quando comparados as suas contrapartes (HF-a teve uma expressão de +38,52% que o HF ($P = 0,0040$) e HFRU-a teve uma expressão de +123,19% que o HFRU ($P < 0,0001$)), como mostra a Figura 15.

A expressão relativa do RNAm para *Cidea* o qual juntamente com a perilipina-1 (*Plin1*) indica aumento da lipólise, apresentou diminuição no grupo HF quando comparado ao grupo C (-53,72%, $P = 0,0013$) e aumento no grupo HFRU quando comparado ao grupo C (+58,47%, $P = 0,0018$). Os grupos que receberam tratamento apresentaram aumento da expressão de CIDEA quando comparados com suas contrapartes não tratadas (+199,17% no HF-a; $P < 0,0001$ e +126,56% no HFRU-a; $P = 0,0001$), como mostra a Figura 15.

Em paralelo, *Plin1* codifica a proteína que cobre as gotículas de armazenamento de lipídios nos adipócitos, protegendo-os até que possam ser

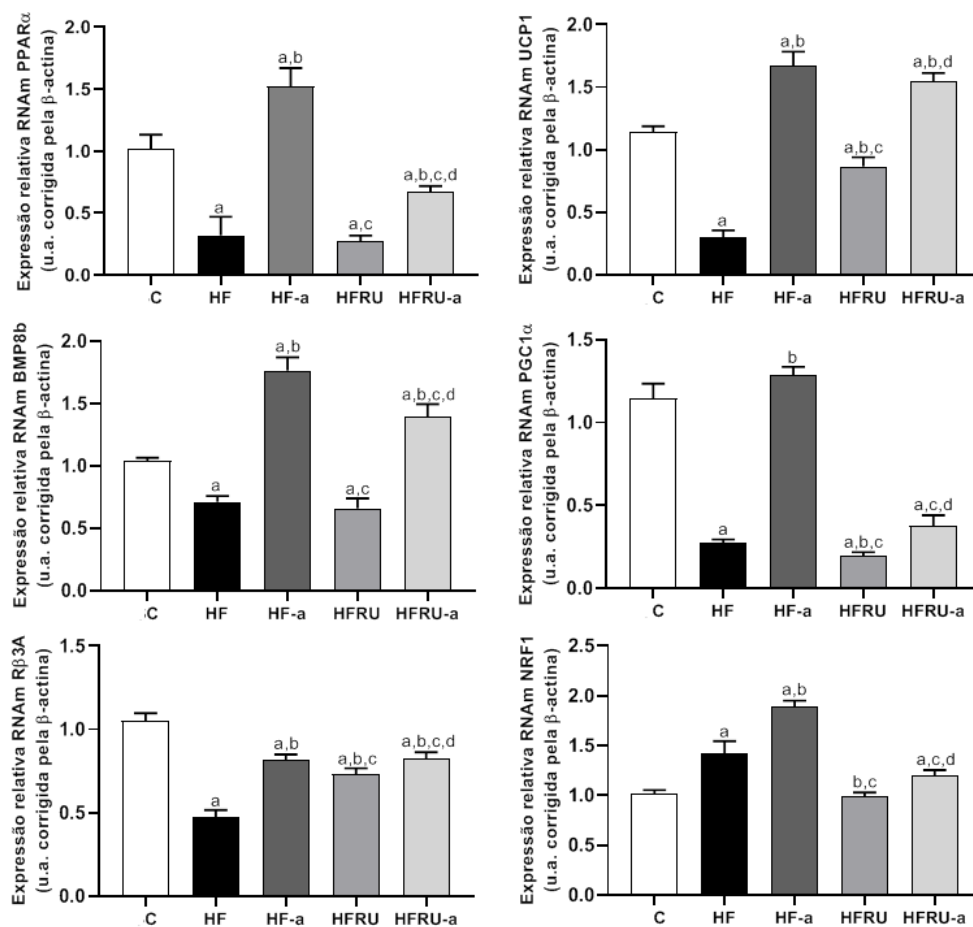
quebrados pela lipase hormônio sensível. A expressão relativa do RNAm para esse gene foi menor nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (-77,9%, $P < 0,0001$; -82,98%, $P < 0,0001$) e maior nos grupos que receberam tratamento quando comparados as suas contrapartes não tratadas (+466,55% no HF-a; $P = 0,0001$ e +123,95% no HFRU-a; $P = 0,0021$), como mostra a Figura 15.

A expressão relativa do RNAm para *Adiponectina*, uma adipocina anti-inflamatória, não apresentou diferença estatística no grupo HF quando comparado ao grupo C, no grupo HFRU apresentou uma diminuição quando comparada ao C (-26,55%, $P = 0,0068$) e apresentou-se aumentada nos grupos tratados em comparação com suas contrapartes (+206,69% no HF-a; $P < 0,0001$ e +75,84% no HFRU-a; $P = 0,0021$) como mostra a Figura 15.

O co-ativador gama 1 alfa ativado por proliferador de peroxissomo (*Pgc1a*) é um fator chave da regulação da biogênese mitocondrial, e também, um regulador da transcrição de *Ppara* e *Ucp1*. A expressão relativa do RNAm para esse gene foi menor nos grupos HF e HFRU quando comparados ao grupo C (-75,75%, $P = 0,0002$; -83,40%, $P < 0,0001$) e maior nos grupos que receberam tratamento quando comparados as suas contrapartes não tratadas (+363,42% no HF-a; $P < 0,0001$ e +95,03% no HFRU-a; $P = 0,0151$), como mostra a Figura 15.

O fator respiratório nuclear 1 (*Nrf1*), que faz o acoplamento mitocôndria-núcleo para ativar o fator de transcrição mitocondrial, apresentou expressão relativa do RNAm sem diferença estatística no grupo HFRU quando comparado ao grupo C e foi maior no grupo HF quando comparado ao grupo C (+40,81%, $P = 0,0087$) e nos grupos que receberam tratamento quando comparados as suas contrapartes não tratadas (+32,98% no HF-a; $P = 0,0029$ e +21,25% no HFRU-a; $P = 0,0023$), como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Expressão gênica por q-PCR no TA



Legenda: Os valores são apresentados como média \pm DP, n = 5. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq C; b \neq HF; c \neq HF-a; d \neq HFRU conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostraram que a dieta HF induziu o *whitening* do TAMi após um protocolo de 17 semanas em camundongos C57BL/6, caracterizado por aumento expressivo do tamanho de gotículas lipídicas associado a menor expressão de VEGFA, menor expressão de genes termogênicos, ganho de MC e intolerância à glicose por via oral. O excesso de frutose alimentar durante o mesmo período não causou *whitening* tão pronunciado quanto observado no grupo HF, mas também comprometeu a expressão de VEGFA do TAMi e reduziu a expressão de marcadores termogênicos.

Os camundongos do grupo HF-a se beneficiaram do tratamento com agonista PPAR α apresentando: redução significativa da MC, diminuição da intolerância oral a glicose, melhora nos parâmetros lipídicos, aumento da termogênese adaptativa, biogênese mitocondrial e na imunomarcagem de VEGFA, aumento da multilocularização dos adipócitos marrons e da adiponectina, com reversão do *whitening*. Já os camundongos do grupo HFRU-a, após o tratamento tiveram, além de todos os efeitos causados no grupo HF-a: normalização da tolerância oral a glicose e atenuação do remodelamento adverso causado pelo excesso de frutose no TAMi.

Referente à MC, o tratamento com PPAR α produziu perda significativa no grupo HF-a, como já descrito previamente na literatura em um experimento que utilizou uma dose similar do WY14643 (agonista PPAR- α) (134). Sabe-se que a frutose não provoca alterações significativas na massa corporal, mas acarreta uma série de alterações metabólicas, incluindo hipertrofia de adipócitos (138). Não há relato na literatura dos efeitos do tratamento com agonista PPAR- α em animais alimentados com dieta rica em frutose, sendo a perda ponderal observada um resultado original.

Além disso, o grupo que recebeu uma dieta rica em frutose não apresentou diferença da sua massa corporal no período da indução das alterações metabólicas quando comparado ao grupo controle, por ambas as dietas serem isoenergéticas (139). Já o grupo que recebeu uma dieta rica em lipídios, apresentou aumento da ingestão energética (a partir do conteúdo dos ácidos graxos da dieta) quando

comparado ao grupo C, resultando em excesso de peso, como mostrado em um estudo anterior, usando a mesma cepa de camundongos e dieta experimental (140).

Notavelmente, os dois grupos tratados não apresentaram diferença no consumo alimentar em gramatura quando comparados aos respectivos grupos não tratados, reforçando que a MC reduzida foi um resultado relacionado diretamente à ativação do PPAR α , descartando a necessidade de um grupo *pair-feeding*.

O excesso de peso no grupo com HF foi paralelo ao aumento dos depósitos de gordura, como estudos anteriores relatam (141, 142). A maior disponibilidade de ácidos graxos é direcionada ao tecido adiposo branco, que funciona como um tampão para o excesso de lipídios por sua capacidade de hiperplasia e hipertrofia (72). A longo prazo, ocorre resistência à insulina e acúmulo de gordura ectópica (38). Apesar de mostrar um fenótipo magro, sem excesso de peso, os animais alimentados com HFRU também apresentaram maior quantidade de gordura corporal quando comparados aos animais do grupo C. Um estudo recente afirma que um longo período de ingestão de HFRU causa expansão dos depósitos de gordura e disfunção dos adipócitos brancos por polarização de macrófagos para o estado M1 (143).

O PPAR α regula o metabolismo lipídico envolvendo biogênese mitocondrial, oxidação e captação de ácidos graxos e expressão de UCP1 (144, 145). A UCP1 se encontra localizada na membrana mitocondrial interna e atua como um canal alternativo aos prótons H $^+$, retornando do espaço intermembranar e, assim, evita a síntese de ATP e permite que a energia resultante seja liberada como forma de calor (86, 87).

Desse modo, os grupos HF-a e HFRU-a tiveram um QR menor (próximo a 0,7) do que os grupos não tratados, e isso aponta para a gordura como fonte de energia preferencial (146). Esta observação está em conformidade com os depósitos de gordura diminuídos e as concentrações plasmáticas de TAG e sugere que a perda de MC nos camundongos HF-a e HFRU-a foi resultado de atividade termogênica favorecida e do uso de lipídios como combustível. Já foi mostrado que a ativação do PPAR β leva ao uso preferencial de lipídios como combustível (147, 148), bem como à ativação do PPAR α especificamente no TAMi (134).

As fotomicrografias do TAMi forneceram evidências convincentes da ocorrência de *whitening* em camundongos obesos. Os camundongos alimentados com HF mostraram um aumento incomum de gotículas lipídicas, seguido por um

declínio significativo na expressão de UCP1, o que não foi observado em camundongos alimentados com a dieta HFRU.

A vascularização reduzida, avaliada aqui pela imunomarcação para VEGFA, e o estado hipóxico precedem a perda mitocondrial durante o desenvolvimento do embranquecimento do adipócito marrom (12). O grupo HF mostrou perda da expressão do VEGFA, resultando em uma capacidade diminuída desses adipócitos marrons realizarem termogênese devido à estimulação β -adrenérgica reduzida (149). A rarefação vascular leva à disfunção adipocitária marrom com a aquisição de um fenótipo branco, como observado o grupo HF.

Em contraste, as fotomicrografias mostraram um resgate da multilocularização no TAMi de camundongos HF-a. Este resultado lança luz sobre um novo papel do PPAR α , pois o grupo HF-a mostrou imunomarcação positiva do VEGFA. O VEGFA derivado do tecido adiposo potencializa a termogênese por estimulação beta-adrenérgica e ainda desencadeia a lipólise e o escurecimento do tecido adiposo branco (150). Nossos resultados propõem um papel da ativação do PPAR α no combate ao *whitening* por indução de VEGFA e seus efeitos lipolíticos e termogênicos.

Embora a dieta HFRU não tenha causado disfunção completa dos adipócitos marrons, o grupo HFRU mostrou reduzida imunomarcação de VEGFA e da expressão gênica de *R β 3a*, sugerindo que o *whitening* possa ocorrer com a ingestão prolongada de HFRU. A recuperação da multilocularização nos adipócitos marrons nos grupos HF-a e HFRU-a também está correlacionada com a capacidade do PPAR α de induzir β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Camundongos com oxidação de ácidos graxos deficiente no TAMi são intolerantes ao frio (151), portanto a β -oxidação é crucial para manter o fenótipo marrom no adipócito e sua ativação termogênica (152, 153).

A ativação do PPAR α causou aumento da expressão de *Cpt1b*, um gene mitocondrial ligado à utilização de ácidos graxos e à capacidade de oxidação. A inibição de *Cpt1b* fornece atividade mitocondrial reduzida em adipócitos marrons (154). Além disso, camundongos submetidos ao frio apresentam alta expressão de *CPT1b* no TAMi, aumentando a oxidação de ácidos graxos (155). É importante notar que a ativação do PPAR α produziu uma expressão aumentada de *Plin1* e *Cidea*, que é indicativo de um estado de lipólise aumentada (155, 156). PLIN1 é uma proteína residente da gotícula lipídica (156), e *Cidea* é um gene que mostra

expressão aumentada em adipócitos marrons competentes (87). Um estudo recente mostra que a exposição ao frio induz a expressão de *Plin1* e *Cidea*, facilitando a hidrólise de TAG e melhorando a disponibilidade de ácidos graxos para a produção de calor, destacando uma estreita relação entre a dinâmica das gotículas lipídicas e o metabolismo mitocondrial (156).

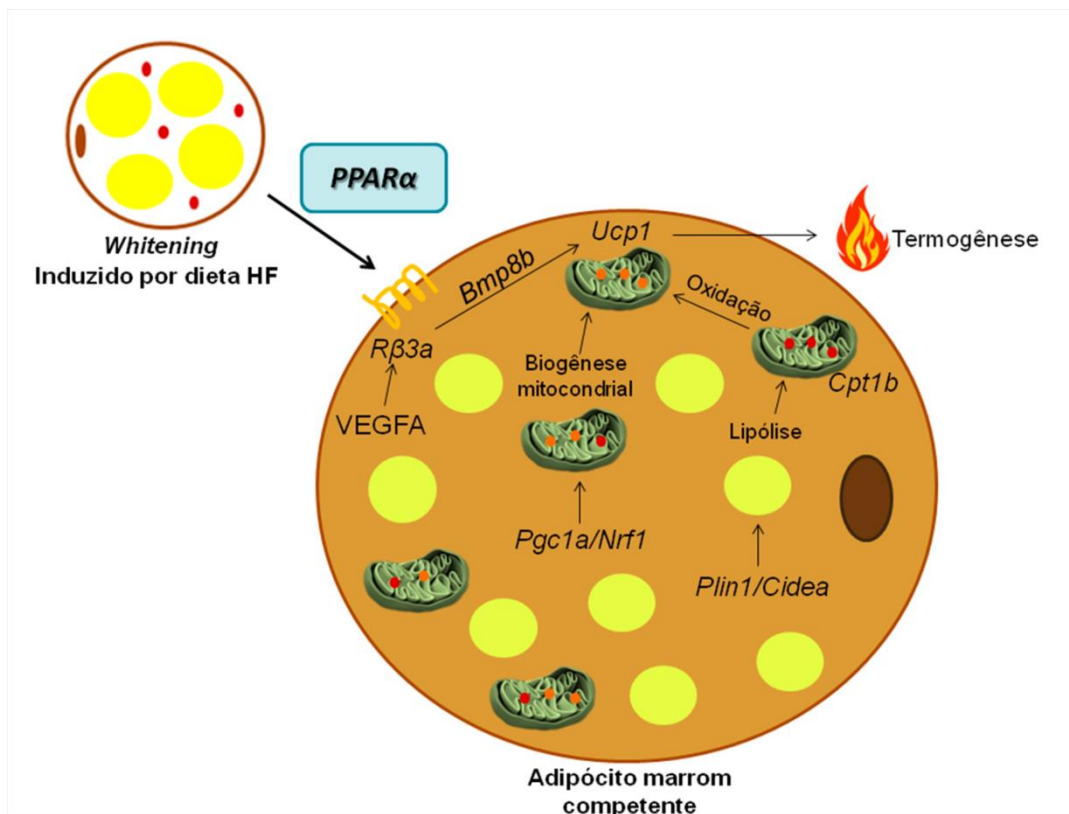
A termogênese adaptativa depende da ativação simpática, que induz a lipólise pela ativação do PLIN1 (157). O agonista do PPAR α aumentou a sinalização adrenérgica com maior expressão de *R β 3a* e *Bmp8b* em camundongos alimentados com HF e HFRU. *R β 3a* atua como iniciador da via termogênica (158), enquanto o *Bmp8b* atua de maneira central para aumentar a produção simpática no sítio termogênico e localmente para ampliar a resposta termogênica ao estímulo adrenérgico (159). O camundongo *knockout* para *Bmp8b* se torna mais obeso do que o camundongo selvagem quando alimentado com uma dieta HF, enquanto a ablação de PPAR α torna os roedores mais propensos à obesidade devido à menor capacidade de usar lipídios como combustível para a termogênese (17, 159). Isto sugere o *Bmp8b* como um gene alvo para o PPAR α .

Em conjunto com a UCP1, a termogênese necessita do aumento do conteúdo mitocondrial que é regulado pelo *PGC1 α* que age ativando o *NRF1*, este por sua vez regula a expressão de vários genes envolvidos na função e na biogênese mitocondrial, incluindo fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (78, 156, 160). Os níveis de *PGC1 α* e *NRF1* foram aumentados nos grupos que receberam tratamento, confirmando que a maior multilocularização foi seguida pelo aumento do conteúdo mitocondrial para realizar a termogênese. O aumento da temperatura corporal nos grupos HF-a e HFRU-a adicionado aos resultados do QR nos permitiu inferir que a perda de MC resultou do aumento da termogênese usando lipídios como combustível preferencial.

A adiponectina é uma adipocina envolvida no controle do metabolismo da gordura e da sensibilidade à insulina, com atividades antidiabéticas, antiaterogênicas e anti-inflamatórias diretas, além de regular a termogênese (161). A exclusão do gene da *adiponectina* limita a ativação adrenérgica e regula negativamente os receptores β 3-adrenérgicos, a sinalização da insulina e a via AMPK-SIRT1 no TAMi, comprometendo a termogênese (161). A expressão gênica aumentada da adiponectina nos grupos HF-a e HFRU-a está de acordo com a termogênese aprimorada detectada nesses grupos através do aumento da expressão da *Ucp1*

adicionada à alta temperatura corporal. As principais descobertas estão resumidas na Figura 16

Figura 16 - Resumo gráfico dos resultados



Nota: O agonista PPARα neutralizou o *whitening* do TAMi, estimulando o SNS e seus efeitos termogênicos a jusante (VEGFA, $\beta 3ar$, *Bmp8b*), lipólise (*Plin1* e *Cidea*), β -oxidação (*Cpt1b*) e biogênese mitocondrial (*Pgc1a* e *Nrf1*), todos os quais favoreceram a termogênese (*Ucp1*) usando lipídios como combustível.

Fonte: A autora, 2019.

CONCLUSÃO

A dieta HF foi capaz de induzir o *whitening* no TAMi de camundongos C57BL/6, enquanto o excesso de frutose determinou um acúmulo mais discreto de gotículas grandes de lipídio nesse compartimento adiposo. O tratamento foi capaz de reverter o *whitening* no grupo HF-a a partir da termogênese favorecida, sustentada por estimulação β 3-adrenérgica aumentada, lipólise e vascularização adipocitária marrom. Ambos os grupos tratados apresentaram diminuição da MC, melhora do metabolismo lipídico com redução do acúmulo de gordura branca e da concentração plasmática de TAG e diminuição da intolerância oral à glicose, todos relacionados ao uso preferencial de lipídios como combustível para termogênese e dissipação de energia em forma de calor. Sendo assim, é possível dizer que o tratamento com agonista PPAR α pode ser um alvo para combater a disfunção adipocitária marrom na obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011 Aug 27;378(9793):804-14.
2. Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care*. 2014 Apr;37(4):950-6.
3. Fall T, Ingelsson E. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):740-57.
4. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab*. 2013 Jun 4;17(6):851-9.
5. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Aug;293(2):E444-52.
6. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):372-6.
7. Rodriguez A, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Becerril S, Fruhbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Oct 15;309(8):E691-714.
8. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8.
9. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):395-404.
10. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013 Feb 1;27(3):234-50.
11. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1831(5):943-9.

12. Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 2014 May;124(5):2099-112.
13. Roberts-Toler C, O'Neill BT, Cypess AM. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Sep;23(9):1765-70.
14. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993 Jun 1;32(21):5598-604.
15. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996 Jan;137(1):354-66.
16. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Feb 15;402:86-94.
17. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-alpha agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. *Cell Biochem Funct*. 2015 Jun;33(4):249-56.
18. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jun;96(6):1654-63.
19. Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes Rev*. 2009 Mar;10 Suppl 1:24-33.
20. Bray GA. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *J Nutr*. 2002 Nov;132(11 Suppl):3451S-5S.
21. Narkiewicz K. Obesity and hypertension--the issue is more complex than we thought. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Feb;21(2):264-7.
22. Oms O, Pares JM, Martinez-Navarro B, Agusti J, Toro I, Martinez-Fernandez G, et al. Early human occupation of Western Europe: paleomagnetic dates for two paleolithic sites in Spain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10666-70.
23. Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 2:7-12.

24. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2018: 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 2018. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2019. 131p.
25. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017 Jan 3;127(1):1-4.
26. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
27. Duren DL, Sherwood RJ, Czerwinski SA, Lee M, Choh AC, Siervogel RM, et al. Body composition methods: comparisons and interpretation. *J Diabetes Sci Technol*. 2008 Nov;2(6):1139-46.
28. Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Arch Dis Child*. 2006 Jul;91(7):612-7.
29. Lo K, Wong M, Khalechelvam P, Tam W. Waist-to-height ratio, body mass index and waist circumference for screening paediatric cardio-metabolic risk factors: a meta-analysis. *Obes Rev*. 2016 Dec;17(12):1258-75.
30. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. 4ª ed. São Paulo, SP: ABESO; 2016. 186 p.
31. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):652-60.
32. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:1229-37.
33. Haslam D. Weight management in obesity - past and present. *Int J Clin Pract*. 2016 Mar;70(3):206-17.
34. Klein S, Sheard NF, Pi-Sunyer X, Daly A, Wylie-Rosett J, Kulkarni K, et al. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies: a statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *Diabetes Care*. 2004 Aug;27(8):2067-73.

35. Wadden TA, McGuckin BG, Rothman RA, Sargent SL. Lifestyle modification in the management of obesity. *J Gastrointest Surg.* 2003 May-Jun;7(4):452-63.
36. Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Jan;14(1):12-24.
37. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Valles V, Rios-Torres JM, Franco A, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Arch Med Res.* 2004 Jan-Feb;35(1):76-81.
38. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Apr;26(4):193-200.
39. Lim S, Eckel RH. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014 Dec;15(4):329-41.
40. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 2002 Jan 16;287(3):356-9.
41. Saúde OP-Ad. Tobacco control report for the Region of the Americas. Washington; 2011.
42. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet.* 2011 Jun 4;377(9781):1949-61.
43. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009 Oct 20;120(16):1640-5.
44. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.
45. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Cardiol.* 2005 Apr; 84(Suppl 1):3-28.
46. Gonzalez-Muniesa P, Martinez-Gonzalez MA, Hu FB, Despres JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun 15;3:17034.
47. Mozumdar A, Liguori G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care.* 2011 Jan;34(1):216-9.

48. Ramires E, Menezes RCE, Longo-Silva G, Santos TGD, Marinho PM, Silveira J. Prevalence and Factors Associated with Metabolic Syndrome among Brazilian Adult Population: National Health Survey - 2013. *Arq Bras Cardiol.* 2018 May;110(5):455-66.
49. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care.* 2003 Mar;26(3):575-81.
50. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med.* 2004 May 24;164(10):1066-76.
51. Oh JY, Hong YS, Sung YA, Barrett-Connor E. Prevalence and factor analysis of metabolic syndrome in an urban Korean population. *Diabetes Care.* 2004 Aug;27(8):2027-32.
52. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2052-9.
53. Torres-Rovira L, Astiz S, Caro A, Lopez-Bote C, Ovilo C, Pallares P, et al. Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:510149.
54. te Pas MF, Koopmans SJ, Kruijt L, Calus MP, Smits MA. Plasma proteome profiles associated with diet-induced metabolic syndrome and the early onset of metabolic syndrome in a pig model. *PLoS One.* 2013;8(9):e73087.
55. Costa NMBP, M.C.G. *Nutrição básica e metabolismo.* UFV. 2008.
56. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004 Apr;79(4):537-43.
57. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition.* 2010 Nov-Dec;26(11-12):1044-9.
58. Sanchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, et al. Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *Eur J Nutr.* 2010 Feb;49(1):1-9.
59. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Aug;295(2):E227-37.
60. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010 Jun;51(6):1961-71.

61. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 May;7(5):251-64.
62. Rodrigues A, Costa ABP, Campos DL, Silva MPS, Candido AL, Santos LCD, et al. Low validity of predictive equations for calculating resting energy expenditure in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *J Hum Nutr Diet*. 2018 Apr;31(2):266-75.
63. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J*. 1990 Jun;4(9):2652-60.
64. Dirlwanger M, Schneiter P, Jequier E, Tappy L. Effects of fructose on hepatic glucose metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E907-11.
65. Rizkalla SW. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Nov 4;7:82.
66. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Nov;83(5 Suppl):S192-203.
67. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Oct;11(8):327-32.
68. Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*. 2000 Oct;16(10):903-8.
69. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat-functional implications. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(9):1243-50.
70. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013 Sep;154(9):2992-3000.
71. Lidell ME, Betz MJ, Enerback S. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*. 2014 Jan 1;3(1):63-6.
72. Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2015 Jul;241(1):27-35.
73. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Nov;1212:E20-36.

74. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359.
75. Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond).* 2010 Dec;34 Suppl 2:S59-66.
76. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2):366-76.
77. Betz MJ, Enerback S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes.* 2015 Jul;64(7):2352-60.
78. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017 Jan 18;31(1).
79. Haraida S, Nerlich AG, Wiest I, Schleicher E, Lohrs U. Distribution of basement membrane components in normal adipose tissue and in benign and malignant tumors of lipomatous origin. *Mod Pathol.* 1996 Feb;9(2):137-44.
80. Lee SH, Park HS, Lee JA, Song YS, Jang YJ, Kim JH, et al. Fibronectin gene expression in human adipose tissue and its associations with obesity-related genes and metabolic parameters. *Obes Surg.* 2013 Apr;23(4):554-60.
81. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, et al. Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem.* 1992 May 5;267(13):9210-3.
82. Yamashita H, Kizaki T, Ookawara T, Sato Y, Yamamoto M, Ohira Y, et al. Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sci.* 1994;55(2):141-8.
83. Gomez-Hernandez A, Beneit N, Diaz-Castroverde S, Escribano O. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1216783.
84. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Sep 1;305(5):E567-72.
85. Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res.* 2002 Nov-Dec;34(11-12):629-34.
86. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1:3-10.

87. Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*. 2017 Mar;134:3-8.
88. Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Oct;289(4):E617-26.
89. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013 Jun;62(6):1774-82.
90. Smith RE, Hock RJ. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science*. 1963 Apr 12;140(3563):199-200.
91. Smith RE. Thermoregulatory and Adaptive Behavior of Brown Adipose Tissue. *Science*. 1964 Dec 25;146(3652):1686-9.
92. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):200-5.
93. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):215-23.
94. Berbee JF, Boon MR, Khedoe PP, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun*. 2015 Mar 10;6:6356.
95. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbee JFP, Worthmann A, Cherradi ML, et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun*. 2017 Apr 19;8:15010.
96. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1252-63.
97. Gnad T, Scheibler S, von Kugelgen I, Scheele C, Kilic A, Glode A, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*. 2014 Dec 18;516(7531):395-9.
98. Ouellet V, Labbe SM, Blondin DP, Phoenix S, Guerin B, Haman F, et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):545-52.
99. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*. 2013 Aug;123(8):3395-403.

100. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012 Apr;53(4):619-29.
101. Sbarbati A, Morrioni M, Zancanaro C, Cinti S. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *Int J Obes.* 1991 Sep;15(9):581-7.
102. Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology.* 1997 Feb;138(2):797-804.
103. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 2010 Apr 7;11(4):253-6.
104. Bartness TJ, Wade GN. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav Neurosci.* 1984 Aug;98(4):674-85.
105. Dulloo AG, Miller DS. Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol.* 1984 Feb;62(2):235-40.
106. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science.* 2006 May 5;312(5774):734-7.
107. Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M, et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab.* 2011 Jun 8;13(6):739-48.
108. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347-55.
109. Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, et al. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab.* 2009 Jan 7;9(1):99-109.
110. Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, Nedergaard J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta -adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem.* 2000 May 5;275(18):13802-11.
111. Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 10;109(15):5874-9.

112. Sung HK, Doh KO, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* 2013 Jan 8;17(1):61-72.
113. Kolonin MG, Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med.* 2004 Jun;10(6):625-32.
114. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10730-5.
115. Brakenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, et al. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res.* 2004 Jun 25;94(12):1579-88.
116. Elias I, Franckhauser S, Ferre T, Vila L, Tafuro S, Munoz S, et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2012 Jul;61(7):1801-13.
117. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2476-81.
118. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 09;360(15):1518-25.
119. Harrington WW, C SB, J GW, N OM, J GB, D CL, et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res.* 2007;2007:97125.
120. De Duve C, Beaufay H, Jacques P, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, et al. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1960 May 6;40:186-7.
121. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol.* 2006 Apr 24;536(1-2):182-91.
122. Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition.* 2009 Jul-Aug;25(7-8):818-27.
123. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006 Jun;110(3):371-85.

124. Salvado L, Serrano-Marco L, Barroso E, Palomer X, Vazquez-Carrera M. Targeting PPARbeta/delta for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Feb;16(2):209-23.
125. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4699-707.
126. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32048-54.
127. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):141-8.
128. Brady PS, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR. Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs. *Biochem J*. 1989 May 15;260(1):93-100.
129. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 Sep 16;4:14.
130. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1489-98.
131. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPARalpha. *Mol Metab*. 2014 Jul;3(4):354-71.
132. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, Marinho Tde S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. *Life Sci*. 2015 Apr 15;127:73-81.
133. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie*. 2017 Sep;140:106-16.
134. Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential actions of PPAR-alpha and PPAR-beta/delta on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191365.

135. Corsini A, Bellosta S, Davidson MH. Pharmacokinetic interactions between statins and fibrates. *Am J Cardiol.* 2005 Nov 7;96(9A):44K-9K; discussion 34K-5K.
136. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
137. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry.* 2009 Apr;55(4):611-22.
138. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine.* 2015 Nov;50(2):355-67.
139. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 5;14(11):21873-86.
140. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.
141. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One.* 2012;7(7):e39837.
142. de Oliveira Correia BR, Rachid TL, de Oliveira Glauser JS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. High dose of linagliptin induces thermogenic beige adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Endocrine.* 2019 Aug;65(2):252-62.
143. Gambaro SE, Zubiria MG, Portales AE, Rey MA, Rumbo M, Giovambattista A. M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. *J Nutr Biochem.* 2018 Nov;61:173-82.
144. Hondares E, Rosell M, Diaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 2011 Dec 16;286(50):43112-22.

145. Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1486-93.
146. Arch JR, Hislop D, Wang SJ, Speakman JR. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)*. 2006 Sep;30(9):1322-31.
147. He H, Yang D, Ma L, Luo Z, Ma S, Feng X, et al. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension*. 2010 Apr;55(4):869-79.
148. Jiang L, Wan J, Ke LQ, Lu QG, Tong NW. Activation of PPARdelta promotes mitochondrial energy metabolism and decreases basal insulin secretion in palmitate-treated beta-cells. *Mol Cell Biochem*. 2010 Oct;343(1-2):249-56.
149. Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Curr Obes Rep*. 2015 Jun;4(2):224-9.
150. Zhao Y, Li X, Yang L, Eckel-Mahan K, Tong Q, Gu X, et al. Transient Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor A in Adipose Tissue Promotes Energy Expenditure via Activation of the Sympathetic Nervous System. *Mol Cell Biol*. 2018 Nov 15;38(22).
151. Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep*. 2015 Jan 13;10(2):266-79.
152. Gonzalez-Hurtado E, Lee J, Choi J, Wolfgang MJ. Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Mol Metab*. 2018 Jan;7:45-56.
153. Jeong S, Yoon M. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPARalpha in high fat diet-induced obese mice. *Exp Mol Med*. 2009 Jun 30;41(6):397-405.
154. Townsend KL, An D, Lynes MD, Huang TL, Zhang H, Goodyear LJ, et al. Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Jul 20;19(3):243-57.
155. Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Hu R, et al. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells*. 2010 Feb;15(2):91-100.

156. Yu J, Zhang S, Cui L, Wang W, Na H, Zhu X, et al. Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1853(5):918-28.
157. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem*. 2000 Feb 18;275(7):5011-5.
158. Jimenez M, Barbatelli G, Allevi R, Cinti S, Seydoux J, Giacobino JP, et al. Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem*. 2003 Feb;270(4):699-705.
159. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012 May 11;149(4):871-85.
160. Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrugge M, Proenza AM, Gianotti M, Llado I. Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Mol Cell Biochem*. 2013 Jan;373(1-2):125-35.
161. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jan;28(1):15-23.

ANEXO A - Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos da capsaicina e de agonistas PPAR no remodelamento do tecido adiposo, fígado e intestino de camundongos alimentados com excesso de lipídios ou frutose**", registrada com o nº 041/2018, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 31/07/2018.



Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	90
Peso/Idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Submissão do artigo

NUTRITION Contact us  Help ? 

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: souzamello.uerj@gmail.com
Switch To: Author ▼ Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2019.8

Submissions Being Processed for Author Vanessa Souza-Mello, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 ▼ results per page.

⊕ Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
Action Links	NUT-D-19-01043	PPAR-alpha activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat and high-fructose-fed mice	2019-11-08 23:21:09	2019-12-01 10:37:13	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 ▼ results per page.

<< Author Main Menu