



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

Tamiris Lima Rachid Carvalho

**PPAR- α e PPAR- β/δ : Efeitos singulares sobre a plasticidade do
tecido adiposo branco-marrom e potencialização da termogênese
no tecido adiposo marrom de camundongos obesos**

Rio de Janeiro
2019

Tamiris Lima Rachid Carvalho

**PPAR- α e PPAR- β/δ : Efeitos singulares sobre a plasticidade do tecido adiposo
branco-marrom e potencialização da termogênese no tecido adiposo marrom
de camundongos obesos**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências do Programa de Pós-graduação em
Biologia Humana e Experimental da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof^a Dra Vanessa Souza-Mello

Coorientadora: Prof^a Dra Isabele Bringuenti Sarmento

Rio de Janeiro

2019

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

C331 Carvalho, Tamiris Lima Rachid.

PPAR- α e PPAR- β/δ : efeitos singulares sobre a plasticidade do tecido adiposo branco-marrom e potencialização da termogênese no tecido adiposo marrom de camundongos obesos / Tamiris Lima Rachid Carvalho. – 2019.
90 f.

Orientadora: Vanessa Souza-Mello.

Coorientadora: Isabele Bringuenti Sarmento

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade- Teses. 2. Tecido adiposo branco - Teses. 3. Tecido adiposo marrom – Teses. 4. Termogênese - Teses. 5. Proliferadores de Peroxissomos. I. Mello, Vanessa Souza. II. Sarmento, Isabele Bringuenti. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. IV. Título.

CDU 613.24

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

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

Assinatura

Data

Tamiris Lima Rachid Carvalho

**PPAR- α e PPAR- β/δ : Efeitos singulares sobre a plasticidade do tecido adiposo
branco-marrom e potencialização da termogênese no tecido adiposo marrom
de camundongos obesos**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências do Programa de Pós-graduação
em Biologia Humana e Experimental da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Coorientadora: Prof^a Dra Isabele Bringhamti Sarmento
Universidade Federal de Juiz de Fora

Banca Examinadora: _____

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

Prof. Dr Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra Milena Barcza Sotckler-Pinto
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dra Tereza Cristina Lonzetti Bargut
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e minha família
pelo exemplo de amor que são para mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por ser minha certeza nos momentos difíceis e por me conceder capacidade para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo, que durante toda minha caminhada profissional sempre foi meu incentivador, alicerce junto à Deus que me permitiu ver todo meu potencial e nunca duvidar de onde eu poderia chegar, te amo e agradeço a Deus por ter um parceiro que sonha e vive meus sonhos como os seus.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu estudasse e fosse além de uma profissional competente, uma mulher de valores éticos e morais com caráter inviolável. Se cheguei até aqui foi graças a toda essa dedicação, amo vocês!

À minha família, meu irmão Leonardo, meus meninos Bruno e Pedro, meus tios-avôs Rosa e Oswaldo, minhas cunhadas Emanuelle e Sthefany, por compartilharem meus sonhos e conquistas e por toda atenção e paciência a mim dedicadas nos momentos em que precisei me ausentar para que esse projeto fosse concluído com sucesso, muito obrigada por serem meus.

Aos meus amigos que abrandaram a vida com momentos alegres, obrigada por serem um refúgio para minha vida em meio as tribulações do doutorado. Obrigada aos meus amigos e vizinhos, minhas amigas nutricionistas, meus padrinhos e madrinhas e em especial minha querida amiga Thaís que mesmo na distância sempre torceu por mim.

À minha amiga e orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa Souza-Mello, por ser fundamental não somente em minha caminhada científica como também em minha vida pessoal sendo uma grande amiga, obrigada por me ensinar tanto e por nunca podar o meu crescimento e sempre acreditar e torcer por mim.

À minha amiga e coorientadora Prof^a. Dr^a Isabele Bringuenti, que desde a iniciação científica foi um grande exemplo de pesquisadora e nutricionista para mim, obrigada pela contribuição em todos os meus projetos, amizade e discussões nutricionais compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e a Prof^a. Dr^a. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda por me receberem no LMMC em 2008 como aluna de

iniciação científica e possibilitarem desenvolver um trabalho de qualidade nesse grupo com tanto reconhecimento.

Às minhas grandes amigas: Aline, Thereza, Celina, Fernanda e Iara, quantas coisas passamos até chegar aqui, me faltam palavras para agradecer a amizade, apoio e cumplicidade que construímos ao longo desse tempo. A contribuição científica de vocês ajudou muito, sem dúvida, mas a contribuição como ser humano me tornou muito melhor do que antes, obrigada por partilharem todos esses anos comigo, tudo teria sido muito mais difícil sem vocês.

Ao grupo de orientados da professora Vanessa, a quem com carinho chamamos Vanessetes: Fran, Flávia, Carolline, Byanca e Felipe, com vocês partilhamos a divisão do trabalho sem interesse, divisão do fardo quando um não aguenta e a alegria multiplicada quando os resultados são alcançados. Sou muito grata de sermos um grupo tão unido e que cuida tanto um do outro, obrigada por todo apoio, vocês foram fundamentais para o sucesso não só dos meus trabalhos, mas os trabalhos de todo o nosso grupo.

À Prof^a. Dr^a Sandra Barbosa, pela amizade e apoio dedicado ao longo desses anos.

Aos amigos do LMMC que partilharam comigo ao longo desses 10 anos de laboratório tantas conquistas e frustrações naturais na vida de pesquisador, um trabalho não se realiza sozinho, obrigada por toda contribuição até aqui.

Aos técnicos e funcionários por todo suporte oferecido, obrigada.

À CAPES e FAPERJ por todo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.

Santo Agostinho

RESUMO

RACHID, Tamiris Lima. **PPAR- α PPAR- β/δ : Efeitos singulares sobre a plasticidade do tecido adiposo branco-marrom e potencialização da termogênese no tecido adiposo marrom de camundongos obesos**. 2019. 90f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

A obesidade enquanto entidade nosológica complexa estimula a busca por tratamentos que sanem as alterações metabólicas por ela ocasionadas. Os receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs) são fatores de transcrição essenciais à adipogênese e à plasticidade do adipócito, mas o papel isolado das isoformas alfa e beta no fenômeno *browning* e nas alterações no tecido adiposo marrom (TAM) termogenicamente ativo ainda não está descrito. Este trabalho possui objetivo principal de avaliar os efeitos da ativação do PPAR- α ou PPAR- β/δ sobre a indução de células beges no tecido adiposo branco subcutâneo e na via termogênica do tecido adiposo marrom em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG (CEUA, protocolo N° 034/2016). 60 animais foram aleatoriamente alocados no grupo controle (C, dieta baseada na AIN-93M para roedores, com 10% da energia derivada de lipídeos) ou no grupo hiperlipídico (HF, dieta baseada na AIN-93M para roedores, com 50% da energia derivada de lipídeos) por 10 semanas. Cada grupo foi então redividido para o início do tratamento de quatro semanas, totalizando seis grupos (n=10, cada): C, C-alfa (C acrescido de agonista PPAR- α , 2,5 mg/kg de massa corporal-MC), C-beta (C acrescido de agonista PPAR- β , 1 mg/kg MC), HF, HF-alfa (HF acrescido de agonista PPAR- α), e HF- β (HF acrescido de agonista PPAR- β). Os agonistas foram adicionados às respectivas dietas. Os animais HF apresentaram sobrepeso, intolerância oral à glicose e hipertrofia dos adipócitos. Ambos tratamentos reverteram esses parâmetros. O fenômeno *browning*, verificado pela presença de células beges multiloculares positivas para UCP1 e aumento da temperatura corporal, foi somente observado nos grupos tratados com agonista PPAR- α . A ativação do PPAR- α também promoveu aumento significativo da expressão do gene seletivo para o adipócito bege TMEM26, do gene efetor da termogênese UCP1 e do PRDM16, essencial para a manutenção do fenótipo bege. O aumento da expressão gênica de CIDEA concomitante à redução da expressão gênica e proteica de UCP1 nos animais tratados com PPAR- β podem justificar o predomínio do fenótipo branco nos seus adipócitos, embora com uma expressiva redução da área seccional média dessas células, o tratamento com PPAR- α também foi capaz de aumentar o gasto energético. O agonista PPAR- α aumentou ainda a expressão gênica de PPAR- α , PGC1- α , PRDM16, β 3-AR, BMP-8b, PDK4 e TFAM no TAM. Esse trabalho mostra que o tratamento com agonista PPAR- β aliviou as desordens metabólicas pelo aumento da β -oxidação e melhora da tolerância à glicose, enquanto o agonista PPAR- α foi confirmado como um alvo terapêutico promissor para tratar doenças metabólicas a partir da indução de adipócitos beges e aumento da termogênese.

Palavras-chave: PPAR- α , PPAR- β/δ . Tecido adiposo branco. *Browning*. Tecido adiposo marrom. Termogênese.

ABSTRACT

RACHID, Tamiris Lima. **Singular effects on plasticity of white-brown adipose tissue and potentiation of thermogenesis in brown adipose tissue of obese mice.** 2019. 90f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

Obesity as a complex nosological entity stimulates the search for treatments to heal its metabolic alterations. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are essential transcription factors for adipogenesis and adipocyte plasticity, but the isolated role of alpha and beta isoforms in the browning phenomenon and changes in thermogenically active brown adipose tissue (BAT) is not yet described. The present study aimed to evaluate the effects of PPAR- α or PPAR- β/δ activation on the induction of beige cells in the subcutaneous white adipose tissue (WATs) and thermogenic pathway of BAT in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. All procedures were approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals of IBRAG (CEUA, protocol No. 034/2016). Sixty animals were randomly allocated to the control group (C, diet based on AIN-93M for rodents, with 10% of the energy derived from lipids) or in the hyperlipid group (HF, diet based on AIN-93M for rodents, with 50% energy derived from lipids) for 10 weeks. Each group was then redivided for the initiation of the four-week treatment, totaling six groups (n = 10, each): C, C-alpha (C plus PPAR-alpha agonist C, 2.5 mg / kg body mass-BM), C-beta (C plus PPAR-beta agonist, 1 mg / kg BM), HF, HF-alpha (HF plus PPAR-alpha agonist), and HF-beta (HF plus PPAR-beta agonist). Agonists were added to the respective diets. HF animals were overweight, oral glucose intolerance and had adipocyte hypertrophy. Both treatments reversed these parameters. The browning phenomenon, verified by the presence of multilocular beige cells positive for UCP1 and increased body temperature, was only observed in the groups treated with PPAR-alpha agonist. Activation of PPAR-alpha also promoted a significant increase in the expression of the selective gene for the beige adipocyte TMEM26, the effector gene of thermogenesis UCP1 and PRDM16, essential for the maintenance of the beige phenotype. Increased gene expression of CIDEA concomitant with the reduction of UCP1 gene and protein expression in animals treated with PPAR-beta may justify the predominance of the white phenotype in its adipocytes, although with a significant reduction in the mean sectional area of these cells, treatment with PPAR- α was also able to increase energy expenditure. The PPAR- α agonist also increased the gene expression of PPAR- α , PGC1- α , PRDM16, β 3-AR, BMP-8b, PDK4 and TFAM in TAM. This work shows that treatment with PPAR-beta agonist relieved metabolic disorders by increasing beta-oxidation and improved glucose tolerance, while the PPAR-alpha agonist was confirmed as a promising therapeutic target for treating metabolic diseases from induction of beige adipocytes and increased thermogenesis.

Keywords: PPAR- α . PPAR- β/δ . White adipose tissue. Browning. Brown adipose tissue. Thermogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Infográfico – Eutrofia x Obesidade.....	17
Figura 2 – Mecanismos de ação do PPAR	20
Figura 3 – Representação esquemática do adipócito do tecido adiposo branco.....	26
Figura 4 – Representação esquemática do adipócito do tecido adiposo marrom....	28
Figura 5 – Representação esquemática dos adipócitos beges no TABs.....	29
Figura 6 – Esquema do desenho experimental.....	33
Figura 7 – Evolução da Massa Corporal.....	42
Figura 8 – Curva e Área sob a curva (ASC) do TOTG.....	44
Figura 9 – Gasto Energético.....	46
Figura 10 – Temperatura (°C) e imagens termográficas dos camundongos.....	47
Figura 11 – Área seccional média dos adipócitos e fotomicrografias do TABs.....	49
Figura 12 – Imunofluorescência de UCP-1 no TABs.....	50
Figura 13 – Expressão gênica – PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ e PGC1- α	52
Figura 14 – Expressão gênica – PRDM16, TMEN26, CIDEA e CPT-1b.....	54
Figura 15 – Expressão gênica – RA β -3, BMP8, UCP-1 e FNDC5/Irisina.....	55
Figura 16 – Expressão gênica – TFAM e NRF-1.....	56
Figura 17 – Fotomicrografias do TAMi.....	57
Figura 18 – Imunofluorescência de UCP-1 no TAMi.....	58
Figura 19 – Expressão gênica – PPAR- α , PPAR- β , PGC1- α e PRDM16.....	60
Figura 20 – Expressão gênica – RA β -3, BMP8, UCP-1 e PDK4.....	61
Figura 21 – Expressão gênica – TFAM e NRF-1.....	62
Figura 22 – Alterações no TABs após o tratamento com PPAR- α e PPAR- β	68
Figura 23 – Esquema: Alterações no TAMi.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais.....	34
Tabela 2 – Detalhamento dos primers utilizados.....	40
Tabela 3 – Comportamento alimentar.....	43
Tabela 4 – Parâmetros metabólicos.....	45

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ASC	Área sob a curva
AG	Ácido graxo
BE	Balanço energético
BMP8	<i>Bone morphogenetic protein 8</i>
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
FNDC5/Irisina	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5/Irisina</i>
HF	Grupo que recebeu dieta <i>high-fat</i>
HF- α	Grupo que recebeu dieta <i>high-fat</i> com PPAR- α
HF- β/δ	Grupo que recebeu dieta <i>high-fat</i> com PPAR- β/δ
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment-insulin resistance</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IA	Índice de Adiposidade
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
MC	Massa Corporal
Myf5 ⁺	Fator miogênico 5 positivo
PPAR	Receptores ativados de proliferação peroxissomal
PPAR- α	Receptor ativado de proliferação peroxissomal alfa
PPAR- β/δ	Receptor ativado de proliferação peroxissomal beta
PPERs	Elementos de resposta de proliferação peroxissomal
PGC1- α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gammacoactivator-1alpha</i>
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RA	Receptor adrenérgico
RA β	Receptor adrenérgico beta
RA β 3	Receptor adrenérgico beta 3
SC	Grupo que recebeu dieta <i>standard-chow</i>
SC- α	Grupo que recebeu dieta <i>standard-chow</i> com PPAR- α
SC- β/δ	Grupo que recebeu dieta <i>standard-chow</i> com PPAR- β/δ
SM	Síndrome Metabólica
TA	Tecido Adiposo
TAB	Tecido Adiposo Branco

TABs	Tecido Adiposo Branco subcutâneo
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TAMi	Tecido Adiposo Marrom interescapular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
UCP-1	Proteína desacopladora mitocondrial 1
VCO ₂	Produção de gás carbônico
VO ₂	Consumo de oxigênio
Vigitel	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1	Obesidade.....	17
1.2	PPARs.....	20
1.2.1	<u>PPAR-α.....</u>	21
1.2.2	<u>PPAR- β/δ.....</u>	22
1.3	Termogênese.....	23
1.4	Tecido adiposo.....	24
1.4.1	<u>Tecido adiposo branco.....</u>	25
1.4.2	<u>Tecido adiposo marrom.....</u>	27
1.4.3	<u>Tecido adiposo bege.....</u>	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivo Específico.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Animais e Dieta.....	32
3.2	Massa Corporal e Ingestão Alimentar.....	35
3.3	Teste oral de tolerância à glicose.....	35
3.4	Calorimetria Indireta.....	35
3.5	Termografia.....	36
3.6	Sacrifício e extração de tecidos.....	36
3.7	Análise Plasmática.....	37
3.8	Histologia.....	37
3.9	Estereologia.....	38
3.10	Imunofluorescência.....	38
3.11	PCR quantitativo em tempo real.....	39
3.12	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética.....	41
4.2	Teste oral de tolerância à glicose.....	44

4.3	Parâmetros metabólicos.....	44
4.4	Calorimetria.....	46
4.5	Termografia.....	46
4.6	Resultados do tecido adiposo branco.....	48
4.6.1	<u>Histologia e Estereologia.....</u>	48
4.6.2	Imunofluorescência.....	50
4.6.3	<u>PCR quantitativo em tempo real.....</u>	50
4.7	Resultados do tecido adiposo marrom.....	57
4.7.1	<u>Histologia.....</u>	57
4.7.2	<u>Imunofluorescência.....</u>	58
4.7.3	<u>PCR quantitativo em tempo real.....</u>	59
5	DISCUSSÃO.....	63
	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE – Comprovantes de publicação de artigos científicos.....	85
	ANEXO - Comitê de ética em experimentação animal.....	90

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é considerada uma entidade nosológica de caráter multifatorial decorrente de balanço energético (BE) positivo, que resulta no acúmulo de gordura, associado a riscos para a saúde devido à sua relação com complicações metabólicas. Entre suas causas, estão relacionados fatores: genéticos, econômico-sociais, ambientais, culturais, dentre outros (WHO 2000).

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 porque interfere na expectativa e qualidade de vida (Seidell and Halberstadt 2015). De forma importante, a obesidade ainda possui implicações na aceitação social dos indivíduos quando excluídos da estética difundida pela sociedade contemporânea. As doenças não transmissíveis são as principais causas de óbitos em adultos no Brasil, sendo a obesidade um dos fatores de maior risco para o adoecimento neste grupo (Schmidt, Duncan et al. 2011). A obesidade, enquanto doença inflamatória crônica, está associada ao potencial de secreção de citocinas pelo tecido adiposo (TA).

O TA exerce um papel central no BE, sendo importante na gênese da obesidade, os adipócitos são as únicas células que possuem especialização para armazenar lipídeos sem que isso comprometa a sua integridade funcional. Possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos e estocar triacilgliceróis (TAG) quando a oferta de energia for abundante e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit energético (Ahima and Flier 2000).

Nos mamíferos, existem dois tipos de TA: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Os adipócitos destes tecidos possuem diferenças importantes. O adipócito branco maduro armazena TAG em uma única e grande gotícula lipídica que ocupa a porção central da célula, promovendo o deslocamento do núcleo para a periferia e seu consequente achatamento. A existência de uma única gotícula lipídica, a qual ocupa entre 85-95% do volume celular, caracteriza o adipócito branco como unilocular (Giralt and Villarroya 2013; Lidell, Betz et al. 2014).

O TAM, especializado na produção de calor - termogênese - está praticamente ausente em humanos adultos, mas é encontrado em fetos e recém-nascidos. Seu adipócito é menor que o branco e 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 (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007).

Ambos os tecidos branco e marrom apresentam características metabolicamente ativas, o TAB secreta adipocinas, dentre elas a FNDC5/irisina, que tem sido descrita como uma adipocina, secretada principalmente pelo TAB subcutâneo (TABs) (Bostrom, Wu et al. 2012), e é um importante marcador para a plasticidade do tecido adiposo branco-marrom “browning” com a formação de adipócitos beges (Bostrom, Wu et al. 2012; Spiegelman 2013) e o TAM como já descrito possui capacidade termogênica adaptativa.

O tratamento da obesidade vem sendo buscado de forma constante e o uso de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) em dados prévios mostraram que níveis elevados de FNDC5/irisina, PPAR- α e PPAR- β / δ , após a administração de fenofibrato (agonista PPAR- α) a camundongos obesos, levaram à formação de adipócitos beges positivos para proteína desacopladora-1 (UCP-1), que expressam genes típicos do TAM (PRDM16 e BMP8b) no TABs, indicando atividade termogênica aumentada (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015) no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

Também foi observado que a ativação simultânea das isoformas PPAR- α e PPAR- β provocou alta expressão da UCP-1 no TAM, favorecendo a termogênese adaptativa e o GE (Wu, Cohen et al. 2013). Além disso, a ativação do PPAR- α pelo fenofibrato induziu adipócitos metabólicos ativos, mas também causou uma co-ativação do PPAR- β (Ricquier 2017), o que implica um possível papel do PPAR- β na termogênese adaptativa no TAM.

Apesar da evidência de que a ativação do PPAR- α pelo fenofibrato estimulou o “browning” e a termogênese adaptativa no TAM, parece haver também uma contribuição da isoforma PPAR- β . Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da ativação do PPAR- α ou PPAR- β / δ sobre a indução de células beges no TABs e na via termogênica do TAM em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

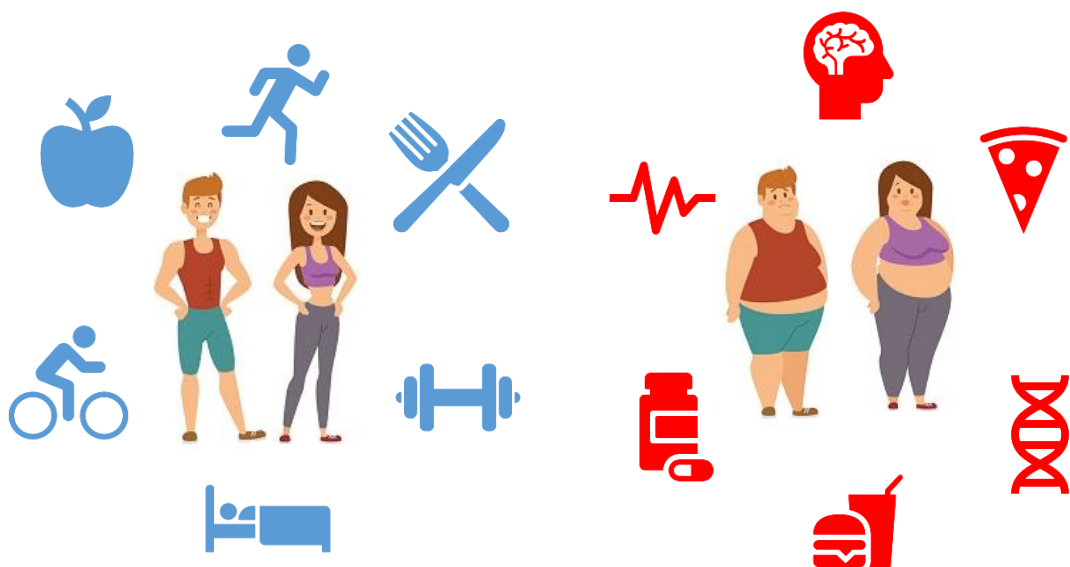
1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade: panorama geral

De acordo com a OMS, a obesidade é considerada uma entidade nosológica de caráter multifatorial decorrente de BE positivo que resulta no acúmulo de gordura, associado a riscos para a saúde devido à sua relação com complicações metabólicas. Entre suas causas, estão relacionados fatores: genéticos, econômico-sociais, ambientais, culturais, dentre outros (WHO 2000).

A obesidade tem apresentado crescente prevalência tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Swinburn, Sacks et al. 2011), e essa pandemia apresenta origens no processo de transição nutricional, caracterizado pelo consumo excessivo de gordura saturada e de açúcares simples associados ao sedentarismo (Astrup and Brand-Miller 2012). Na figura abaixo observamos as principais práticas relacionadas a manutenção e perda de peso e as consequências quando a obesidade se instala nos indivíduos. (Figura 1).

Figura 1 - Infográfico – Eutrofia x Obesidade



Legenda: À esquerda é possível observar indivíduos eutróficos com manutenção da atividade física, práticas alimentares adequadas e bons hábitos de sono auxiliando na manutenção e na perda de peso, à direita visualizamos o cenário da obesidade instalada com práticas alimentares inadequadas e influência genética ocasionando diversas co-morbidades.

Fonte: A autora, 2019.

Ainda neste século estima-se que ocorrerá o aumento potencial da prevalência desta doença em países em desenvolvimento. Em 2013 foi realizada uma estimativa da prevalência mundial da obesidade atingindo mais de 600 milhões de pessoas, enquanto mais de dois bilhões apresentaram sobrepeso. As consequências dessa situação para a saúde da população mundial são alarmantes, afetando de modo intenso os custos econômicos e sociais (Popkin, Lu et al. 2002; Seidell and Halberstadt 2015). A obesidade está onerando o sistema de saúde devido à alta prevalência de patologias associadas e reduzindo a expectativa de vida de seus portadores em até oito anos (Swinburn, Sacks et al. 2011; Grover, Kaouache et al. 2014).

Dentro desse cenário observamos o aumento das comorbidades associadas como o diabetes mellitus tipo 2, que, calcula-se, acometerá 300 milhões de pessoas no mundo em 2025, além do aumento das doenças cardiovasculares que lideram a causa de mortalidade mundialmente (van Dieren, Beulens et al. 2010).

No Brasil, os valores relativos ao crescimento das prevalências de sobrepeso e obesidade são igualmente alarmantes. Dados do Vigitel Brasil (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico) em 2017 apresentaram as frequências de sobrepeso e obesidade na população brasileira avaliada, a frequência de excesso de peso foi de 54%, sendo maior entre homens (57,3%) do que entre mulheres (51,2%) e a frequência de adultos obesos foi de 18,9%, sem diferença entre os sexos. Em comparação ao resultado do Vigitel anterior houve aumento dos indicadores de sobrepeso e obesidade, a frequência de adultos com excesso de peso aumentou em média 1,14 pontos percentuais ao ano e a de obesos, em 0,67 pontos percentuais ao ano, acompanhando a evolução desfavorável dos indicadores de obesidade, a frequência de indivíduos com diagnóstico médico de diabetes aumentou em média 0,24 pontos percentuais ao ano.

Diversas estratégias para perda de peso já existem, porém perder peso e mantê-lo é extremamente difícil na maioria dos casos, por envolver não somente fatores biológicos mas também fatores emocionais (Fernandes, Ferreira-Santos et al. 2018). O processo de emagrecimento está diretamente relacionado ao quadro de BE negativo, caracterizado pela redução na ingestão alimentar em relação ao gasto energético (GE). O BE positivo provoca um desequilíbrio metabólico, resultando em um estoque excessivo de energia em forma de gordura com consequente aumento

da massa corporal total (Lowell and Spiegelman 2000; Dunham-Snary and Ballinger 2013).

A obesidade, enquanto doença inflamatória crônica, está associada ao potencial de secreção de citocinas pelo tecido adiposo (TA). A primeira molécula que relacionou obesidade e inflamação foi o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocina que foi encontrada superexpressa no TA de roedores em um modelo experimental de obesidade (Hotamisligil, Shargill et al. 1993; Sethi and Hotamisligil 1999), diversas outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, são significativamente expressas durante a obesidade (Lafontan and Girard 2008).

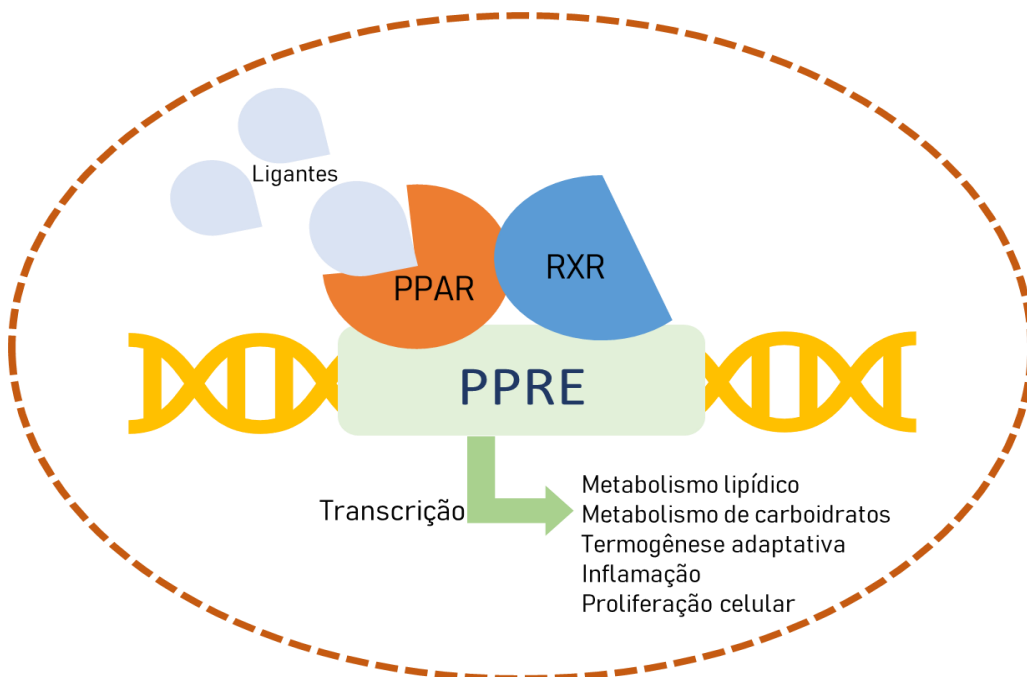
A leptina, uma adipocina, também encontra-se em altas níveis circulantes na obesidade, caracterizando hiperleptinemia, que promove desregulação do eixo adipoinsular (Vickers, Reddy et al. 2001). Altas concentrações de leptina provocadas pelo aumento na massa adiposa de indivíduos obesos, caracterizam a resistência à leptina, promovendo perda da capacidade supressora da leptina sobre a secreção de insulina pela célula beta pancreática no período pós-prandial, conduzindo assim ao quadro de hiperinsulinemia e resistência à insulina (Gray, Donald et al. 2010). Tal desregulação do metabolismo de carboidratos vem sendo apontada como o cerne do desenvolvimento de componentes da síndrome metabólica (SM).

A perda ponderal é o pilar do tratamento da obesidade, sendo capaz de reduzir o risco de diversas comorbidades associadas a esta patologia. A redução de MC fundamenta-se na ingestão energética limitada, caracterizada pela diminuição do aporte lipídico e menor metabolização de nutrientes, associada à atividade física regular (McNeel and Mersmann 2005; Vasselli, Weindruch et al. 2005). Contudo, o auxílio de fármacos destinados ao tratamento das doenças associadas também é utilizado como uma alternativa a estes efeitos deletérios (Wassink, Olijhoek et al. 2007). Camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dietas hiperenergéticas, que mimetizam a dieta das populações ocidentais, manifestam antecipadamente, e de forma intensa, sobrepeso e resistência à insulina (Surwit, Feinglos et al. 1995; Collins, Martin et al. 2004) representando um modelo para o estudo da obesidade em um período curto de tempo.

1.2 PPARs

Os PPARs são receptores intracelulares com três isoformas descritas: PPAR-alfa, PPAR-beta/delta e PPAR-gama. Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos à proliferação peroxissomal (PPREs). Os PPREs foram identificados em diversos genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e no BE. Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR alfa, beta/delta ou gama) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA para a transcrição de seus genes alvo (Vamecq and Latruffe 1999; Berger and Moller 2002), conforme figura 2 abaixo:

Figura 2 - Mecanismo de ação do PPAR



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

Fonte: A autora, 2019.

A utilização de agonistas dos PPARs tem sido descrita por apresentar efeitos benéficos sobre a ingestão alimentar, massa corporal, localização da deposição lipídica, melhora na esteatose pancreática e hepática, causadas pela administração de diferentes dietas (Nagasawa, Inada et al. 2006; Fernandes-Santos, Carneiro et al.

2009), além do remodelamento do TA com surgimento de células do tipo bege (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015).

1.2.1 PPAR- α

Em 1990, o PPAR- α , foi o primeiro receptor descoberto e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e no TAM (Sher, Yi et al. 1993; Braissant, Fufelle et al. 1996). Este receptor possui como ligantes naturais os ácidos graxos poliinsaturados e os leucotrienos que são importantes mediadores inflamatórios; como ligantes farmacológicos, a família das drogas hipolipidêmicas (“fibratos”) é considerada um importante agonista PPAR- α . Os fibratos são utilizados na prática clínica para tratamento de dislipidemia, com efeitos na redução de níveis de triglicerídeos e aumento dos níveis de HDL (Vamecq and Latruffe 1999; Tenenbaum and Fisman 2012). Já está bem descrito na literatura que a ativação do PPAR- α atua diretamente sobre a β -oxidação hepática, estimulando a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que participam deste processo, como a carnitina palmitol transferase-1 (CPT-1). Sua expressão é aumentada com a ativação do PPAR- α , conduzindo a um maior influxo mitocondrial de ácidos graxos para serem metabolizados (Brady, Marine et al. 1989; Tenenbaum, Motro et al. 2005). Uma consequente redução do acúmulo de gordura ectópica (fígado e pâncreas) é observada, melhorando a resistência global à insulina (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010; Shimabukuro, Kozuka et al. 2013). Em consequência, observa-se uma redução da adiposidade de animais que foram tratados com agonistas PPAR- α (Harrington, C et al. 2007).

A ativação de PPAR- α também ocorre através de ácidos graxos poli-insaturados n-3 no TABs e TAM em modelo experimental com efeitos metabólicos benéficos em ambos os tecidos adiposos. (Bargut, Martins et al. 2018).

Além disso, o óleo de peixe é capaz de aumentar a expressão de PPAR- α no TAM em associação com aumento de marcadores termogênicos nesse tecido (Bargut, Silva-e-Silva et al. 2016). Atualmente efeitos de agonistas PPAR- α vem sendo descritos no mecanismo do “browning” no TABs favorecendo o aumento do GE e redução na massa corporal, beneficiando assim modelos experimentais de obesidade (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015).

1.2.2 PPAR- β/γ

O PPAR- β/γ foi o segundo receptor a ser descoberto, no ano de 1992, O PPAR- β pode ser encontrado na maioria dos tecidos (Schmidt, Endo et al. 1992), seus efeitos metabólicos estão intimamente relacionados com o aumento da oxidação dos ácidos graxos e o consumo de energia (Tenenbaum and Fisman 2012). Quando super expresso no tecido adiposo de ratos o PPAR- β induz significativa perda de peso, protegendo contra a obesidade e dislipidemia provocadas por dieta hiperlipídica (Wang, Lee et al. 2003).

Trabalhos experimentais anteriores demonstraram que a ativação de PPAR- β através de ligantes poderia ser um possível tratamento para resistência insulínica devido a seus efeitos antiinflamatórios (Coll, Barroso et al. 2010; Serrano-Marco, Rodriguez-Calvo et al. 2011). Também já foi descrito que a ativação do PPAR- β apresenta efeitos anti-hipertensivos em ratos espontaneamente hipertensos (Zarzuelo, Jimenez et al. 2011).

A administração de GW501516 melhorou o estado inflamatório no TAB e diminuiu a ativação de células hepáticas estreladas a partir da redução da expressão gênica e protéica de marcadores da lipogênese e gliconeogênese no fígado em um modelo experimental com dieta rica em frutose (Magliano, Penna-de-Carvalho et al. 2015).

O tratamento com GW0742 em modelo experimental de obesidade foi capaz de reduzir a massa corporal, aliviar o estresse do retículo endoplasmático, melhorando a sensibilidade à insulina e maximizando o metabolismo da energético hepático (Silva-Veiga, Rachid et al. 2018).

Atualmente surgiram evidências de que o PPAR- β é um potencial alvo farmacológico para a tratamento de distúrbios associados à SM, pois sua ativação aumenta o catabolismo lipídico, melhora o perfil lipídico sérico e a sensibilidade à insulina em diferentes modelos experimentais (Coll, Rodriguez-Calvo et al. 2009; Wagner and Wagner 2010).

1.3 Termogênese

Uma das estratégias para combater o quadro de obesidade e suas alterações metabólicas é aumentar o GE estimulando a termogênese adaptativa (Peirce, Carobbio et al. 2014). O GE engloba três elementos: taxa metabólica basal (gasto de energia necessário para manter o funcionamento normal do organismo), a atividade física (GE desempenhado para a realização de atividade extra laboral) e a termogênese adaptativa (causada por tremor ou não tremor) (Lowell and Spiegelman 2000). A termogênese de não tremor “*non-shivering*”, foi descrita como uma característica exclusiva do TAM, devido seu potencial para dissipar o excesso de consumo de energia em forma de calor. no entanto, as evidências recentes demonstram que a expressão da UCP-1, conhecida como termogenina, juntamente com um perfil de expressão de genes semelhantes aos adipócitos marrons, induz o TABs a adquirir características do TAM, caracterizando o terceiro tipo de adipócitos bege ou castanhos (Spiegelman 2013; Wu, Cohen et al. 2013).

A termogênese adaptativa do TAM possui dois propósitos fisiológicos distintos, um estaria ligado à manutenção da temperatura corporal e o outro à queima do excesso de energia ingerida. No primeiro, temos a termogênese termorregulatória (induzida pelo frio), que visa manter a temperatura em homeostase. A exposição aguda ao frio promove a termogênese através da contração involuntária da musculatura esquelética (termogênese *shivering*), quando esta torna-se crônica, a dissipação de energia sem tremor se instala no TAM (termogênese *non-shivering*). No segundo, temos a termogênese metabolorregulatória (induzida por dieta, sempre do tipo *non-shivering*), cada vez mais estudada, contudo apresenta aspectos ainda pouco esclarecidos (Cannon and Nedergaard 2004). A termogênese adaptativa libera noradrenalina, que ativa receptores adrenérgicos localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons, dentre os subtipos existe o receptor beta 3 adrenérgico (RA β -3), o mais relevante para a ativação aguda da termogênese (Lafontan and Berlan 1993).

A UCP1, uma proteína situada na membrana interna da mitocôndria, é regulada por estímulos gerados através da sinalização simpática adrenérgica, desencadeando um desacoplamento da cadeia respiratória entre o consumo de oxigênio e síntese de ATP, levando assim à dissipação de energia sob a forma de

calor (Langin 2010). A coloração amarronzada do TAM é acarretada por uma elevada presença de mitocôndrias. Além disso, tem sido demonstrado que a UCP1 é um dos principais marcadores na identificação do TAM (Langin 2010; Rodriguez, Ezquerro et al. 2015). O gene coativador 1 alfa do PPAR-gama (PGC1-alfa) é altamente expresso no TAM e induz à expressão de UCP1, aumentando a capacidade oxidativa mitocondrial, sendo portanto fundamental para a termogênese (Hondares, Rosell et al. 2011).

1.4 Tecido Adiposo

Em humanos e roedores coexistem dois tipos clássicos de tecido adiposo. O TAB, de característica unilocular (reserva de uma única e macro gotícula de gordura), esse tecido encontra-se disperso e em maior proporção pelo organismo. Tem como característica principal a de reserva energética em forma de triglicerídeos e a mobilização desta reserva energética quando necessário, como por exemplo em períodos de privação de alimentação.

As células do tecido adiposo são denominadas adipócitos, suas características metabólicas principais são a síntese e reserva de energia em forma de triglicerídeos a partir de ácidos graxos denominado lipogênese e a mobilização desta reserva energética quando necessário; os triglicerídeos são utilizados através da liberação de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea para serem utilizados pelo organismo em resposta a alterações do BE, evento denominado lipólise (Kolditz and Langin 2010).

O TAM, de característica multilocular (reserva com diversas micro-gotículas de gordura), em humanos é descrito com potencial inversamente proporcional ao índice de massa corporal (Cypess, Lehman et al. 2009), é encontrado em menores quantidades e em sítios específicos, como a região interescapular de roedores, sendo denominado tecido adiposo marrom interescapular (TAMi). O TAM possui como principal função a liberação de energia em forma de calor, conhecida como termogênese adaptativa, ou seja, produção de calor a partir de energia química (átomos de carbonos ingeridos na dieta), estando intimamente relacionado ao GE, combatendo a hipotermia e a obesidade (Foster and Frydman 1978; Langin 2010).

Os adipócitos do TAM apresentam em sua conformação celular elevada quantidade de mitocôndrias, que conferem cor amarronzada ao tecido (Xue, Rim et al. 2007; Klingenspor, Herzig et al. 2012).

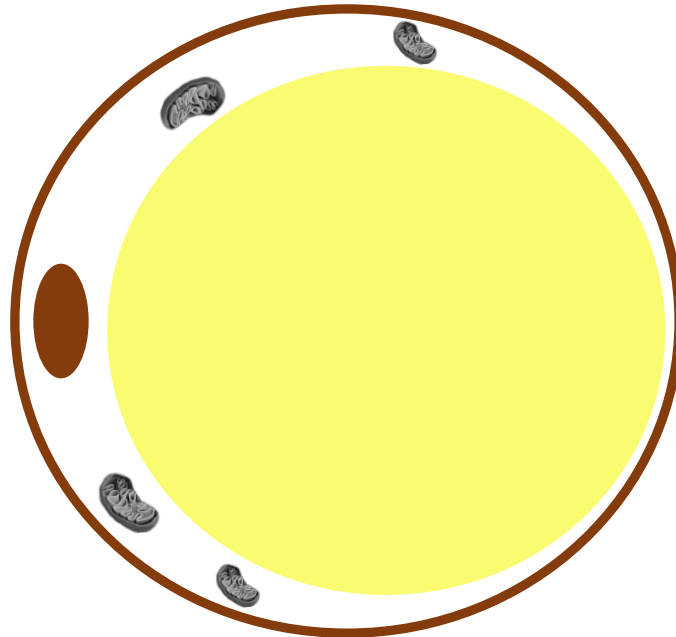
Atualmente um novo tipo de adipócito vem sendo descrito, o adipócito bege, que possui características fenotípicas e padrão de expressão gênica termogênica semelhante ao TAM, porém essas células encontram-se em sítios originalmente de TABs e surgem a partir de diferentes estímulos, como tratamentos com PPAR.(Shabalina, Petrovic et al. 2013).

1.4.1 Tecido Adiposo Branco

O TAB, inicialmente caracterizado apenas como um órgão armazenador de energia, é atualmente conceituado como um órgão metabolicamente ativo de natureza endócrina e secretora, desde a descoberta da leptina (Zhang, Proenca et al. 1994).

As principais características dos adipócitos do TAB são: gotícula única de gordura, distribuída de forma central (gotícula unilocular), cercada por pouco citoplasma pois a gotícula ocupa a maior parte do volume celular, provocando um deslocamento do citosol e de suas organelas e lateralizando o núcleo para a periferia celular, além de possuir poucas mitocôndrias (Brito 2012), conforme demonstrado na figura 3. O TAB é composto principalmente por: adipócitos e a fração vascular estromal (constituente principal dos pré-adipócitos, células imunes e fibroblastos); juntos, adipócitos e fração vascular estromal produzem a matriz extracelular para manter a integridade estrutural e funcional do tecido (Divoux and Clement 2011; Wronska and Kmiec 2012).

Figura 3 - Representação esquemática do adipócito do tecido adiposo branco



Legenda: Adipócito branco com gotícula lipídica unilocular, reduzido volume mitocondrial e com uma pequena área citoplasmática especializado no armazenamento de energia e secreção de adipocinas pró-inflamatórias.

Fonte: A autora, 2019.

O TAB está distribuído por todo o corpo em diversos compartimentos, sendo localizado principalmente na região subcutânea (gordura subcutânea, que forma uma camada sob a pele) e na cavidade toracoabdominal (gordura visceral, circundando os órgãos internos). Sua principal função é o armazenamento de energia, proteção mecânica (contra choque e traumas), isolante térmico, manutenção da temperatura corporal, auxílio no deslizamento entre vísceras e feixes musculares (Masoodi, Kuda et al. 2015). O TABs armazena o excesso de lipídios através da expansão dos adipócitos – hipertrofia e/ou recrutamento de novas células adiposas - hiperplasia. No entanto, o TABs tem capacidade limitada de expansão e, quando sua capacidade de armazenamento se excede, a gordura se deposita na região visceral e em órgãos como o fígado, o coração e músculo esquelético, no epi/pericárdicos, e em regiões perivasculares (Gustafson, Hedjazifar et al. 2015).

A hipertrofia dos adipócitos em humanos é uma característica da predisposição genética para diabetes, está associada à obesidade abdominal, acúmulo de gordura ectópica e SM, enquanto que a capacidade de recrutar novos adipócitos impede esses desfechos (Gustafson, Hedjazifar et al. 2015).

Estudos demonstraram que a expansão do tamanho das células adiposas no TABs ocorre de forma limitada a um tamanho máximo e que a hiperplasia está associada à resistência à insulina e dislipidemia (Krotkiewski, Bjorntorp et al. 1983; Arner, Westermark et al. 2010). O TABs também se apresenta como secretor de adiponectina, o que está associado a característica anti-inflamatória, em detrimento do tecido adiposo visceral (Kim, van de Wall et al. 2007).

A secreção de adipocinas e seu papel na regulação da homeostase energética e vascular, na resposta inflamatória e na tolerância à glicose estão alterados em indivíduos obesos (Tilg and Moschen 2006; Wintour and Henry 2006).

Citocinas e adipocinas pró-inflamatórias são altamente expressas na vigência da obesidade e incluem dentre outros: TNF-alfa, IL-6 e resistina (Lafontan and Girard 2008). Dentre as adipocinas de caráter anti-inflamatório está a FND5/Irisina que foi descrita recentemente como uma adipocina, secretada principalmente pelo TABs (Roca-Rivada, Castelao et al. 2013). Esta proteína apresenta interesse, pois seria um marcador para a plasticidade por estimular consideravelmente a via termogênica do TAM (Bostrom, Wu et al. 2012).

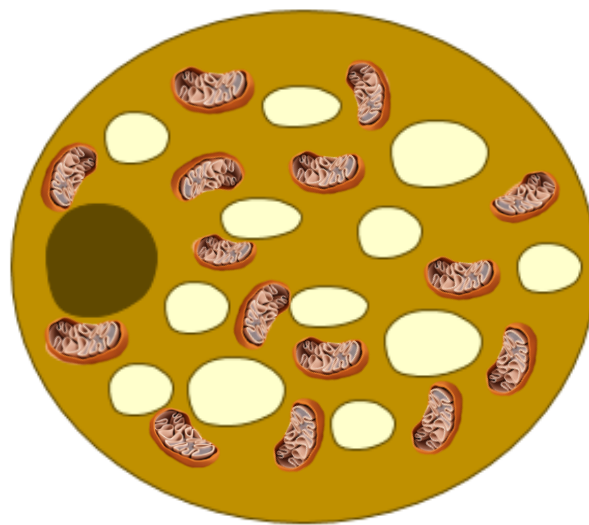
1.4.2 Tecido Adiposo Marrom

O TAM foi descrito no século XVI como “nem gordura nem carne”, tornou-se interesse de intenso estudo após a identificação da UCP1 nas últimas décadas (Cannon and Nedergaard 2004; Richard, Carpentier et al. 2010). 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+) (Richard, Carpentier et al. 2010). O TAM, que possui a produção de calor – mecanismo conhecido como termogênese adaptativa– como sua principal função, está praticamente ausente em humanos adultos, mas pode ser encontrado em fetos e recém-nascidos. O TAM é encontrado em regiões específicas como as regiões cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal e perirrenal em humanos e nas regiões interescapular, subescapular, regiões axilar, perirrenal e periaórtica em roedores (Park, Kim et al. 2014). O adipócito do TAM é menor que o adipócito do TAB e possui diversas gotículas lipídicas distribuídas no citoplasma com diferentes tamanhos, conferindo característica multilocular, citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que

produzem energia a partir da oxidação de ácidos (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007).

A coloração amarronzada do TAM é conferida por uma elevada presença de mitocôndrias. Além disso, tem sido demonstrado que a UCP-1 ou termogenina é um dos principais marcadores para a identificação do TAM (Langin 2010). A figura 4 ilustra o adipócito marrom.

Figura 4 - Representação esquemática do adipócito do tecido marrom



Legenda: Adipócito marrom com gotículas lipídicas multiloculares, intenso volume mitocondrial e com uma grande área citoplasmática especializada na realização da termogênese.
Fonte: A autora, 2019.

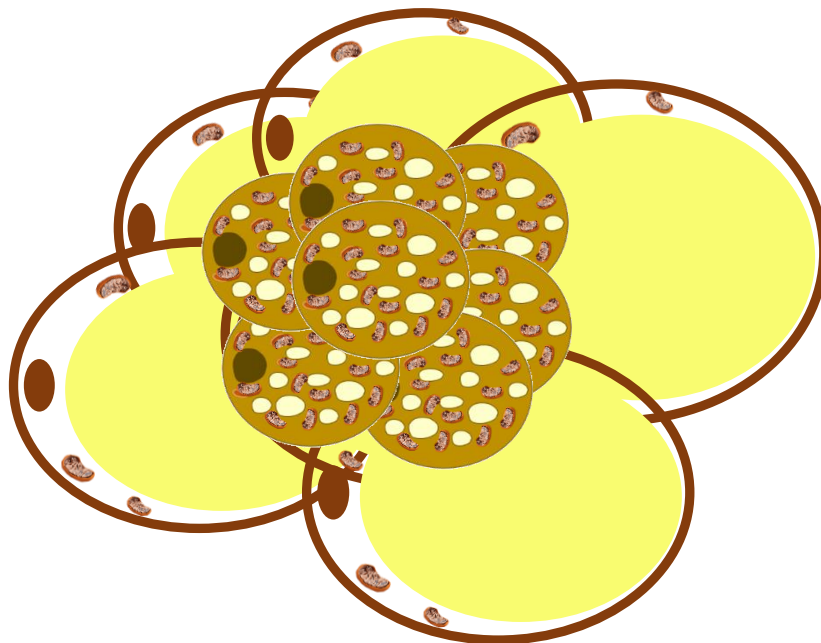
A termogênese é garantida pela UCP-1 que se encontra na membrana mitocondrial interna, atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de ATP e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007). Dessa forma, a termogênese consome a energia química e libera calor, causando um desacoplamento de energia e aumentando o GE (Crowley and Vidal-Puig 2001). A descoberta de que há TAM em uma parte da população adulta motivou a realização de estudos experimentais que busquem revelar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa no controle da obesidade (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007; Virtanen, Lidell et al. 2009). Além disso, a observação de que o tecido adiposo com capacidade termogênica presente em humanos adultos é

similar ao tecido adiposo bege encontrado em roedores fizeram com que estratégias que promovam o *browning* ganhassem o interesse da comunidade acadêmica.

1.4.3 Tecido Adiposo Bege

A partir de diferenciados estímulos (farmacêuticos ou nutracêuticos) ocorre a caracterização de um novo tipo de tecido adiposo, o tecido adiposo bege, que ocorre a partir do processo de “*browning*” no TABs (Spiegelman 2013). Experimentos da década de 80 e 90 descreveram que o TABs de roedores apresentou alta expressão de UCP-1 e outros marcadores gênicos característicos do TAM quando comparado ao TAB visceral (Loncar, Afzelius et al. 1988; Cousin, Cinti et al. 1992). Este tecido apresenta localização anatômica nos sítios do TABs, contudo sua característica metabólica é semelhante ao TAM incluindo o potencial termogênico, o padrão de expressão gênica, reserva lipídica multilocular e elevado número de mitocôndrias (Wu, Bostrom et al. 2012; Lo and Sun 2013; Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015), caracterizando a termogênese adaptativa no TABs, como observado na figura 5 abaixo.

Figura 5 - Representação esquemática dos adipócitos beges no TABs



Legenda: Foco de tecido adiposo bege termogenicamente ativo no TABs com característica de reserva lipídica e secreção pró-inflamatória.

Fonte: A autora, 2019.

Os adipócitos do TAB e células beges diferenciadas a partir de adipócitos do TAB não são derivadas do Myf-5+ (Seale, Bjork et al. 2008; Ishibashi and Seale 2010; Petrovic, Walden et al. 2010). Os adipócitos do tipo bege oriundos de transdiferenciação do TABs não expressam CD137 a qual é comumente encontrada em células bege oriundas de pré-adipócitos beges (Seale, Bjork et al. 2008). Independente das diferentes origens observadas, os adipócitos beges apresentam a mesma função e morfologia do TAM clássico, agindo assim na termogênese adaptativa após estímulo para seu surgimento (Giralt and Villarroya 2013).

Esse adipócito parece gerar benefícios sobre o metabolismo e reduzir o risco de patologias, tais como obesidade e o DM2 (Ishibashi and Seale 2010; Bartelt and Heeren 2014). Um recente estudo sugere que o fenômeno *browning* (o processo de escurecimento do TAB em tecido adiposo bege) pode ser um novo alvo terapêutico para a redução de patologias como obesidade, porém as investigações translacionais ainda são iniciais (Keipert and Jastroch 2014).

A identificação da célula bege no TAB pode ser comprovada pela marcação de genes típicos do TAM no TABs, tais como genes envolvidos na termogênese (UCP1), biogênese mitocondrial (PGC1-alfa), entre outros (Bostrom, Wu et al. 2012; Wu, Cohen et al. 2013). O PGC1-alfa, co-ativador transcricional envolvido na biogênese mitocondrial e na expressão de genes termogênicos, é primordialmente expresso no TAM e encontra-se aumentado na vigência de atividade termogênica (Kleiner, Mepani et al. 2012). Outro gene relacionado a caracterização do *browning* é o domínio PR contendo proteína 16 (PRDM16), co-ativador transcricional que caracteriza a linhagem marrom do tecido adiposo (Hondares, Rosell et al. 2011).

Recentemente foi estimado que a presença de 63g de tecido adiposo bege ativo em um adulto evitaria o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano, sendo essa observação atribuída ao gasto desse excesso de energia na via termogênica (Virtanen, Lidell et al. 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ativação do PPAR- α ou PPAR- β/δ sobre a indução de células beges no tecido adiposo branco subcutâneo e na via termogênica do tecido adiposo marrom em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos do tratamento com agonistas do PPAR- α ou PPAR- β/δ sobre a massa corporal, sensibilidade à insulina, morfologia do TABs e TAMi e níveis plasmáticos das adipocinas;
- b) Avaliar o efeito dos agonistas do PPAR- α e PPAR- β/δ sobre a taxa metabólica basal e gasto energético em animais com sobrepeso induzido por dieta;
- c) Determinar a expressão gênica de adipocinas produzidas pelo tecido adiposo branco e proteínas desacopladoras do tecido adiposo marrom após o tratamento com agonistas do PPAR- α ou PPAR- β/δ ;
- d) Determinar a expressão gênica de proteínas específicas do tecido adiposo marrom no tecido adiposo branco subcutâneo a fim de avaliar a capacidade termogênica das células adiposas bege.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Dieta

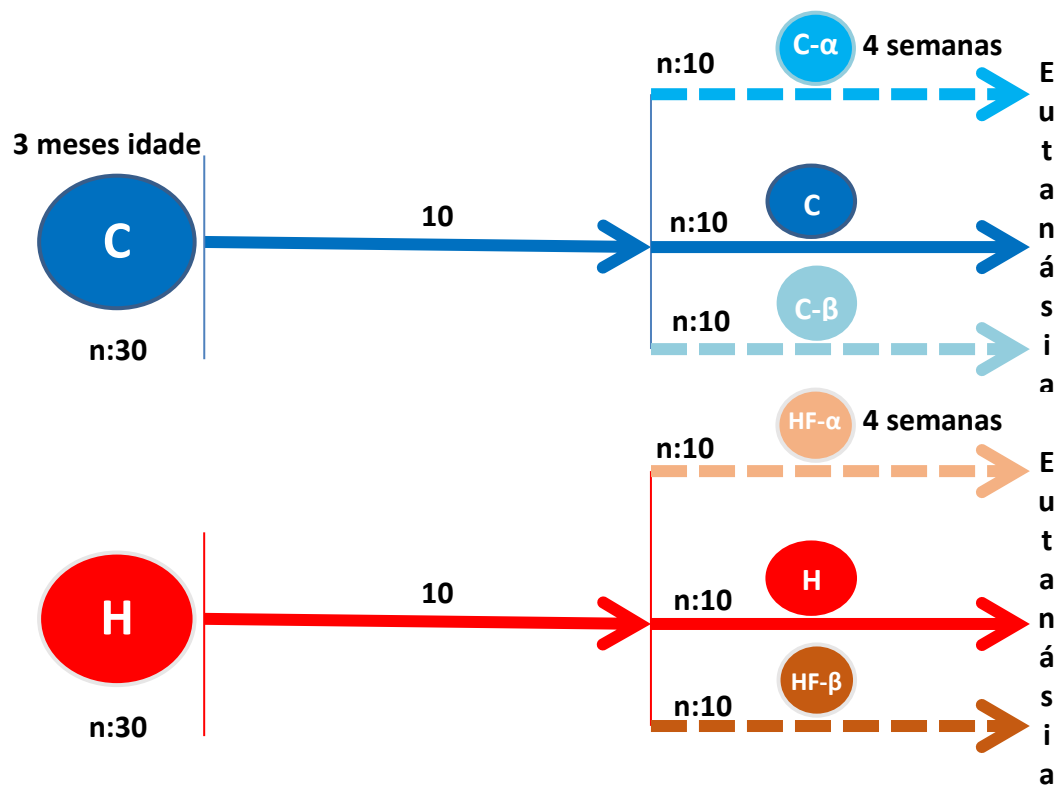
Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996), além de estarem baseados nas normas mundiais e brasileiras e serem aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/034/2016.

Camundongos C57BL/6 machos foram obtidos do biotério central da Universidade Federal Fluminense (UFF) e mantidos 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. Os camundongos machos, com três meses de idade, foram aleatoriamente divididos em dois grupos inicialmente com $n=30/\text{grupo}$: um grupo controle com dieta padrão para roedores durante a fase de manutenção (dieta C - 14% da energia proveniente de proteínas, 10% energia advinda de lipídeos, e 76% de carboidratos, total energético de 15 KJ/g) e um grupo hiperlipídico com dieta de alta densidade energética rica em ácidos graxos saturados (dieta HF -14% da energia proveniente de proteínas, 50% da energia advinda de lipídeos e 36% de carboidratos, total energético de 21 KJ/g), tais dietas foram administradas durante dez semanas. Os camundongos foram acondicionados em caixas “patogen-free”. Após as dez semanas, os grupos foram redivididos e os tratamentos com PPAR- α (WY-14643, 2,5mg/kg) e PPAR- β/δ (GW0742, 1mg/Kg) iniciados, criando novos grupos, sendo os grupos tratados denominados C- α (grupo controle com tratamento de PPAR- α), C- β (grupo controle com tratamento de PPAR- β), HF- α (grupo hiperlipídico com tratamento de PPAR- α) e HF- β (grupo hiperlipídico com tratamento de PPAR- β , conforme a figura 6. Os agonistas PPARs (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA) foram adicionados às respectivas dietas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil) na dose de 2,5 mg/kg de massa corporal (PPAR- α) e 1 mg/kg de massa corporal (PPAR- β). Os grupos experimentais ($n=10/\text{grupo}$) formados foram os seguintes:

- a) C: dieta padrão ao longo de todo o experimento;

- b) C- α : dieta C + tratamento com PPAR- α na dose de 2,5 mg/kg massa corporal a partir dos cinco meses de idade;
- c) C- β : dieta C + tratamento com PPAR- β na dose de 1 mg/kg massa corporal a partir dos cinco meses de idade;
- d) HF: dieta HF durante todo o experimento;
- e) HF- α : dieta HF + tratamento com PPAR- α na dose de 2,5 mg/kg massa corporal a partir dos cinco meses de idade;
- f) HF- β : dieta HF + tratamento com PPAR- β na dose de 1 mg/kg massa corporal a partir dos cinco meses de idade.

Figura 6 - Esquema do desenho experimental



Legenda: Aos três meses de idade os camundongos machos foram divididos em dois grandes grupos, um grupo que recebeu dieta padrão (C) e outro que recebeu dieta hiperlipídica (HF). Após dez semanas de administração da dieta, esses grupos foram redivididos compondo seis grupos: grupo C, grupo C- α (dieta C associada ao tratamento com agonista PPAR- α), grupo C- β (dieta C associada ao tratamento com agonista PPAR- β), grupo HF, grupo HF- α (dieta HF associada ao tratamento com agonista PPAR- α), grupo HF- β (dieta HF associada ao tratamento com agonista PPAR- β). O tratamento com agonistas PPARs durou quatro semanas, totalizando 14 semanas de experimento.

Fonte: A autora, 2019.

Considerando as diferenças na massa corporal entre os animais C- α e HF- α , diferentes quantidades de WY14643 foram adicionadas às respectivas dietas (2,2mg% na dieta C- α e 3,6mg% na dieta HF- α) a fim de garantir que ambos os grupos tratados, com sobrepeso ou não, mantivessem doses diárias comparadas do agonista, validando, assim, nosso tratamento. O mesmo foi feito com relação aos grupos tratados com o GW0742, agonista do PPAR- β , onde a dieta C- β teve um acréscimo de 1,12mg% do agonista GW0742, enquanto a dieta HF- β teve um acréscimo de 1,4mg%.

Vale destacar que o conteúdo de micronutrientes (vitaminas e minerais) de ambas as dietas eram idênticos e em conformidade as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (Reeves, Nielsen et al. 1993) para o período de manutenção dos animais a partir dos três meses de idade. Os tratamentos duraram 4 semanas e após esse período os animais sofreram eutanásia. A confecção das dietas foi realizada pela empresa PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil), o detalhamento da composição nutricional das dietas experimentais encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais

Ingredientes	DIETA (g/kg)	
	AIN-93M	HF
Caseína ($\geq 85\%$ de proteína)	140,00	175,00
Amido de milho	620,70	347,69
Sacarose	100,00	100,00
Óleo de soja	40,00	40,00
Banha de porco	-	238,00
Fibra	50,00	50,00
Mistura de vitaminas	10,00	10,00
Mistura de minerais	35	35,00
Cistina	1,80	1,80
Colina	2,50	2,50
Antioxidante	0,008	0,100
Total em gramas	1.000	1.000

Energia (kcal)	3800	5000
Hidratos de carbono (%)	76	36
Proteínas (%)	14	14
Lipídeos (%)	10	50

3.2 Massa Corporal e Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar em gramatura dos camundongos foi aferida diariamente através do resto ingestão e a ingestão energética foi obtida através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em kilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em kilocalorias foi convertido para kJoules, medida universal de energia. A massa corporal dos animais foi aferida semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) (terça-feira, 9 horas).

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 1g/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 6.05 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 Calorimetria Indireta

Na semana anterior ao sacrifício, com 5 meses de idade, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de

calorimetria (Panlab Havard Apparatus) durante três dias com acesso à dieta e água. Este sistema monitorou o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2) e a taxa de troca respiratória. Os dados foram coletados a cada 3 minutos durante 72 horas, com as primeiras 24 horas consideradas um período de climatização. O consumo de oxigênio é calculado por grama de massa corporal metabólico (MC)^{0,75}. O GE diário e o quociente respiratório foram calculados a partir dos dados coletados, a fim de verificar alterações na taxa metabólica basal dos animais.

3.5 Termografia

A temperatura corporal foi mensurada por análise termográfica com os animais conscientes (sem utilização de sedativo), em temperatura ambiente utilizando câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA).

3.6 Sacrifício e Extração de Tecidos

Após 14 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos a jejum de 6 horas e em seguida profundamente anestesiados em câmara de gás de CO_2 . Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do átrio direito para posterior análise bioquímica. Os tecidos adiposos genital, retroperitoneal, inguinal e marrom foram cuidadosamente dissecados e tiveram sua massa aferida em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) e seguiram o protocolo para posterior processamento para microscopia de luz ou armazenados em freezer com temperatura -80°C visando conservação para realização da técnica RT-qPCR. A gordura inguinal, localizada entre a parte inferior da caixa torácica e o meio do membro inferior, foi considerada gordura subcutânea. A gordura retroperitoneal (conectada à parede abdominal posterior perto dos rins e a porção abdominal dos ureteres) e a gordura epididimária (localizada na parte inferior do abdômen e ligado ao epidídimo) foram consideradas

gordura intra-abdominal. A porção subcutânea do tecido adiposo é o local onde ocorreu o primeiro foco de browning com capacidade termogênica potencialmente descrito. (Young, Arch et al. 1984; Wu, Bikopoulos et al. 2014). O TAM foi dissecado da região interescapular. O índice de adiposidade (IA) foi determinado como a razão entre a soma das gorduras intra-abdominal e subcutânea, dividido pelo total da massa corporal e apresentado como porcentagem.

3.7 Análise Plasmática

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120g por 15 minutos) e armazenado em freezer -80°C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de insulina e FNDC5/Irisina foram mensuradas através dos painéis de imunoensaio específico para camundongos (Kit de ELISA para FNDC5/Irisina em camundongos # SEN576Mu, Uscn Life Science Inc., Houston, Texas, USA; Kit de Elisa para insulina #EZRMI-13K e para leptina #EZML-82K, Millipore, Missouri, USA). O cálculo do HOMA-IR (*“homeostasis model assessment-insulin resistance”*) foi realizado com a glicemia de jejum (mmol/L) multiplicado pelo nível de insulina em jejum (mIU/mL), dividido por 22,5 (Matthews, Hosker et al. 1985).

3.8 Histologia do tecido adiposo branco e marrom

Após dissecação e pesagem, fragmentos do TABs e o TAMi dos animais foram fixados durante 48 horas em formalina de Millonig, processados e emblocadas em Paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), seccionadas em cortes com 5µm de espessura e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). Imagens do TABs e do TAMi foram obtidas em campos microscópicos aleatórios (formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) com auxílio de câmera (Infinity 1-5, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá e microscópio de luz DMRBE, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As imagens do TABs foram analisadas

por estereologia (descrito no próximo subitem) e as imagens do TAMi foram obtidas a fim de caracterizar a modificação da distribuição de gotículas lipídicas no tecido.

3.9 Estereologia

A densidade de volume (V_v) de adipócitos foi estimada pela técnica de contagem de pontos, utilizando um sistema teste de dezesseis pontos produzido pelo STEPanizer (www.stepanizer.com). Foram contados os pontos que tocavam adipócitos, excluindo da contagem os adipócitos que tocavam a linha proibida. O V_v foi obtido pela divisão dos pontos parciais (que tocavam a estrutura de interesse) pelos número de pontos totais. O número de perfis de adipócitos por área (Q_A) foi estimado pela contagem dos adipócitos encontrados dentro de uma área conhecida, gerada também pelo STEPanizer. Mais uma vez, foram excluídos os adipócitos que tangenciavam a linha proibida e o Q_A foi obtido pela divisão do número de perfis de adipócitos contados pela área conhecida em μm^2 .

A área seccional média (ASM) dos adipócitos foi estimada pela fórmula: $ASM = V_v / 2 \times Q_A$.

3.10 Imunofluorescência

Para realização de 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 tampão de bloqueio (PBS/5%BSA). Os cortes foram incubados “*overnight*” à 4°C com o anticorpo UCP-1 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 as lâminas 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).

3.11 PCR quantitativo em tempo real

Os TABs e TAMi extraídos (alíquotas de 30 mg) sofreram extração de seu RNA total utilizando 700µl de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Posteriormente, adicionaram-se 100µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, por dez minutos a 4°C), retirou-se o sobrenadante da fase aquosa, o qual corresponde ao RNA. A esse, adicionaram-se 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (11.200 rpm, por 10 minutos a 4 °C) e formação de um pellet de RNA. Em seguida, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspensando com 500 µL de etanol 70% e seguido de centrifugação (11.200 rpm, por 5 minutos a 4°C). O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspensado em 40 µL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, USA). Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3, e estão descritos na tabela 2. O controle endógeno beta-actina, foi utilizado para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95°C), foram realizados 44 ciclos, cada ciclo consistindo em 95°C durante 10 segundos e 60°C durante 15 segundos, seguidos por uma curva de melting (60°C a 95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o ΔCt expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos (Bustin, Benes et al. 2009).

Tabela 2 - Detalhamento dos primers utilizados

Nome	Primers	
	Forward	Reverse
<i>PPAR-α</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
<i>PPAR-β/δ</i>	TGGAGCTCGATGACAGTGAC	GGTTGACCTGCAGATGGAAT
<i>PGC1- α</i>	GTCAACAGCAAAAGCCACAA	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT
<i>NFR1</i>	GTTGGTACAGGGGCAACAGT	GTAACGTGGCCCAGTTTTGT
<i>TFAM</i>	GAAGAACGCATGGAGGAGAG	TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT
<i>BMP-8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>PRDM16</i>	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA
<i>FNDC5/Irisin</i>	GGTGCTGATCATTGTTGTGG	CGCTCTTGGTTTTCTCCTTG
<i>UCP1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>β3-AR</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	TTAGCCACAACGAACACTCG
<i>PPAR-γ</i>	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
<i>TMEM-26</i>	GCTCACCTCAAGTTCAAGC	TGCATTTCAAGAAGCCACAG
<i>CIDEA</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAAGTGTCCCGTCATCTGT
<i>CPT-1a</i>	GCAGAGCACGGCAAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
<i>PKD4</i>	CACCACATGCTCTTCGAACCTCT	AAGGAAGGACGGTTTTCTTGATG
<i>Beta-actin</i>	CTCCGGCATGTGCAA	CCCACCATCACACCCT

3.12 Análise Estatística

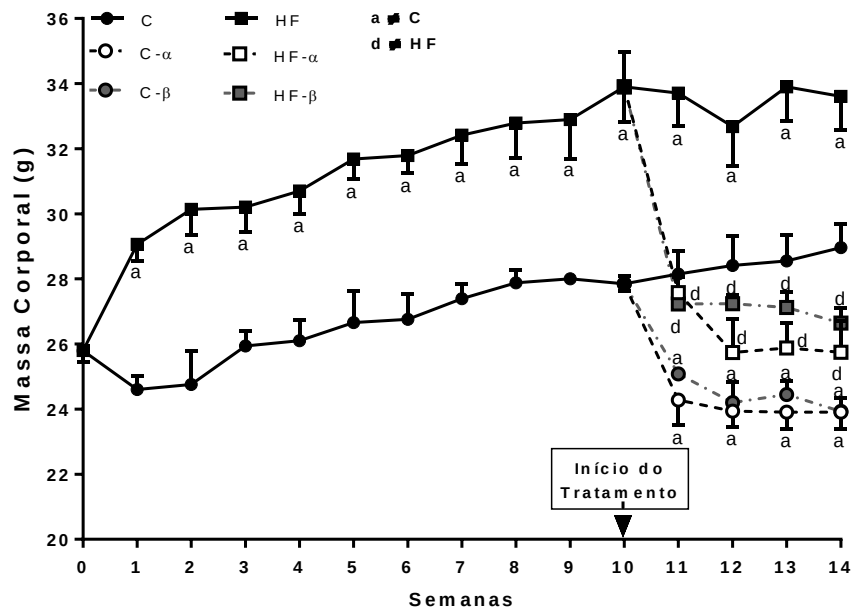
Os dados obtidos foram testados para a distribuição normal. A análise estatística foi realizada usando o teste t de student no período pré-tratamento e o *one way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak no período do tratamento. Interações entre as variáveis dieta e tratamento foram testados com *two way* ANOVA. Em todos os casos o índice de significância menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$) foi considerado estatisticamente diferente (GraphPadPrism 6,01 CA, EUA), sendo os resultados expressos com média e desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1 Massa Corporal, Ingestão Alimentar e Ingestão Energética

Os grupos C e HF iniciaram o experimento (semana 0) sem diferença estatística na MC. Após uma semana de ingestão da dieta HF, o grupo HF apresentou sobrepeso quando comparado ao grupo C (+18,13%, $P=0,0084$), tal diferença foi mantida até a décima semana de dieta (+21,72%, $P=0,0124$). Ao final do experimento (após quatro semanas de tratamento), o grupo HF- α e HF- β apresentaram diminuição significativa da MC (-24,28% e -20,74%, $P<0,0001$ respectivamente) quando comparados ao grupo HF. Esta diferença ocorreu desde a primeira semana de tratamento (-18,19% e -11,22%, $P<0,0001$ respectivamente) quando comparado ao grupo HF. Os grupos C- α e C- β também apresentaram redução significativa da MC com relação ao grupo C desde a primeira semana de tratamento (-13,75% e -10,91%, $P<0,05$ respectivamente), a qual foi mantida ao final do experimento (-17,44% e 17,37%, $P<0,001$ respectivamente, figura 7). O two-way ANOVA revelou que o tratamento com agonistas PPAR- α e PPAR- β influenciou fortemente a MC final, representando 65% e 62% da sua variância total ($P < 0,0001$). A dieta também influenciou esse parâmetro, embora com menor intensidade ($P = 0,002$).

Figura 7– Evolução da Massa Corporal



Legenda: Primeiras semanas (zero a dez) referem-se ao período de indução da obesidade, e as semanas seguintes (dez a quatorze) correspondem à fase de tratamento com PPAR-α e PPAR-β. 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; d $\neq$ HF conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2019.

A ingestão alimentar em gramatura não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos, conforme apresentado na tabela 3, abaixo. Convertendo a gramatura ingerida para a energia que as dietas fornecem, com base em sua densidade energética (dieta padrão, 15,88 KJ/g e dieta hiperlipídica, 20,90 KJ/g), obteve-se que os grupos HF, HF-α e HF-β apresentaram diferença na ingestão energética quando comparados ao grupo C (+36,22%, +27,93%, +49,81% e $P < 0,05$, respectivamente). Essas observações excluem a necessidade de grupos de alimentação pair-feeding para isolar os efeitos da redução do consumo de energia, o qual não foi observado, sobre os resultados analisados. Apenas a dieta influenciou significativamente a ingestão energética (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$).

Tabela 3 - Comportamento alimentar

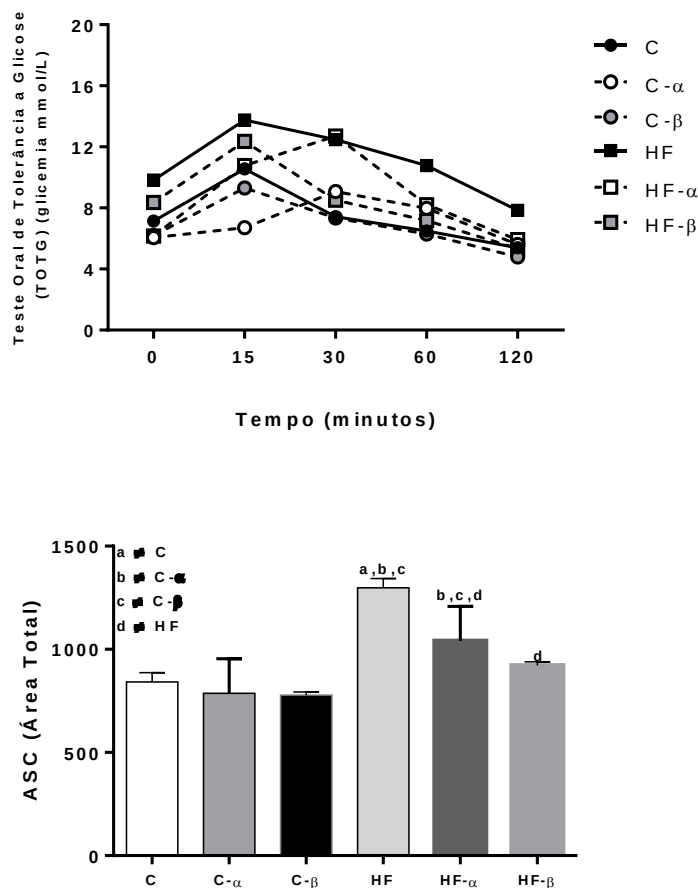
Dados	C	C- α	C- β	HF	HF- α	HF- β
Ingestão alimentar (g/dia)	2,37 $\pm$ 0,04	2,32 $\pm$ 0,02	2,72 $\pm$ 0,19	2,46 $\pm$ 0,03	2,31 $\pm$ 0,05	2,71 $\pm$ 0,16
Ingestão energética (kJ/dia)	37,74 $\pm$ 0,65	36,95 $\pm$ 0,37	43,35 $\pm$ 3,01	51,41 $\pm$ 0,55 ^{a,b}	48,28 $\pm$ 1,26 ^{a,b}	56,54 $\pm$ 4,13 ^{a,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 $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

4.2 Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)

A avaliação do metabolismo de carboidratos através do TOTG demonstrou que o grupo HF apresentou aumento na glicemia de jejum (glicemia de jejum: 9,82 mmol/L) quando comparado ao grupo C (glicemia de jejum: 7,14 mmol/L+37,64%, $P=0,0007$), quando comparado ao grupo C- α (glicemia de jejum: 6,05 mmol/L, +62,39%, $P < 0,0001$) e quando comparado ao grupo C- β (glicemia de jejum: 6,19 mmol/L, +58,60%, $P < 0,0001$), o two-way ANOVA confirmou estas observações, onde o agonista do PPAR- α foi responsável por 49% da variância total da glicose em jejum ($P < 0,0001$), além de interagir significativamente com a dieta para determinar este parâmetro ($P = 0,0036$). É importante ressaltar que o grupo HF apresentou um longo pico de glicose, sem diferenças entre o tempo de 15 e de 30, configurando quadro de intolerância à glicose. Os tratamentos com agonistas PPAR- α e PPAR- β provocaram normalização da glicemia nos grupos HF- α e HF- β , sem diferença estatística comparada ao grupo controle. O tratamento com PPAR- α demonstrou-se significativamente eficaz na redução da hiperglicemia provocada pela dieta HF (-37,27%, $P < 0,0001$). O Two-way ANOVA exibiu resultados diferentes para os grupos HF- α e HF- β . No primeiro, apenas a dieta ($P < 0,0001$) e o tratamento ($P = 0,0114$) como um único estímulo influenciaram significativamente os valores da ASC. Por outro lado, neste último, além de uma influência significativa da dieta ($P < 0,0001$) e tratamento ($P < 0,0001$), independentemente, também houve uma interação significativa entre esses fatores para determinar os resultados da ASC ($P < 0,0001$).

Figura 8 – Curva e Área sob a curva (ASG) do TOTG



Legenda: Curva do TOTG na 13ª semana de protocolo experimental e área sob a curva correspondente (média $\pm$ DP), onde $p < 0,05$ quando comparado a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF, n=5.

Fonte: A autora, 2019.

4.3 Parâmetros metabólicos

No que se refere à dosagem de insulina plasmática, o grupo HF (1326 ng/ml) apresentou níveis elevados em relação ao grupo C (756,5 ng/ml +75,28%, $P=0,002$). O tratamento com PPAR- α (874,5 pg/ml) e PPAR- β (471 pg/ml) reduziu a hiperinsulinemia provocada pela dieta HF (-34,05%, -64,44% $P=0,0116$ e $P<0,0001$ respectivamente). O two-way ANOVA revelou que a dieta e o tratamento com PPAR- α , como fator isolado, influenciaram significativamente a insulinemia ($P = 0,0007$ e $P = 0,0099$, respectivamente). Por outro lado, o PPAR- β exerceu influência nos níveis plasmáticos de insulina ($P < 0,0001$), além de interagir significativamente com a dieta para afetar esse parâmetro ($P = 0,0036$).

A dosagem plasmática de FNDC5/Irisina, um marcador do mecanismo de browning, apresentou-se aumentada no grupo C- α (84,69 ng/ml) quando comparado ao grupo C (43,56 ng/ml +94,42%, $P=0,0002$) e no grupo HF- α (100,4 ng/ml) quando comparado ao grupo HF (28,27 ng/ml +255,15%, $P<0,0001$). O tratamento com PPAR- β não apresentou efeitos positivos na dosagem dessa adipocina. É importante ressaltar que apenas o tratamento com PPAR- α influenciou os níveis de FNDC5/Irisina, representando 84% de sua variância total (Two-way ANOVA, $P<0,0001$). Além disso, dieta e tratamento com agonista PPAR- α interagiram afetando os resultados (Two-way ANOVA, $P=0,0047$).

O IA, que representa a distribuição em percentual do somatório dos depósitos de gordura corporal em relação à massa corporal total, apresentou redução após o tratamento com PPAR- α e PPAR- β nos grupos controles comparado a sua contraparte sem tratamento (-28,94% e -30,66%, $P<0,05$ respectivamente). Conforme já apresentado na literatura, o IA apresentou aumento no grupo HF quando comparado ao C (+28,37%, $P<0,05$) e os tratamentos propostos reduziram significativamente esse parâmetro (-29,46% no HF- α e -23,44% no HF- β , $P<0,05$ respectivamente), conforme apresentado na tabela 4 abaixo. O two-way ANOVA mostrou que a dieta e ambos os tratamentos influenciaram o IA de forma independente ($P<0,0001$) e o tratamento com PPAR- α foi responsável por 53%, enquanto o tratamento com PPAR- β representou 42% de sua variância total.

Tabela 4 - Parâmetros Metabólicos

Dados	C	C- α	C- β	HF	HF- α	HF- β
Insulina (pg/ml)	756,50 $\pm$ 199,3	658 $\pm$ 171,00	481,10 $\pm$ 194,00	1326 $\pm$ 253,40 ^{a,b,c}	874,50 $\pm$ 209,10 ^{c,d}	471,60 $\pm$ 151,6 ^{d,e}
FNDC5/Irisina (ng/ml)	43,56 $\pm$ 1,36	84,69 $\pm$ 18,35 ^a	37,01 $\pm$ 15,19 ^b	28,27 $\pm$ 5,12 ^b	100,40 $\pm$ 8,90 ^{c,d}	34,99 $\pm$ 12,43 ^{b,e}
Índice de Adiposidade (%)	3,49 $\pm$ 0,15	2,48 $\pm$ 0,63 ^a	2,42 $\pm$ 0,52 ^a	4,48 $\pm$ 0,23 ^{a,b,c}	3,16 $\pm$ 0,39 ^d	3,43 $\pm$ 0,56 ^{b,c,d}

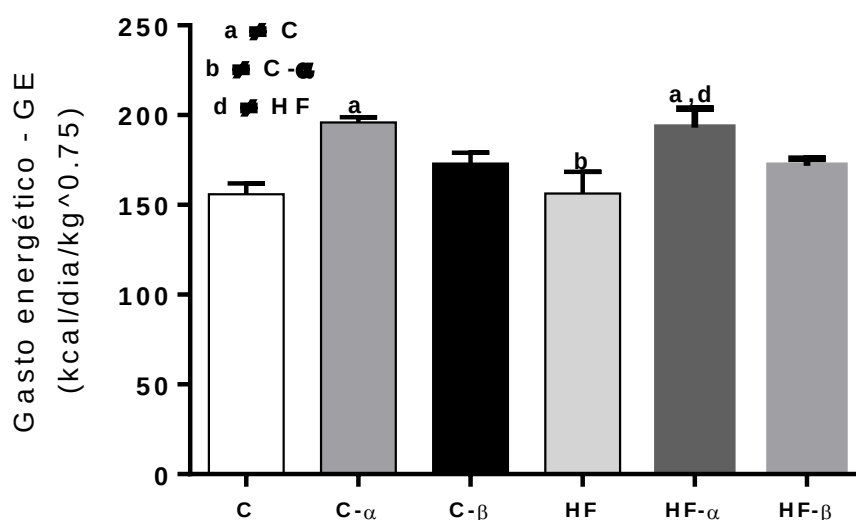
Legenda: Valores representados como média $\pm$ EPM, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF; e $\neq$ HF- α conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2019.

4.4 Calorimetria indireta

A redução da MC está fortemente associada ao aumento do GE. Foi possível observar que, o grupo C- α apresentou um aumento no GE quando comparado ao grupo C (+25,72%, $P < 0,05$). Da mesma forma, o grupo HF- α apresentou elevação no GE quando comparado ao grupo HF (+23,42%, $P < 0,05$). O gráfico de GE está ilustrado na figura 9. O tratamento com PPAR- α foi responsável por 62,39% da variância total da temperatura corporal, exercendo uma influência significativa sobre este parâmetro (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$), o tratamento com PPAR- β não apresentou influência nesse parâmetro.

Figura 9 – Gasto Energético



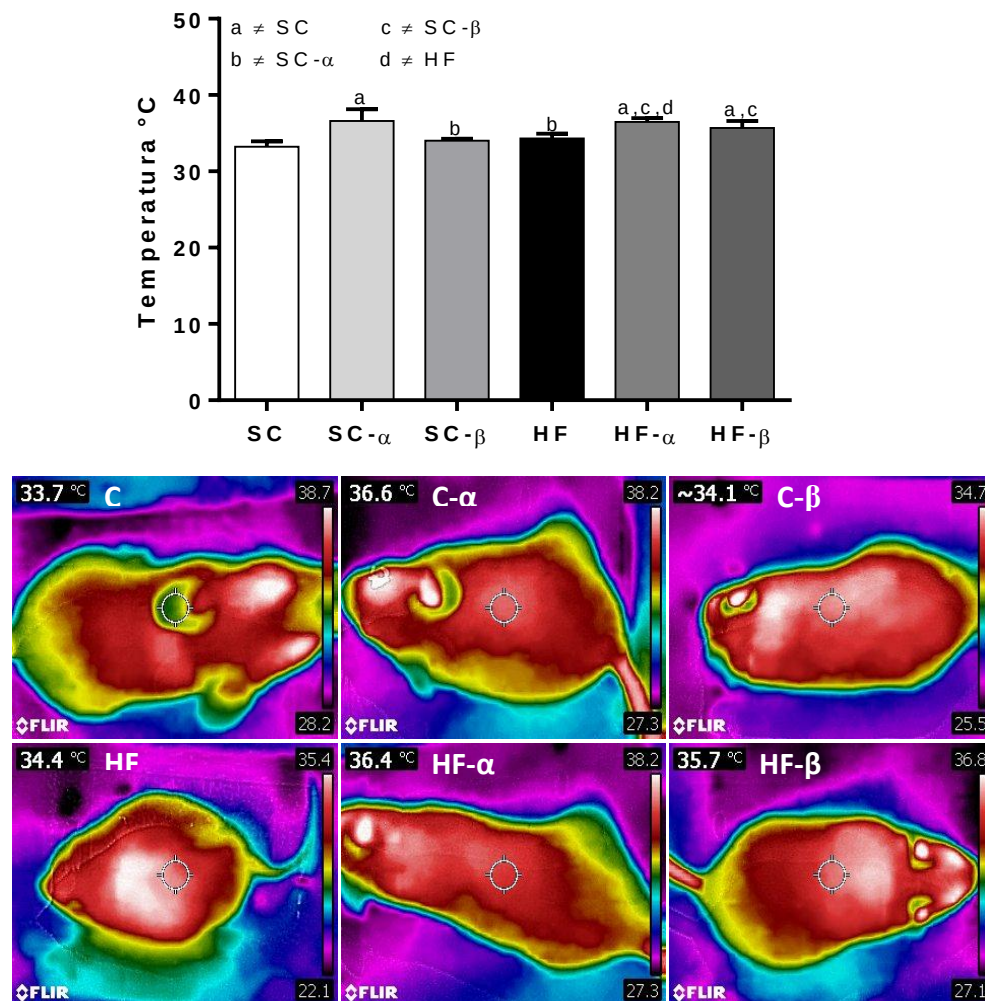
Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; d $\neq$ HF; conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

4.5 Termografia

A temperatura dos animais apresentou significativo aumento após o tratamento com PPAR- α em ambos os grupos tratados: no grupo C- α e no grupo HF- α quando comparado as suas contrapartes C e HF (+10,17%, + 6,24% $P < 0,01$ respectivamente), conforme observado na figura 10 abaixo. O tratamento

com PPAR- α foi responsável por 70% da variância total da temperatura corporal, exercendo uma influência significativa sobre este parâmetro (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$). Em contraste, o agonista PPAR- β representou apenas 26% da sua variância total ($P = 0,0018$), o que não foi suficiente para alterar a temperatura corporal.

Figura 10 – Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e imagens termográficas dos camundongos



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 $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF; e $\neq$ HF- α conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. As imagens termográficas dos animais representam as temperaturas médias dos grupos.

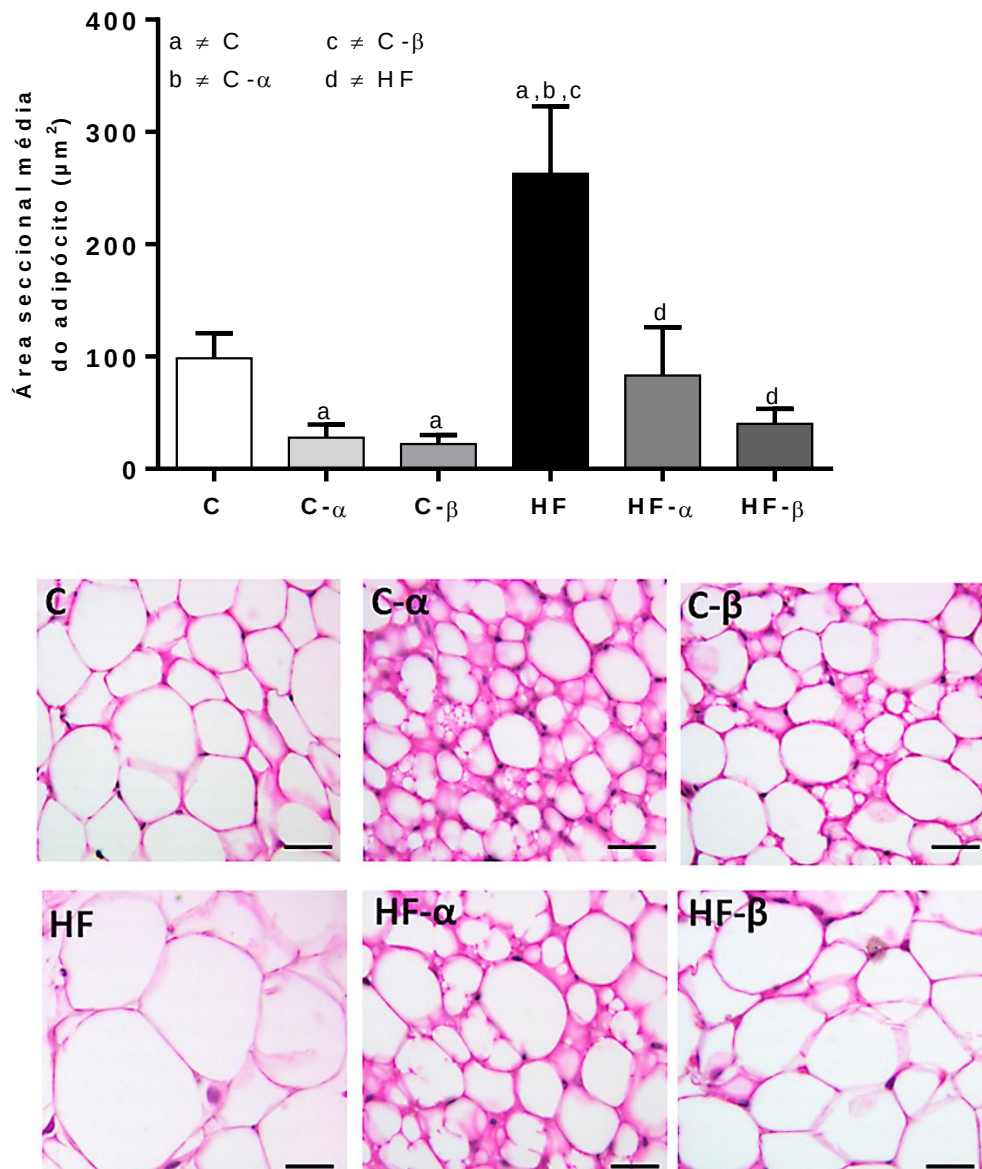
Fonte: A autora, 2019.

4.6 Resultados do Tecido Adiposo Branco

4.6.1 Histologia e Estereologia

Adipócitos do TABs do grupo HF apresentaram considerável aumento quando comparados com os grupos C, C- α e C- β (+ 166%, + 845% e + 1,082%, $P < 0,0001$, respectivamente). O tratamento com PPAR- α resultou em uma área seccional média de adipócitos menor no grupo C- α do que no grupo C (-89%, $P = 0,0226$), e no grupo HF- α do que no grupo HF (-68% , $P < 0,0001$). O tratamento com PPAR- β também foi capaz de melhorar este efeito deletério reduzindo significativamente a área seccional média dos adipócitos nos grupos C- β e HF- β em comparação com C e HF (-78%, $P = 0,0120$ e -85 %, $P < 0,0001$, figura11). O two-way ANOVA mostrou que a dieta ($P < 0,0001$) e ambos os tratamentos ($P < 0,0001$), como fatores isolados, influenciaram a área seccional média dos adipócitos, além de interagir significativamente para determinar este parâmetro ($P = 0,0002$). Fotomicrografias do TABs na figura11 demonstram adipócitos uniloculares nos grupos não tratados (C e HF). A presença de aglomerados de células beges nos grupos tratados com PPAR- α (C- α e HF- α) é perceptível e sugere o fenômeno conhecido como "browning". Ambos os grupos, C- α e HF- α , apresentaram áreas de tecido adiposo multilocular entremeadas nas células uniloculares, que foram denominadas tecido adiposo bege ou brite ("brown in white"). Esse fenômeno não foi observado nos grupos tratados com agonista PPAR- β nesse modelo experimental.

Figura 11 – Área seccional média dos adipócitos e fotomicrografias do TABs



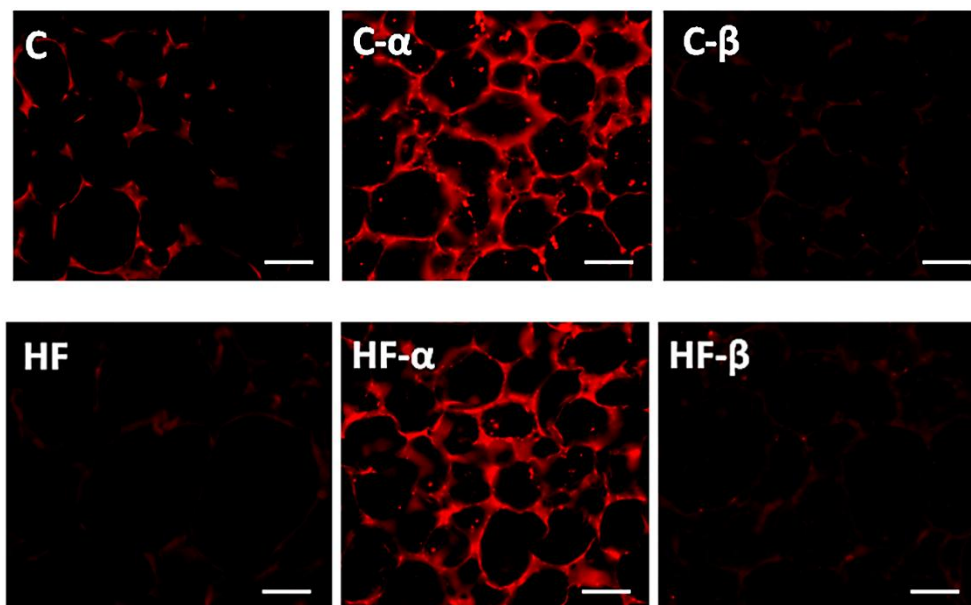
Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF; conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. As fotomicrografias representam o TABs corado com hematoxilina e eosina. Todas as imagens foram obtidas com a mesma ampliação (barra de calibração = 50 μm).

Fonte: A autora, 2019.

4.6.2 Imunofluorescência

O fenômeno do “*browning*” com a presença de adipócitos beges, inicialmente observados pelas imagens histológicas, foram confirmados nos grupos C- α e HF- α pela coloração de imunofluorescência positiva para UCP1 no TABs desses grupos. Inversamente, os adipócitos brancos subcutâneos dos grupos tratados com PPAR- β não apresentaram este padrão de imunoreatividade, uma vez que a UCP1 está estreitamente relacionada com a termogênese e marcadamente expressa em adipócitos beges. A imuno marcação de UCP-1 é observada na figura 12.

Figura 12 – Imunofluorescência de UCP-1 no TABs



Legenda: Imunomarcação de UCP-1 no TABs. Todas as imagens foram obtidas com a mesma ampliação (barra de calibração = 50 μ m).

Fonte: A autora, 2019.

4.6.3 PCR quantitativo tempo real

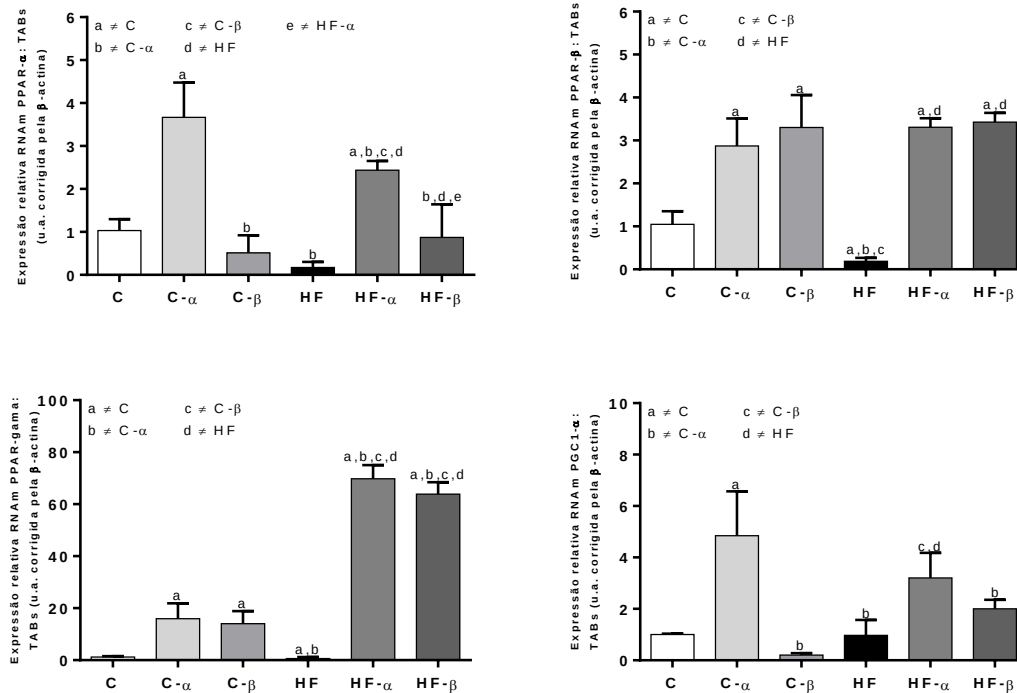
O tratamento com o agonista PPAR- β não produziu coativação da isoforma PPAR- α . Somente os grupos tratados com PPAR- α apresentaram aumento da expressão gênica desse fator de transcrição: grupo C- α quando comparado ao C

(+254,74%, $P < 0,0001$) e grupo HF- α quando comparado ao HF (+1305,07%, $P < 0,0001$). O two-way ANOVA demonstrou que a dieta influenciou significativamente os níveis de PPAR- α ($P = 0,0402$), mas apenas o tratamento com PPAR- α influenciou esse parâmetro, sendo o estímulo mais poderoso, representando 76% de sua variância total. Contudo, a expressão de PPAR- β foi aumentada pelo tratamento com ambas isoformas: o tratamento com PPAR- α provocou coativação do PPAR- β com aumento da expressão deste no grupo C- α quando comparado ao grupo C (+173,71%, $P < 0,0001$) e no grupo HF- α quando comparado ao grupo HF (+4.417,11%, $P < 0,0001$). Ademais, o tratamento com a isoforma beta produziu aumento da expressão deste gene no grupo C- β quando comparado ao C (+214,57%, $P < 0,0001$) e no grupo HF- β quando comparado ao HF (+4.368,76%, $P < 0,0001$). O two-way ANOVA revelou que os tratamentos com PPAR- α e com PPAR- β , independentemente, influenciaram os níveis do gene PPAR- β ($P < 0,0001$). Além disso, ambos os tratamentos interagiram com a dieta para influenciar os níveis do gene PPAR- β ($P = 0,0012$ para o agonista PPAR- α e $P = 0,0192$ para o agonista PPAR- β).

A expressão do gene PPAR- γ apresentou-se igualmente aumentada com ambos tratamentos. Os grupos C- α e C- β apresentaram maior expressão gênica do PPAR- γ do que o grupo C (+ 1228%, $P < 0,0001$ e + 1073%, $P = 0,0005$ figura 13), bem como HF- α e HF - β mostrou expressão aumentada do gene PPAR- γ quando comparado ao grupo HF (+ 10964%, + 10030% e $P < 0,0001$ Fig. 13). A dieta interagiu com ambos os tratamentos para determinar a expressão do gene PPAR-gama (Two-way ANOVA, $P < 0,001$). Não houve diferença entre o PPAR-alfa ou o tratamento com PPAR-beta neste parâmetro, pois ambos representaram 53% da variação de PPAR-gama (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$).

O aumento da expressão gênica de todas as isoformas do PPAR após o tratamento com o agonista do PPAR- α esteve diretamente relacionado ao aumento da expressão do gene PGC1- α nos grupos C- α e HF- α quando comparados as suas contrapartes não tratadas (+ 198%; $P = 0,0009$ e + 17844%, $P < 0,05$, figura 13). Apenas o tratamento com PPAR- α influenciou os níveis do gene PGC1- α , representando 66% de sua variância total (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$).

Figura 13 – Expressão gênica – PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ e PGC1- α



Legenda: Expressões no TABs dos genes PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ e PGC1- α . A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, n = 5. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α (P < 0,05, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

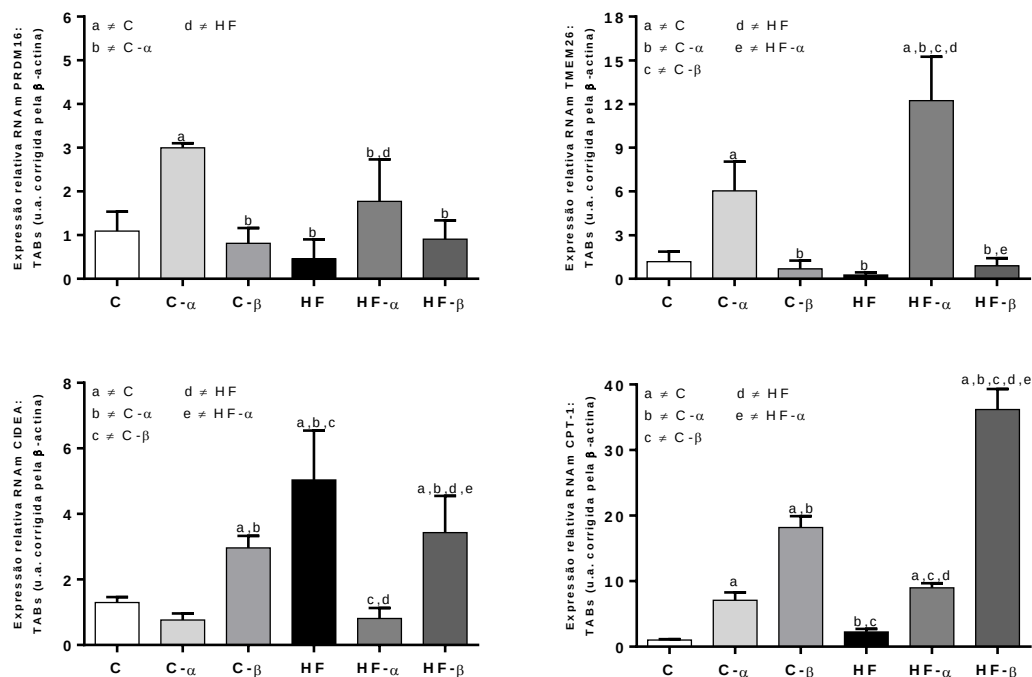
O gene PRDM16, essencial para a manutenção do fenótipo bege nos adipócitos, apresentou-se potencialmente aumentado somente nos grupos tratados com agonista PPAR- α quando comparados ao C e HF (+174,20% no C- α e +287,36% no HF- α , P < 0,005), corroborando com a existência de células beges no TABs desse grupo após o tratamento com PPAR- α , células beges estas já descritas na fotomicrografia acima. O two-way ANOVA confirmou esses achados, pois apenas o tratamento com PPAR- α influenciou esse parâmetro, representando 56% da variância total do PRDM16 (P < 0,0001, figura 14).

A expressão gênica de TMEM-26 foi apenas influenciada pelo PPAR- α em ambos os grupos tratados, o grupo C- α apresentou maior expressão do gene TMEM-26 do que o grupo C (+ 412%, P < 0,0001, figura 14) e o grupo HF- α apresentou maiores níveis de gene TMEM-26 que o grupo HF (+ 4486%, P < 0,0001, figura 14). Os resultados do two-way ANOVA mostraram que apenas o tratamento com PPAR- α influenciou significativamente os níveis do gene TMEM-26, representando 53% de sua variância total (P < 0,0001).

De forma oposta, a expressão do gene CIDEA foi mais influenciada pelo tratamento com PPAR- β . O grupo C- β apresentou maior expressão gênica de CIDEA do que o grupo C (+ 128%, $P = 0,0027$, figura 14), enquanto tanto HF- α e HF- β apresentaram expressão gênica de CIDEA reduzidos quando comparados ao grupo HF. No entanto, o grupo HF- α apresentou uma redução mais pronunciada (-84%, $P < 0,0001$, figura 14) do que o HF- β (-32%, $P < 0,0343$, figura 14) quando comparado ao grupo HF. O two-way ANOVA mostrou que a dieta influenciou os níveis do gene CIDEA e também houve interação com ambos os tratamentos de forma significativa ($P = 0,0015$). No entanto, apenas o tratamento com PPAR- α foi capaz de influenciar isoladamente a expressão do gene CIDEA, representando 39% de sua variância total ($P < 0,0001$).

A expressão gênica de CPT-1b também foi aumentada em C- α e C- β quando comparada ao grupo C (+ 607% e + 1704% $P < 0,0001$, figura 14) e no HF- α e HF- β quando comparados ao HF grupo (+ 300% e + 1512%, $P < 0,0001$, figura 14). Notavelmente, o agonista PPAR- β produziu uma expressão gênica CPT-1b maior do que o agonista PPAR- α em animais alimentados com a dieta controle (C- β : + 157% em relação a C- α , figura 14) e a dieta HF (HF- β : + 303% em relação ao HF- α , figura 14). O two-way ANOVA mostrou uma interação significativa apenas entre a dieta e o tratamento com PPAR- β em relação aos níveis do gene CPT-1b ($P < 0,0001$). Além disso, o tratamento com PPAR- β foi responsável por 79% da variância total de CPT-1b ($P < 0,0001$).

Figura 14 – Expressão gênica – PRDM16, TMEN26, CIDEA e CPT-1b



Legenda: Expressões no TABs dos genes PRDM16, TMEN26, CIDEA e CPT-1b. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, $n = 5$. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α ($P < 0,05$, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

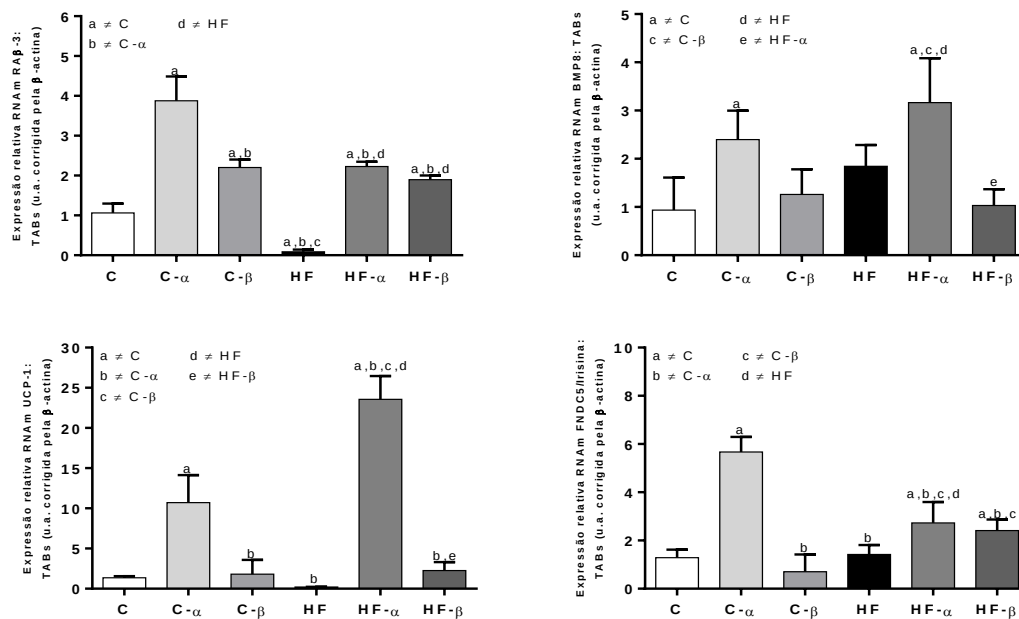
A expressão do RA β -3 apresentou-se aumentada em ambos os grupos tratados. Houve aumento nos grupos C- α e C- β quando comparados ao grupo C (+264,82%, $P < 0,0001$ e +107,24%, $P = 0,0012$) e apresentou aumento no grupos HF- α e HF- β quando comparados ao grupo HF (+2.455,71%, + 2.081,25% $P < 0,0001$). A dieta e ambos os tratamentos exerceram uma influência significativa nos níveis do gene RA β -3 (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$). No entanto, apenas o tratamento com PPAR- α interagiu significativamente com a dieta influenciando os níveis do gene RA β -3 (Two-way ANOVA, $P = 0,0371$). Contudo, a BMP-8, a qual está associada à sinalização da via termogênica a partir do estímulo simpático, somente apresentou-se aumentada nos grupos C- α e HF- α quando comparados ao grupo C e HF, respectivamente (+156,47% e +71,82% + $P < 0,05$). O tratamento com PPAR- α exerceu a principal influência nos níveis do gene BMP8b, representando 47% da sua variância total (Two-way ANOVA, $P = 0,0003$).

Juntamente com as expressões dos genes RA β -3 e BMP8b, o gene FNDC5 / Irisina apresentou-se aumentado nos grupos C- α e HF- α quando comparado com

suas contrapartes não tratados (+ 340%, $P < 0,0001$ e + 92% $P < 0,05$, respectivamente, figura 15). O tratamento com PPAR- β não alterou seus níveis significativamente. O two-way ANOVA destacou o principal efeito do tratamento com PPAR- α , que representou 60% de sua variância total, enquanto a dieta representou 15% e a interação entre dieta e tratamento foi responsável por 18% da variância total do FNDC5 / irisina.

Os resultados de FNDC5 / irisina estão de acordo com o aumento da expressão gênica da UCP1 nos grupos C- α e HF- α quando comparados com grupo C e HF (+ 687% e + 1045% $P < 0,0001$, respectivamente, figura 15). Assim como o tratamento com PPAR- β restaurou os níveis do gene UCP1 no grupo HF- β , mostrando valores semelhantes ao grupo C, foi muito menor que o HF- α (-90%, $P < 0,0001$). O two-way ANOVA mostrou que o tratamento com PPAR- α foi responsável por 73% da variância total da UCP1 ($P < 0,0001$), enquanto o tratamento com PPAR- β representou apenas 28% ($P = 0,0150$). É importante destacar que houve uma interação significativa entre dieta e tratamento com PPAR- α em relação à expressão do gene UCP1 ($P < 0,0001$).

Figura 15 – Expressão gênica – Ra β -3, BMP8, UCP-1 e FNDC5/Irisina



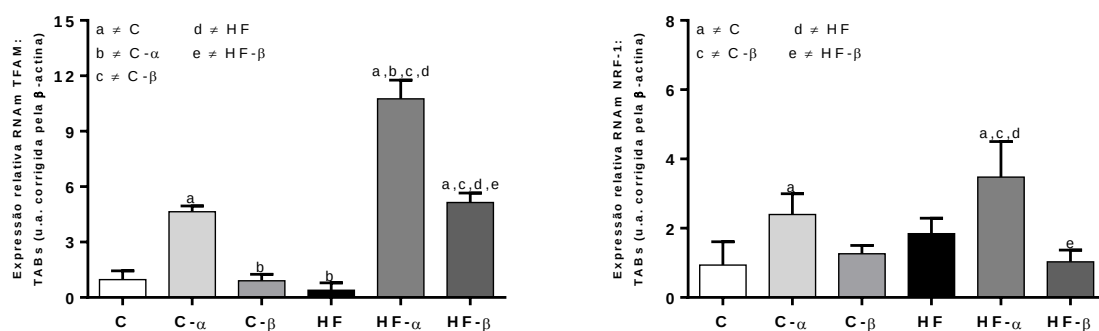
Legenda: Expressões no TABs dos genes RA β -3, BMP8b, UCP-1 e FNDC5/Irisina. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, $n = 5$. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β , d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α ($P < 0,05$, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

TFAM e NRF-1, genes cruciais para a biogênese mitocondrial, foram alterados após os tratamentos. O grupo C- α apresentou maior expressão gênica de TFAM que o grupo C (+ 377%, $P < 0,0001$, figura 16), enquanto os grupos HF- α e HF- β apresentaram maiores níveis de genes TFAM que o grupo HF (+ 2619% e + 1199%, $P < 0,0001$, figura 16). O two-way ANOVA revelou que a dieta e ambos os tratamentos influenciaram independentemente os níveis do gene TFAM ($P < 0,0001$), além de interagir significativamente para determinar este parâmetro ($P < 0,0001$). No entanto, o tratamento com PPAR- α , independentemente, foi responsável por 71% da variação total dos níveis do gene TFAM, exercendo o efeito principal ($P < 0,0001$).

Em contraste, a expressão gênica do NRF-1 foi influenciada apenas pelo PPAR- α em ambos os grupos tratados. O grupo C- α apresentou maior expressão gênica de NRF-1 que o grupo C (+ 635%, $P < 0,005$, figura 16), assim como o grupo HF- α apresentou maiores níveis de gene NRF-1 que o grupo HF (+431 %, $P = 0,007$, figura 16). Tanto a dieta como o tratamento com PPAR- α mostraram uma ação isolada nesse gene ($P < 0,0001$). No entanto, o efeito principal resultou do tratamento com PPAR- α , que representou 48% da variância total da expressão do gene NRF-1.

Figura 16 – Expressão gênica – TFAM e NRF-1



Legenda: Expressões no TABs dos genes TFAM e NRF-1. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, $n = 5$. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α ($P < 0,05$, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

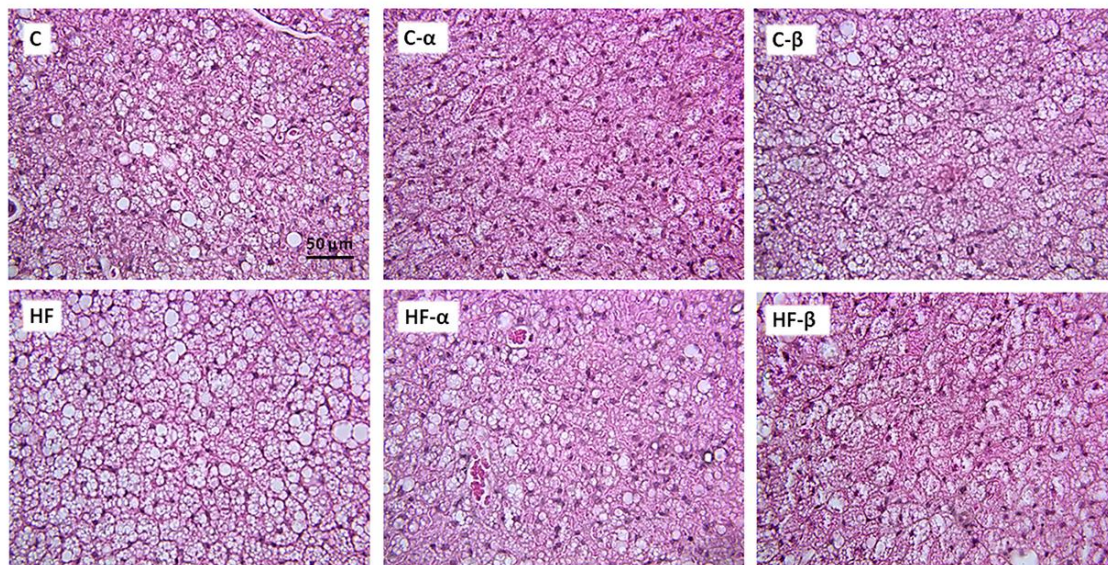
Fonte: A autora, 2019.

4.7 Resultados do Tecido Adiposo Marrom

4.7.1 Histologia

Em relação à conformação morfológica do TAMi, sabe-se que é diferente do TABs e apresenta um reservatório lipídico multilocular assim como uma maior quantidade de mitocôndrias. O grupo C mostrou a característica multilocular padrão com maior acúmulo de gotículas de gordura do que os grupos C- α e C- β , caracterizando metabolismo lipídico intenso nos grupos tratados. O mesmo comportamento foi observado no grupo HF- α , que mostrou uma redução notável no acúmulo de lipídeos dentro do adipócito marrom e maior volume citoplasmático que o grupo HF, que indiretamente sugere um aumento do número de mitocôndrias e implica aumento da atividade metabólica neste tecido. É notável que os grupos que receberam o tratamento com PPAR- α apresentaram menores gotículas de gordura quando comparados aos grupos que receberam o tratamento com PPAR- β . Esses resultados estão descritos na figura 17.

Figura 17 - Fotomicrografias do TAMi



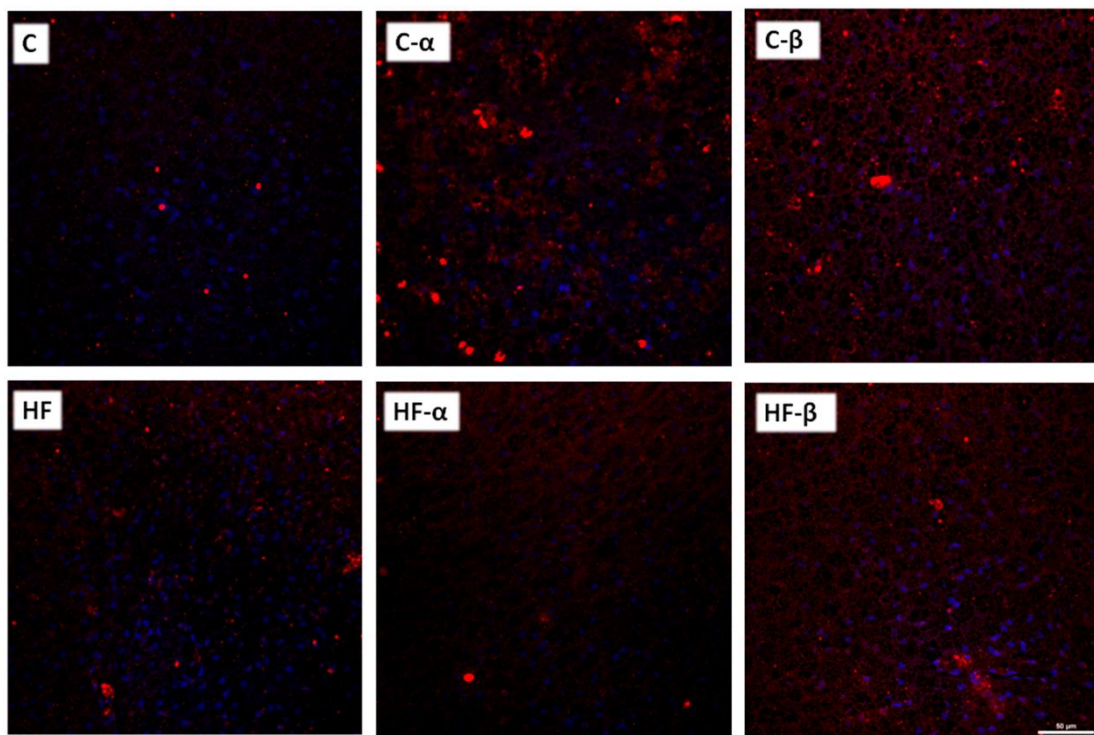
Legenda: O TAMi foi corado com hematoxilina e eosina e as fotomicrografias ilustram os adipócitos maiores no HF do que no grupo C. C- α e HF- α mostram adipócitos multiloculares com gotículas lipídicas menores que C- β e HF- β . Todas as imagens são mostradas com a mesma ampliação (barra de calibração = 50 μ m).

Fonte: A autora, 2019.

4.7.2 Imunofluorescência

A figura 18 apresenta a expressão da UCP-1 após imunofluorescência em todos os grupos estudados. É possível observar que todos os grupos tratados (C- α , C- β , HF- α e HF- β) apresentaram maior expressão de UCP1 do que suas contrapartes (C e HF). A presença de UCP-1 já era esperada porque oTAMi é o principal foco termogênico em roedores. No entanto, após o tratamento, um aumento na expressão da UCP-1 e, conseqüentemente, um aumento na atividade termogênica foram observados principalmente nos grupos que receberam o tratamento com PPAR- α .

Figura 18 – Imunofluorescência de UCP-1 no TAMi



Legenda: Imunomarcacão de UCP-1 no TAMi. Todas as imagens foram obtidas com a mesma ampliação (barra de calibraçao = 50 μ m).

Fonte: A autora, 2019.

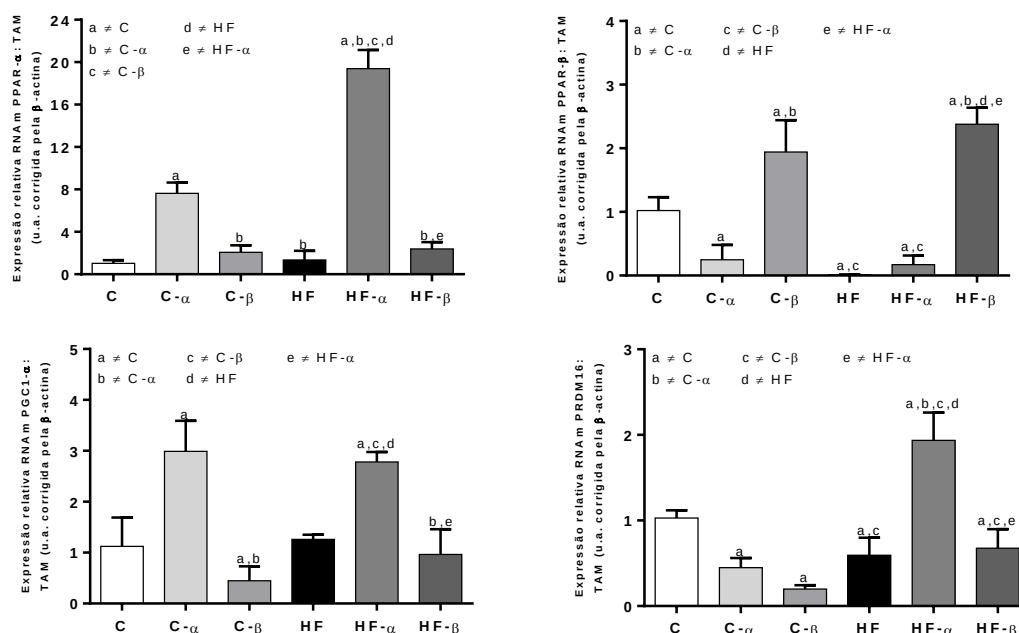
4.7.3 PCR quantitativo tempo real

Como esperado, o tratamento com PPAR- α produziu maior expressão gênica de PPAR- α nos grupos C- α e HF- α do que em suas contrapartes (+ 634,36% e + 1340,24%, $P < 0,0001$, figura 20), enquanto o tratamento com PPAR- β produziu expressão gênica elevada de PPAR- β nos grupos C- β e HF- β em comparação com suas contrapartes (+ 89,82%, $P = 0,003$ e + 19766,33% $P < 0,0001$, figura 20). O tratamento com PPAR- α exerceu a principal influência nos níveis do PPAR- α , representando 67,45% da sua variância total (Two-way ANOVA, $P < 0,0001$). Já o tratamento com PPAR- β apresentou influência no aumento da expressão de PPAR- β (75,03% $P < 0,0001$), enquanto que a dieta influenciou em 2,20% e a interação apresentou influência de 4,13% na variância total da expressão gênica de PPAR- β .

É importante ressaltar que o tratamento com PPAR- α não alterou os níveis do gene PPAR- β , assim como o tratamento com PPAR- β não alterou os níveis do gene PPAR- α , garantindo assim que os resultados aqui apresentados sejam derivados de forma isolada por cada PPAR.

O tratamento com o agonista do PPAR- α resultou em aumento da expressão de seu coativador, PGC-1 α , cuja expressão gênica foi maior nos grupos C- α e HF- α do que nas suas contrapartes não tratadas (+ 166,25% $P < 0,0001$ e + 121,22% $P = 0,0002$, figura 20). O tratamento com PPAR- α influenciou a expressão de PGC-1 α (82,50%, $P < 0,0001$ – Two-way ANOVA). Da mesma forma, o PRDM16, que controla o desenvolvimento de adipócitos marrons no TAM, teve sua expressão aumentada no grupo HF- α quando comparado ao grupo HF (+ 225,55%, $P < 0,0001$), conforme detalhado na figura 19. O tratamento com PPAR- β interagiu com a dieta HF para produzir baixos níveis do gene PRDM16 (48,44% , $P < 0,0001$).

Figura 19 – Expressão gênica – PPAR- α , PPAR- β , PGC1- α e PRDM16



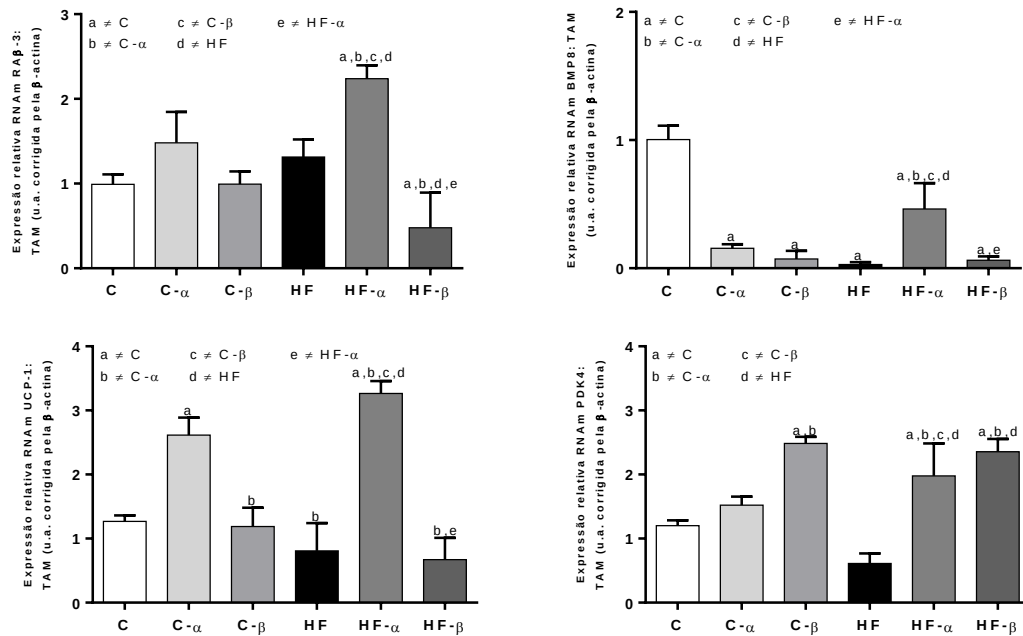
Legenda: Expressões no TAMi dos genes PPAR- α , PPAR- β , PGC1- α e PRDM16. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, n = 5. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α (P < 0,05, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

A expressão dos genes RA β -3 e BMP-8b foi aumentada apenas no grupo HF- α quando comparado ao grupo HF (+ 70,53%, P = 0,0002 e + 1521,93%, P < 0,0001, respectivamente, figura 20). PPAR- α apresentou influência na expressão do RA β -3 (+49,49%, P < 0,0001 – Two-way ANOVA). Da mesma forma, a expressão do gene UCP-1 esteve aumentada apenas nos grupos tratados com o agonista PPAR- α quando comparados com os seus homólogos (+ 106,36% para C- α vs. C e + 303,41% para HF- α vs. HF, P < 0,0001 para ambos, figura 20). PPAR- α também influenciou a expressão de UCP-1 (+86,50%, P < 0,0001 – Two-way ANOVA), o tratamento com PPAR- β influenciou na redução de RA- β 3 (30,90%, P = 0,0019).

PDK4, que desempenha um papel fundamental na regulação da preferência de combustível para o metabolismo, foi maior no grupo C- β do que no grupo C (+ 106,66%, P < 0,0001, figura 20) e nos grupos HF- α e HF- β no grupo HF (+ 224,05%, + 285,62% e P < 0,0001, respectivamente, figura 20). PPAR- α e PPAR- β influenciaram a expressão de PDK4 (57,74% e 90,21%, P < 0,0001 – Two-way ANOVA).

Figura 20 – Expressão gênica – RA β -3, BMP8, UCP-1 e PDK4

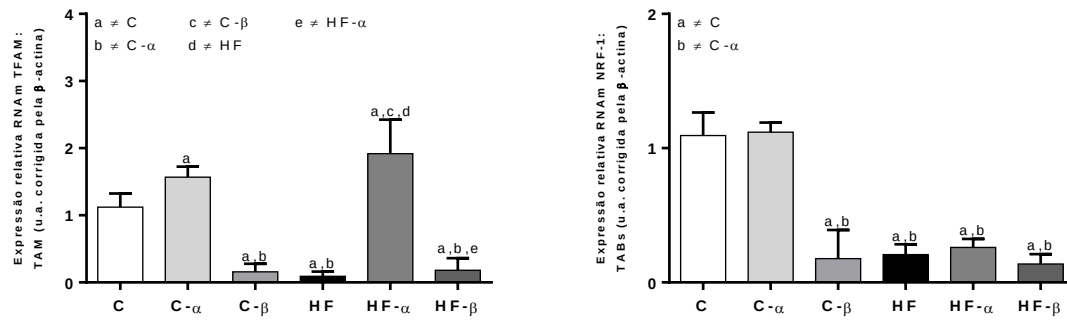


Legenda: Expressões no TAMi dos genes RA β -3, BMP8, UCP-1 e PDK4. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ SD, n = 5. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β ; d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α (P < 0,05, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

Quanto à biogênese mitocondrial, a NRF-1 não foi alterada pelos tratamentos propostos (figura 21). No entanto, TFAM mostrou maior expressão gênica no grupo C- α e HF- α do que em suas contrapartes (+ 39,96%, P < 0,05 e + 2022,55%, P < 0,0001, respectivamente, figura 21). TFAM demonstrou-se alterado com tratamento de PPAR- α , (60,30%, P < 0,0001 – Two-way ANOVA) e foi influenciado de forma negativa pela interação do tratamento com PPAR- β e da dieta HF (35,01%, P < 0,0001).

Figura 21 – Expressão gênica – TFAM e NRF-1



Legenda: Expressões no TAMi dos genes TFAM e NRF-1. A beta-actina foi utilizada como controle interno para normalizar a expressão gênica selecionada. Valores são as médias $\pm$ DP, $n = 5$. Diferenças entre os grupos são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ C- α ; c $\neq$ C- β , d $\neq$ HF e e $\neq$ HF- α ($P < 0,05$, one-way ANOVA e teste post-hoc de Holm-Sidak).

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo identificou o agonista PPAR- α (WY14643) como um potencial indutor na formação de adipócitos beges no TABs, enquanto o agonista PPAR- β/δ (GW0742) melhorou os parâmetros metabólicos e estimulou a beta-oxidação, embora com menos efeito sobre o fenômeno de *browning* e termogênese adaptativa associada no TAMi.

A luz dos achados podemos indicar que os camundongos obesos tratados com PPAR- α ou com PPAR- β/δ se beneficiaram apresentando: perda de peso, aumento da sensibilidade à insulina e normalização do tamanho dos adipócitos. No entanto, a expressão gênica aumentada de marcadores específicos de adipócitos marrons/beges no TABs (UCP1, TEMEM26, BMP8B e PRDM16) foi perceptível somente após o tratamento com PPAR- α , sugerindo a termogênese ativa adaptativa neste local. Essas observações se confirmam com a presença de adipócitos beges positivos para UCP-1 no TABs, o que confirmou o fenômeno de “*browning*” associado ao tratamento com PPAR- α .

Referente à MC, os tratamentos com PPAR- α e PPAR- β/δ produziram uma perda de peso perceptível, como já descrito na literatura (Srivastava, Jahagirdar et al. 2006; Fernandes-Santos, Carneiro et al. 2009; Huh, Mougios et al. 2014). Notavelmente, os grupos tratados não apresentaram diferença no consumo de energia quando comparados aos respectivos grupos não tratados, reforçando que a MC reduzida foi um resultado relacionado diretamente da ativação dos PPARs descartando a necessidade de um grupo de *pair-feeding*.

A redução na MC em ambos os grupos tratados está de acordo com a redução no IA e a consequente melhora na resistência à insulina (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010; Wu, Bikopoulos et al. 2014; Stanford, Middelbeek et al. 2015; Motta, Bargut et al. 2017). A ativação do PPAR- α tem sido previamente relacionada ao GE e temperatura corporal aumentados devido à estimulação da termogênese adaptativa no TABs e potencialização da termogênese clássica no TAMi (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015; Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015).

Além disso, o tamanho reduzido dos adipócitos após tratamento com PPAR- α ou PPAR- β/δ no TABs está correlacionado com a capacidade dessas isoformas de PPAR de induzir β -oxidação, observado aqui pelos níveis aumentados do gene CPT-

1b em ambos os tratamentos (Magliano, Bargut et al. 2013; Wewege, van den Berg et al. 2017).

A ativação de PPAR- α parece desencadear a β -oxidação, aumentando a utilização dos ácidos graxos no metabolismo mitocondrial (Jeong and Yoon 2009; Wingfield, Smith-Ryan et al. 2015).

Em contraste, a ativação de PPAR- β/δ está ligada a uma mudança na preferência por lipídeos como principal combustível celular em oposição ao carboidrato, o que melhora a secreção de insulina estimulada por glicose e promove aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (He, Yang et al. 2010; Jiang, Wan et al. 2010).

A redução nos depósitos de gordura está intimamente relacionada com o aumento do número de adipócitos menores, em contraste com o reduzido número de adipócitos hipertrofiados (Luquet, Lopez-Soriano et al. 2003; Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). Os adipócitos aumentados no grupo HF estão de acordo com a hiperinsulinemia encontrada como resultado de desregulação no eixo adipoinsular, causado pela ingestão crônica de dieta rica em lipídeos (Kieffer and Habener 2000).

Essas alterações englobam hiperleptinemia, sustentada pelo aumento do tamanho dos adipócitos, e a capacidade perdida de leptina em inibir a secreção de insulina pós-prandial pelo pâncreas (Gray, Donald et al. 2010). Assim, a hiperinsulinemia compromete a função das ilhotas pancreáticas a longo prazo, além de estimular a lipogênese e, portanto, a hipertrofia dos adipócitos, além de inibir a hiperplasia adipocitária e a plasticidade de células brancas/beges (Gray, Donald et al. 2010; Gustafson, Hedjazifar et al. 2015).

De forma inversa, ambos os tratamentos normalizaram o tamanho dos adipócitos e os níveis de insulina, que foram previamente mostrados devido à ativação de PPAR- α , PPAR- β/δ e pan-PPAR (Fernandes-Santos, Carneiro et al. 2009; Souza-Mello, Gregorio et al. 2010; Fraulob, Souza-Mello et al. 2012; Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). Os adipócitos de tamanho normal preservam sua capacidade de hiperplasia (Gustafson, Hedjazifar et al. 2015), o que impede a resistência à insulina, mantém a liberação de adipocinas e permite o processo de multilocularização, adquirindo assim um fenótipo semelhante ao TAM (Luo, Jia et al. 2016).

Nesse contexto, a FND5C/irisina parece agir de forma autócrina / parácrina, como uma adipocina, para estimular o “*browning*”, uma vez que sua secreção no

músculo esquelético se correlaciona com a resistência à insulina na obesidade induzida por dieta (Chung, Park et al. 2017), mas não influencia a plasticidade dos adipócitos para um fenótipo termogênico (Wu, Bikopoulos et al. 2014).

A perda de massa corporal e a redução da adiposidade são frequentemente seguidas por uma redução da expressão de FNDC5/irisina no TABs, que parece se relacionar com o músculo esquelético em um mecanismo de retroalimentação (Varela-Rodriguez, Pena-Bello et al. 2016; Brenmoehl, Ohde et al. 2017). No entanto, animais tratados com PPAR- α mostraram redução da adiposidade com aumento da expressão do gene FNDC5/irisina local no TABs e em níveis circulantes, o que pode sugerir um papel para a ativação do PPAR- α no eixo do tecido adiposo-músculo esquelético.

Quanto à via termogênica, o RA β -3 atua como um iniciador (Jimenez, Barbatelli et al. 2003). De forma extensamente descrita sabe-se que, sem a estimulação simpática, não há termogênese adaptativa e, portanto, os adipócitos beges dependem de um acoplamento adequado entre a atividade do RA β -3 e da UCP1 (efetor da termogênese) para aumentar o GE consumindo energia química e produzindo calor, ao invés de gerar ATP (Spiegelman 2013). É importante apontar que ambos os tratamentos resultaram na elevação dos níveis do gene RA β -3. No entanto, apenas o tratamento com PPAR- α aumentou os níveis do gene BMP8b, que age centralmente para aumentar a produção simpática para o sítio termogênico e localmente para amplificar a resposta termogênica ao estímulo adrenérgico (Whittle, Carobbio et al. 2012).

A respeito desse tema, animais *knockout* para BMP8b se tornam mais obesos que animais sem a supressão do gene quando alimentados com uma dieta HF, enquanto a ablação de PPAR- α também torna os roedores mais propensos à obesidade devido à reduzida habilidade de usar lipídeos como combustível para a termogênese (Lee, Pineau et al. 1995; Whittle, Carobbio et al. 2012). Estas observações indicam para um papel central do PPAR- α no acoplamento entre RA- β 3 e UCP-1 através da BMP-8b.

Deve-se destacar que os animais tratados com PPAR- β/δ não apresentaram níveis aumentados de gene PRDM16. O PRDM16 é um gene essencial para a diferenciação da linhagem marrom dos adipócitos, enquanto não se faz crucial para a manutenção dos adipócitos marrons maduros (Seale, Bjork et al. 2008). Por outro lado, os adipócitos beges dependem da expressão aumentada de PRDM16 para

manter seu fenótipo termogênico. Como o “*browning*” é um fenômeno reversível, o adipócito bege se transformará em um adipócito branco se os níveis do gene PRDM16 não forem suficientes para manter seu fenótipo multilocular (Cohen, Levy et al. 2014). Assim, pode-se argumentar que a ausência de alterações nos níveis do gene PRDM16 ajuda a explicar a característica unilocular predominante nos adipócitos dos animais tratados com PPAR- β/δ .

O PPAR- α tem a UCP-1 como gene alvo (Barbera, Schluter et al. 2001). A UCP-1 localiza-se na membrana mitocondrial interna e atua como um canal alternativo aos prótons H⁺, retornando do espaço intermembranar e, assim, evitando a síntese de ATP e permitindo que a energia resultante seja liberada como calor (Ricquier and Bouillaud 2000; Ricquier 2017).

A presença de altas temperaturas corporais, juntamente com a marcação positiva da UCP-1, alta expressão do gene PRDM16, UCP1 e TMEM26 nos grupos tratados com PPAR- α confirma a presença de adipócitos bege metabolicamente ativos (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007) e multiloculares nestes animais.

O aumento no gene TMEM26 foi induzido exclusivamente pelo tratamento com PPAR- α e confirma o fenótipo bege, uma vez que é muito mais expresso pelos adipócitos beges do que pelos adipócitos marrons ou brancos (Wu, Bostrom et al. 2012). Além disso, o PPAR- α parece atuar via FND5/irisina melhorando o desempenho da UCP-1 (Bostrom, Wu et al. 2012), maximizando a capacidade desses novos adipócitos bege de produzir calor ao invés de acumular ATP.

As diferenças em relação à expressão gênica da UCP1 e à marcação de proteínas entre animais submetidos aos dois tratamentos propostos podem ser explicadas pela expressão do CIDEA. CIDEA e UCP1 estão localizadas na mitocôndria e o CIDEA foi identificado como um provável inibidor da atividade da UCP1 formando um complexo com ele (Zhou, Yon Toh et al. 2003), além de estar positivamente relacionado ao tamanho da gotícula lipídica (Barneda, Frontini et al. 2013).

Assim, os animais tratados com PPAR- β mostraram expressão aumentada do gene CIDEA acoplada com aumento das gotículas lipídicas nos seus adipócitos, o que foi acompanhado por uma expressão gênica reduzida de UCP-1 e células UCP-1 negativas sob avaliação de microscopia confocal.

Por outro lado, é razoável dizer que a expressão reduzida de CIDEA pelo tratamento com PPAR- α está de acordo com a alta expressão gênica da UCP-1 e com a marcação positiva da proteína UCP-1 por método de imunofluorescência.

Além disso, a expressão gênica reduzida de CIDEA favorece a multilocularização dos adipócitos aumentando a taxa de lipólise, enquanto a CPT-1b aumenta a beta-oxidação. Ambos os eventos garantem o suprimento de substrato para a termogênese aumentada, levando a um fenótipo mais magro (Zhou, Yon Toh et al. 2003; Kersten 2014). Quanto ao processo de multilocularização, a biogênese mitocondrial desempenha um papel fundamental para sustentar essa nova fisiologia celular, visando a termogênese em oposição a lipogênese e ao armazenamento de lipídeos (Puigserver 2005). O acoplamento entre o núcleo e a mitocôndria é feito pelo NRF-1, que sinaliza ao TFAM para ativar a duplicação do DNA mitocondrial (Gleyzer, Vercauteren et al. 2005). Os níveis dos genes NRF-1 e TFAM foram aumentados pelo tratamento com PPAR- α .

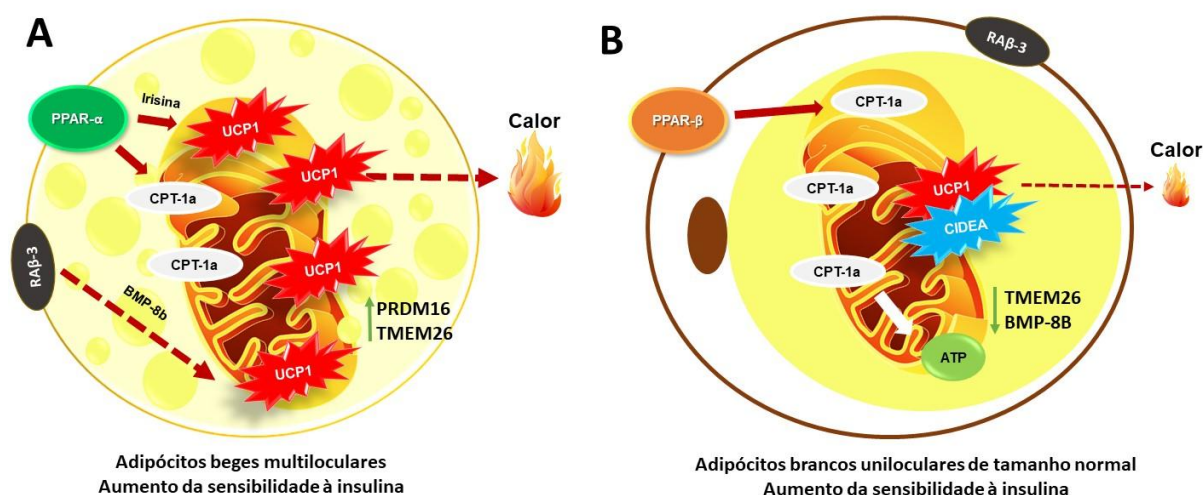
Assim como o tratamento com PPAR- β/δ não causou relevante termogênese com base na possível interação entre CIDEA e UCP1, os animais HF- β apresentaram a maior expressão gênica de CPT-1a, relacionada ao uso de lipídeos como combustível, não apenas pelos adipócitos (Bargut, Souza-Mello et al. 2016), mas também pelo fígado (Magliano, Penna-de-Carvalho et al. 2015) e pelo músculo esquelético (Narkar, Downes et al. 2008), estando relacionados ao tamanho reduzido dos adipócitos, à tolerância à glicose normalizada e ao fenótipo magro (He, Yang et al. 2010).

Vale ressaltar que a maior expressão de PPAR- γ no TABs observada após os dois tratamentos, independentemente da dieta, não pareceu influenciar o fenômeno de “*browning*” no presente estudo. Pode-se argumentar que ambos os agonistas (WY-14643 e GW0742) podem funcionar como agonistas parciais do PPAR- γ , porque apenas o agonismo total do PPAR- γ provoca o “*browning*” (Ohno, Shinoda et al. 2012).

Algumas observações conclusivas centrais são de que o GW0742 aumentou a expressão do gene PPAR- β/δ , sem alterar os níveis do gene PPAR- α , isolando assim os resultados da isoforma PPAR- β/δ , que foi menos potente para induzir a termogênese no TABs. Propomos que uma possível interação entre CIDEA e UCP1 ocorre quando o PPAR- β/δ é ativado sem uma co-ativação do PPAR- α . Além disso, vale ressaltar que a temperatura de 21°C, utilizada no presente estudo para

acondicionamento dos animais, não é capaz de afetar a expressão da UCP-1 no SWAT, nem pode desencadear o fenômeno de “*browning*”. Somente a temperatura de 4°C pode desencadear o “*browning*”, descartando o uso de um indutor farmacológico (Kalinovich, de Jong et al. 2017). Assim, podemos definir que o fenômeno de “*browning*” observado pode ser inteiramente atribuído ao agente WY14643. A figura 22 detalha o principal tipo de adipócito encontrado no TABs após os tratamentos com PPAR- α e PPAR- β/δ e sua fisiologia.

Figura 22 - Alterações no TABs após o tratamento com PPAR- α e PPAR- β



Legenda: Esquema dos principais resultados obtidos no TABs. A) Os animais tratados com o agonista do PPAR- α (WY-14643) apresentaram adipócitos beges predominantemente no TABs, caracterizados por alta expressão do gene PRDM16, TMEM26, UCP1, e temperatura corporal elevada. A termogênese aumentada foi sustentada por substratos originados do aumento da beta-oxidação acoplada à alta produção adrenérgica indicada pelos níveis elevados do gene BMP-8b. B) Os animais tratados com o agonista do PPAR- β (GW0742) apresentaram adipócitos brancos de tamanho normal, caracterizados por baixos níveis de gene PRDM16, inalterações nos genes TMEM26, BMP-8b quando comparados ao HF não tratado. Os efeitos metabólicos benéficos foram causados pela beta-oxidação acentuada, que reduziu o tamanho dos adipócitos e melhorou a sensibilidade à insulina. Notavelmente, a expressão aumentada de CIDEA e sua capacidade de inibir a atividade da UCP1 podem explicar a termogênese adaptativa menos evidente.

Pode-se argumentar que o PPAR- α induziu ativação dos adipócitos marrons metabolicamente ativos, que mostraram níveis mais altos de genes de marcadores termogênicos no TAMI, juntamente com o aumento da temperatura corporal. É notável que ambos os tratamentos causaram uma preferência por lípidos como combustível também para os adipócitos marrons, o que aliado à positiva imunomarcagem da UCP-1, estimulação beta-adrenérgica e aumentado GE

asseguram a termogênese adaptativa favorecida devido à ativação isolada de PPAR- α .

Notavelmente, o presente estudo pôde isolar os efeitos de ambas as isoformas do PPAR, pois o WY14643 influenciou os níveis do gene PPAR- α e não afetou os níveis do gene PPAR- β , enquanto o GW0742 influenciou apenas a isoforma PPAR- β no TAMi. Essas observações são importantes para a interpretação dos resultados, além de trazer novidades para o estudo.

Foi possível mostrar evidências convincentes da oxidação lipídica sendo favorecida com ambos os tratamentos, resultando em gotículas lipídicas menores dentro de seus adipócitos marrons.

Assim como o PPAR- γ desempenha um papel na adipogênese da linhagem marrom (Nedergaard, Petrovic et al. 2005), as isoformas PPAR- α e PPAR- β foram recentemente ligadas a sinais lipolíticos após estimulação beta-adrenérgica de adipócitos marrons (Mottillo, Bloch et al. 2012).

A estimulação beta-adrenérgica provoca uma motivação no padrão da expressão gênica no adipócito marrom, incluindo a alta expressão dos genes PPAR- α , PPAR- β dentre outros genes termogênicos, enquanto a lipólise visa mobilizar ácidos graxos para utilização pela UCP-1 oferecendo combustível para a termogênese no TAMi (Nicholls and Rial 1999; Mottillo, Bloch et al. 2012).

Em contraste, a via termogênica pode ser desacoplada da captação de glicose no TAM (Hankir, Kranz et al. 2017), enfatizando que o papel do PPAR- α e do PPAR- β na mobilização lipídica e, portanto, na termogênese no TAM, justificam o crescente interesse da comunidade científica sobre estas isoformas dos PPARs.

Nossos resultados mostram que ambos os tratamentos induziram altos níveis do gene PDK4. A PDK4 é induzida pela FOXO1 e desempenha um papel fundamental no estabelecimento do uso preferencial de ácidos graxos como combustível primário, em vez do uso da glicose, pois inibe a enzima piruvato desidrogenase, bloqueando a oxidação da glicose (Nahle, Hsieh et al. 2008; Kleiner, Nguyen-Tran et al. 2009).

Essa mudança no suprimento de energia é extremamente importante, assim como a lipólise e a beta-oxidação mitocondrial que são etapas cruciais para a ativação da termogênese no TAM (Lee, Ellis et al. 2015), são etapas críticas para a ativação e manutenção do fenótipo marrom (Gonzalez-Hurtado, Lee et al. 2018).

Camundongos com deficiência na oxidação de ácidos graxos no TAM são intolerantes ao frio (Lee, Ellis et al. 2015). Sabe-se que a utilização preferencial dos lípidos como combustível foi anteriormente atribuída à isoforma PPAR- β (He, Yang et al. 2010; Jiang, Wan et al. 2010), mas aqui mostramos que o agonista PPAR- α também promove esta alteração metabólica para a utilização preferencial dos ácidos graxos como combustível no TAM.

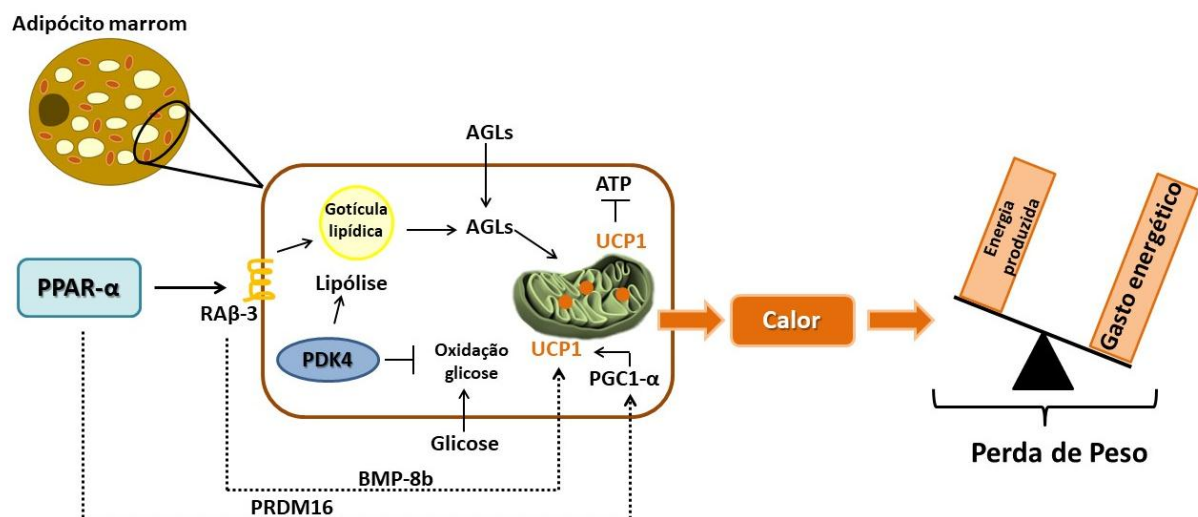
Embora a oxidação preferencial de ácidos graxos tenha sido observada após os dois tratamentos, apenas o tratamento com PPAR- α provocou aumento dos níveis do gene PRDM16, o que pode implicar um recrutamento contínuo de novos adipócitos marrons, uma vez que é um gene essencial para definir o destino das células MYF5+ para adipogênese do TAM ao invés da miogênese (Kajimura, Seale et al. 2009). Além disso, foi possível observar níveis aumentados do gene PGC1- α e TFAM suportando esses achados, pois ambos estão relacionados à biogênese mitocondrial (Piantadosi and Suliman 2006; Uldry, Yang et al. 2006). O PGC1- α é fundamental para a ativação completa da termogênese, embora não seja crucial para a adipogênese do TAM (Hondares, Rosell et al. 2011).

Dessa forma, foi demonstrado anteriormente que a ativação dupla de PPAR- α e PPAR- β pelo fenofibrato provocou aumento dos níveis do gene PGC1- α e termogênese adaptativa em adipócitos marrons (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015), além do recrutamento de adipócitos beges, levando a um resultado de BE negativo, portanto, influenciando fortemente a perda de MC e um melhor controle glicêmico (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). A este respeito, apenas os animais tratados com PPAR- α apresentaram altos níveis de gene PGC1- α e GE aumentado, que juntamente com o aumento da temperatura corporal, sugerem que a diminuição observada na MC foi impulsionada pela termogênese adaptativa.

A termogênese adaptativa é facultativa e é agudamente induzida pela estimulação adrenérgica (Cannon and Nedergaard 2010). Assim, apenas o tratamento com PPAR- α causou níveis aumentados dos genes RA β -3 e BMP-8b. O primeiro é um indicador de estimulação adrenérgica e está relacionado ao aumento do GE (Bachman, Dhillon et al. 2002) (3), enquanto o segundo está relacionado à indução da termogênese aguda no TAM, pois aumenta a responsividade dos adipócitos marrons à estimulação adrenérgica (Whittle, Carobbio et al. 2012), além de ser também um gene alvo do PPAR- α (Whittle, Carobbio et al. 2012; Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). A UCP-1, efetora de termogênese, também foi mais

expressiva nos animais tratados com PPAR- α e pode estar diretamente relacionado à alta expressão gênica de PRDM16, pois esse parece complexar-se com PPAR- α para induzir a ativação completa de PGC1- α e UCP-1, maximizando a dissipação de energia através da termogênese no TAM (Hondares, Rosell et al. 2011). Além disso, a expressão do gene UCP-1 geralmente mostra um aumento muito grande devido à estimulação adrenérgica (Rehmark, Nechad et al. 1990), notada aqui somente após o tratamento com PPAR- α . A figura 23 resume os principais resultados devido ao tratamento com PPAR- α .

Figura 23 - Esquema: Alterações no TAMi



Legenda: O agonista do PPAR- α (WY14643) estimulou a expressão do gene da $RA\beta-3$ e $PDK4$, favorecendo a lipólise sobre a oxidação da glicose. Em paralelo, o PPAR- α também aumenta os níveis dos genes $BMP-8b$ e $PRDM16$, ambos genes que favorecem a ativação da UCP-1. O $PRDM16$ parece agir através do $PGC1-\alpha$. A expressão alta de UCP-1 utilizou lipídeos como combustível para dissipar energia como calor, aumentando a temperatura corporal e o gasto de energia, levando a um BE negativo com consequente perda de massa corporal.

Em vez disso, o tratamento com PPAR- β pode assemelhar-se aos efeitos do PPAR- γ na fisiologia dos adipócitos marrons. Embora a ativação do PPAR- γ seja fundamental para a diferenciação dos adipócitos marrons, ele recruta adipócitos marrons não-adrenérgicos que são totalmente competentes, mas aguarda um gatilho (o estímulo adrenérgico) para iniciar a termogênese.

Neste contexto, animais tratados com PPAR- β mostraram imunofluorescência positiva para UCP-1 e um aumento na temperatura corporal, mas este estímulo não foi suficiente para aumentar significativamente o GE ou produzir um aumento nos níveis de genes termogênicos (β 3-AR, BMP-8b, PRDM16 e UCP1).

Considerando que os animais foram mantidos sob uma temperatura abaixo da termoneutralidade para roedores (30°C) (Kalinovich, de Jong et al. 2017), essas observações podem ser resultado da termogênese causada por tremores para alcançar a regulação da temperatura corporal. Quanto à temperatura ambiente, é importante ressaltar que os grupos não tratados permaneceram nas mesmas condições, o que torna nossos resultados confiáveis.

Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com CL316243, um agonista do RA β -3, ativou a termogênese no TAM com o aumento do GE, mas não resultou em perda significativa de MC ou alterações de adiposidade devido a um aumento compensatório na ingestão de energia em temperatura ambiente semelhante ao nosso estudo (22°C) (Xiao, Goldgof et al. 2015). Estas observações reforçam os presentes resultados, uma vez que o agonista do PPAR- α WY14643 produziu uma perda significativa de MC e GE aumentado no grupo C- α (sem restrições metabólicas) e HF- α numa temperatura ambiente abaixo da termoneutralidade, sem alterações na ingestão de alimentos. Assim como a temperatura ambiente de 21°C é capaz de induzir a expressão de UCP-1 no TAM de camundongos (Kalinovich, de Jong et al. 2017), os efeitos do tratamento do PPAR- α na UCP-1 e a termogênese superaram os efeitos da exposição a uma temperatura abaixo da termoneutralidade observada nos grupos não tratados.

CONCLUSÕES

De forma geral, nossos resultados apontam para um papel decisivo do agonismo do PPAR- α no “*browning*” do TABs, enquanto o agonismo do PPAR- β/δ foi menos capaz de ativar a via termogênica neste sítio não-termogênico, provavelmente devido à expressão aumentada do CIDEA.

Embora a melhora nos efeitos metabólicos tenham sido impulsionados por ambos os agonistas PPAR envolvendo o aumento na beta-oxidação mitocondrial com reduzido tamanho dos adipócitos e aumento na sensibilidade à insulina, apenas o tratamento com PPAR- α melhorou os níveis dos genes TMEM26 e PRDM16, além de produzir marcadores positivos de UCP-1 em adipócitos bege multiloculares juntamente com elevação da temperatura corporal.

Nossos resultados mostram evidências convincentes de que a ativação isolada do PPAR- α foi mais eficiente na indução da termogênese induzida por receptores adrenérgicos do que a ativação do PPAR- β , apesar dos efeitos metabólicos benéficos e do remodelamento no TAMi com ambos os tratamentos. A ativação do PPAR- α parece levar a uma ativação completa do mecanismo de termogênese no TAMi.

Essas observações estão em conformidade com o aumento da termogênese adaptativa e propõem um possível potencial translacional dos agonistas do PPAR- α no tratamento da obesidade.

REFERÊNCIAS

- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 327-32.
- Arner, E., P. O. Westermark, et al. (2010). "Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology." Diabetes **59**(1): 105-9.
- Astrup, A. and J. Brand-Miller (2012). "Diet composition and obesity." Lancet **379**(9821): 1100; author reply 1100-1.
- Bachman, E. S., H. Dhillon, et al. (2002). "betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance." Science **297**(5582): 843-5.
- Barbera, M. J., A. Schluter, et al. (2001). "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 **276**(2): 1486-93.
- Bargut, T. C., A. C. Silva-e-Silva, et al. (2016). "Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers." Eur J Nutr **55**(1): 159-69.
- Bargut, T. C., V. Souza-Mello, et al. (2016). "Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice." Food Funct **7**(3): 1468-76.
- Bargut, T. C. L., F. F. Martins, et al. (2018). "Administration of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids may improve the remodeling and browning in subcutaneous white adipose tissue and thermogenic markers in brown adipose tissue in mice." Mol Cell Endocrinol.
- Barneda, D., A. Frontini, et al. (2013). "Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues." Biochim Biophys Acta **1831**(5): 924-33.
- Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." Nat Rev Endocrinol **10**(1): 24-36.
- Berger, J. and D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." Annu Rev Med **53**: 409-35.
- Bostrom, P., J. Wu, et al. (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis." Nature **481**(7382): 463-8.
- Brady, P. S., K. A. Marine, et al. (1989). "Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs." Biochem J **260**(1): 93-100.

- Braissant, O., F. Foufelle, et al. (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." Endocrinology **137**(1): 354-66.
- Brenmoehl, J., D. Ohde, et al. (2017). "Browning of subcutaneous fat and higher surface temperature in response to phenotype selection for advanced endurance exercise performance in male DUhTP mice." J Comp Physiol B **187**(2): 361-373.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-22.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2010). "Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans)." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 1**: S7-16.
- Chung, N., J. Park, et al. (2017). "The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue." J Exerc Nutrition Biochem **21**(2): 39-47.
- Cohen, P., J. D. Levy, et al. (2014). "Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch." Cell **156**(1-2): 304-16.
- Coll, T., E. Barroso, et al. (2010). "The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease." PPAR Res **2010**.
- Coll, T., R. Rodriguez-Calvo, et al. (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome." Curr Mol Pharmacol **2**(1): 46-55.
- Collins, S., T. L. Martin, et al. (2004). "Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics." Physiol Behav **81**(2): 243-8.
- Cousin, B., S. Cinti, et al. (1992). "Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization." J Cell Sci **103 (Pt 4)**: 931-42.
- Crowley, V. and A. J. Vidal-Puig (2001). "Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**(1): 70-5.
- Cypess, A. M., S. Lehman, et al. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-17.

- Divoux, A. and K. Clement (2011). "Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue." Obes Rev **12**(5): e494-503.
- Dunham-Snary, K. J. and S. W. Ballinger (2013). "Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility." Free Radic Biol Med **65**: 1229-37.
- Fernandes-Santos, C., R. E. Carneiro, et al. (2009). "Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet." Nutrition **25**(7-8): 818-27.
- Fernandes, J., F. Ferreira-Santos, et al. (2018). "Emotional processing in obesity: a systematic review and exploratory meta-analysis." Obes Rev **19**(1): 111-120.
- Foster, D. O. and M. L. Frydman (1978). "Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline." Can J Physiol Pharmacol **56**(1): 110-22.
- Fraulob, J. C., V. Souza-Mello, et al. (2012). "Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet." Clin Sci (Lond) **123**(4): 259-70.
- Giralt, M. and F. Villarroya (2013). "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?" Endocrinology **154**(9): 2992-3000.
- Gleyzer, N., K. Vercauteren, et al. (2005). "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators." Mol Cell Biol **25**(4): 1354-66.
- Gonzalez-Hurtado, E., J. Lee, et al. (2018). "Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming." Mol Metab **7**: 45-56.
- Gray, S. L., C. Donald, et al. (2010). "Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling." Endocrinology **151**(9): 4178-86.
- Grover, S. A., M. Kaouache, et al. (2014). "Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study." Lancet Diabetes Endocrinol.
- Gustafson, B., S. Hedjazifar, et al. (2015). "Insulin resistance and impaired adipogenesis." Trends Endocrinol Metab **26**(4): 193-200.
- Hankir, M. K., M. Kranz, et al. (2017). "Dissociation Between Brown Adipose Tissue (18)F-FDG Uptake and Thermogenesis in Uncoupling Protein 1-Deficient Mice." J Nucl Med **58**(7): 1100-1103.

- Harrington, W. W., S. B. C, et al. (2007). "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**: 97125.
- He, H., D. Yang, et al. (2010). "Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways." Hypertension **55**(4): 869-79.
- Hondares, E., M. Rosell, et al. (2011). "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 **286**(50): 43112-22.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Huh, J. Y., V. Mougios, et al. (2014). "Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation." J Clin Endocrinol Metab **99**(11): E2154-61.
- Ishibashi, J. and P. Seale (2010). "Medicine. Beige can be slimming." Science **328**(5982): 1113-4.
- Jeong, S. and M. Yoon (2009). "Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPARalpha in high fat diet-induced obese mice." Exp Mol Med **41**(6): 397-405.
- Jiang, L., J. Wan, et al. (2010). "Activation of PPARdelta promotes mitochondrial energy metabolism and decreases basal insulin secretion in palmitate-treated beta-cells." Mol Cell Biochem **343**(1-2): 249-56.
- Jimenez, M., G. Barbatelli, et al. (2003). "Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat." Eur J Biochem **270**(4): 699-705.
- Kajimura, S., P. Seale, et al. (2009). "Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex." Nature **460**(7259): 1154-8.
- Kalinovich, A. V., J. M. de Jong, et al. (2017). "UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning." Biochimie **134**: 127-137.
- Keipert, S. and M. Jastroch (2014). "Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis?" Biochim Biophys Acta **1837**(7): 1075-82.
- Kersten, S. (2014). "Integrated physiology and systems biology of PPARalpha." Mol Metab **3**(4): 354-71.

- Kieffer, T. J. and J. F. Habener (2000). "The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(1): E1-E14.
- Kim, J. Y., E. van de Wall, et al. (2007). "Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue." J Clin Invest **117**(9): 2621-37.
- Kleiner, S., R. J. Mepani, et al. (2012). "Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9635-40.
- Kleiner, S., V. Nguyen-Tran, et al. (2009). "PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function." J Biol Chem **284**(28): 18624-33.
- Klingenspor, M., S. Herzig, et al. (2012). "Brown fat develops a brite future." Obes Facts **5**(6): 890-6.
- Kolditz, C. I. and D. Langin (2010). "Adipose tissue lipolysis." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 377-81.
- Krotkiewski, M., P. Bjorntorp, et al. (1983). "Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution." J Clin Invest **72**(3): 1150-62.
- Lafontan, M. and M. Berlan (1993). "Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function." J Lipid Res **34**(7): 1057-91.
- Lafontan, M. and J. Girard (2008). "Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue." Diabetes Metab **34**(4 Pt 1): 317-27.
- Langin, D. (2010). "Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity?" Biochim Biophys Acta **1801**(3): 372-6.
- Lee, J., J. M. Ellis, et al. (2015). "Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation." Cell Rep **10**(2): 266-79.
- Lee, S. S., T. Pineau, et al. (1995). "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators." Mol Cell Biol **15**(6): 3012-22.
- Lidell, M. E., M. J. Betz, et al. (2014). "Two types of brown adipose tissue in humans." Adipocyte **3**(1): 63-6.
- Lo, K. A. and L. Sun (2013). "Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes." Biosci Rep **33**(5).

- Loncar, D., B. A. Afzelius, et al. (1988). "Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes." J Ultrastruct Mol Struct Res **101**(2-3): 199-209.
- Lowell, B. B. and B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." Nature **404**(6778): 652-60.
- Luo, X., R. Jia, et al. (2016). "Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice." Int J Mol Sci **17**(5).
- Luquet, S., J. Lopez-Soriano, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability." FASEB J **17**(15): 2299-301.
- Magliano, D. C., T. C. Bargut, et al. (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice." PLoS One **8**(5): e64258.
- Magliano, D. C., A. Penna-de-Carvalho, et al. (2015). "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 **50**(2): 355-67.
- Masoodi, M., O. Kuda, et al. (2015). "Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism." Biochim Biophys Acta **1851**(4): 503-18.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.
- McNeel, R. L. and H. J. Mersmann (2005). "Low- and high-carbohydrate diets: body composition differences in rats." Obes Res **13**(10): 1651-60.
- Motta, V. F., T. L. Bargut, et al. (2017). "Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle." J Appl Physiol (1985) **123**(4): 699-709.
- Mottillo, E. P., A. E. Bloch, et al. (2012). "Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply." J Biol Chem **287**(30): 25038-48.
- Nagasawa, T., Y. Inada, et al. (2006). "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 **536**(1-2): 182-91.
- Nahle, Z., M. Hsieh, et al. (2008). "CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress." J Biol Chem **283**(21): 14317-26.

- Narkar, V. A., M. Downes, et al. (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." Cell **134**(3): 405-15.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, et al. (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(2): E444-52.
- Nedergaard, J., N. Petrovic, et al. (2005). "PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation." Biochim Biophys Acta **1740**(2): 293-304.
- Nicholls, D. G. and E. Rial (1999). "A history of the first uncoupling protein, UCP1." J Bioenerg Biomembr **31**(5): 399-406.
- Ohno, H., K. Shinoda, et al. (2012). "PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein." Cell Metab **15**(3): 395-404.
- Park, A., W. K. Kim, et al. (2014). "Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells." World J Stem Cells **6**(1): 33-42.
- Peirce, V., S. Carobbio, et al. (2014). "The different shades of fat." Nature **510**(7503): 76-83.
- Petrovic, N., T. B. Walden, et al. (2010). "Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes." J Biol Chem **285**(10): 7153-64.
- Piantadosi, C. A. and H. B. Suliman (2006). "Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1." J Biol Chem **281**(1): 324-33.
- Popkin, B. M., B. Lu, et al. (2002). "Understanding the nutrition transition: measuring rapid dietary changes in transitional countries." Public Health Nutr **5**(6A): 947-53.
- Puigserver, P. (2005). "Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha." Int J Obes (Lond) **29 Suppl 1**: S5-9.
- Rachid, T. L., A. Penna-de-Carvalho, et al. (2015). "Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice." Mol Cell Endocrinol **402**: 86-94.
- Rachid, T. L., A. Penna-de-Carvalho, et al. (2015). "PPAR-alpha agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice." Cell Biochem Funct **33**(4): 249-56.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "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 **123**(11): 1939-51.
- Rehmark, S., M. Nechad, et al. (1990). "Alpha- and beta-adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture." J Biol Chem **265**(27): 16464-71.
- Richard, D., A. C. Carpentier, et al. (2010). "Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 2**: S59-66.
- Ricquier, D. (2017). "UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective." Biochimie **134**: 3-8.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." J Physiol **529 Pt 1**: 3-10.
- Roca-Rivada, A., C. Castela, et al. (2013). "FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine." PLoS One **8**(4): e60563.
- Rodriguez, A., S. Ezquerro, et al. (2015). "Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **309**(8): E691-714.
- Schmidt, A., N. Endo, et al. (1992). "Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids." Mol Endocrinol **6**(10): 1634-41.
- Schmidt, M. I., B. B. Duncan, et al. (2011). "Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges." Lancet **377**(9781): 1949-61.
- Seale, P., B. Bjork, et al. (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." Nature **454**(7207): 961-7.
- Seidell, J. C. and J. Halberstadt (2015). "The global burden of obesity and the challenges of prevention." Ann Nutr Metab **66 Suppl 2**: 7-12.
- Serrano-Marco, L., R. Rodriguez-Calvo, et al. (2011). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/-delta (PPAR-beta/-delta) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes." Diabetes **60**(7): 1990-9.
- Sethi, J. K. and G. S. Hotamisligil (1999). "The role of TNF alpha in adipocyte metabolism." Semin Cell Dev Biol **10**(1): 19-29.
- Shabalina, I. G., N. Petrovic, et al. (2013). "UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic." Cell Rep **5**(5): 1196-203.
- Sher, T., H. F. Yi, et al. (1993). "cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor." Biochemistry **32**(21): 5598-604.

- Shimabukuro, M., C. Kozuka, et al. (2013). "Ectopic fat deposition and global cardiometabolic risk: new paradigm in cardiovascular medicine." J Med Invest **60**(1-2): 1-14.
- Silva-Veiga, F. M., T. L. Rachid, et al. (2018). "GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice." Mol Cell Endocrinol **474**: 227-237.
- Souza-Mello, V., B. M. Gregorio, et al. (2010). "Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet." Clin Sci (Lond) **119**(6): 239-50.
- Spiegelman, B. M. (2013). "Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease." Diabetes **62**(6): 1774-82.
- Srivastava, R. A., R. Jahagirdar, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." Mol Cell Biochem **285**(1-2): 35-50.
- Stanford, K. I., R. J. Middelbeek, et al. (2015). "Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations." Diabetes **64**(7): 2361-8.
- Surwit, R. S., M. N. Feinglos, et al. (1995). "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice." Metabolism **44**(5): 645-51.
- Swinburn, B. A., G. Sacks, et al. (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." Lancet **378**(9793): 804-14.
- Tenenbaum, A. and E. Z. Fisman (2012). "Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention?" Cardiovasc Diabetol **11**: 140.
- Tenenbaum, A. and E. Z. Fisman (2012). "Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction." Cardiovasc Diabetol **11**: 125.
- Tenenbaum, A., M. Motro, et al. (2005). "Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons." Cardiovasc Diabetol **4**: 14.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-83.
- Uldry, M., W. Yang, et al. (2006). "Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation." Cell Metab **3**(5): 333-41.

- Vamecq, J. and N. Latruffe (1999). "Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors." Lancet **354**(9173): 141-8.
- van Dieren, S., J. W. Beulens, et al. (2010). "The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **17 Suppl 1**: S3-8.
- Varela-Rodriguez, B. M., L. Pena-Bello, et al. (2016). "FND5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle." Sci Rep **6**: 29898.
- Vasselli, J. R., R. Weindruch, et al. (2005). "Intentional weight loss reduces mortality rate in a rodent model of dietary obesity." Obes Res **13**(4): 693-702.
- Vickers, M. H., S. Reddy, et al. (2001). "Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming." J Endocrinol **170**(2): 323-32.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, et al. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." N Engl J Med **360**(15): 1518-25.
- Wagner, K. D. and N. Wagner (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions." Pharmacol Ther **125**(3): 423-35.
- Wang, Y. X., C. H. Lee, et al. (2003). "Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity." Cell **113**(2): 159-70.
- Wassink, A. M., J. K. Olijhoek, et al. (2007). "The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences." Eur J Clin Invest **37**(1): 8-17.
- Wewege, M., R. van den Berg, et al. (2017). "The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis." Obes Rev **18**(6): 635-646.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, et al. (2012). "BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions." Cell **149**(4): 871-85.
- WHO (2000). Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. .
- Wingfield, H. L., A. E. Smith-Ryan, et al. (2015). "The acute effect of exercise modality and nutrition manipulations on post-exercise resting energy expenditure and respiratory exchange ratio in women: a randomized trial." Sports Med Open **1**(1): 11.
- Wintour, E. M. and B. A. Henry (2006). "Glycerol transport: an additional target for obesity therapy?" Trends Endocrinol Metab **17**(3): 77-8.

- Wronska, A. and Z. Kmiec (2012). "Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots." Acta Physiol (Oxf) **205**(2): 194-208.
- Wu, J., P. Bostrom, et al. (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." Cell **150**(2): 366-76.
- Wu, J., P. Cohen, et al. (2013). "Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?" Genes Dev **27**(3): 234-50.
- Wu, M. V., G. Bikopoulos, et al. (2014). "Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high-fat diet and endurance training in rats: Impact on whole-body energy expenditure." J Biol Chem.
- Xiao, C., M. Goldgof, et al. (2015). "Anti-obesity and metabolic efficacy of the beta3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22 degrees C." Obesity (Silver Spring) **23**(7): 1450-9.
- Xue, B., J. S. Rim, et al. (2007). "Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat." J Lipid Res **48**(1): 41-51.
- Young, P., J. R. Arch, et al. (1984). "Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse." FEBS Lett **167**(1): 10-4.
- Zarzuelo, M. J., R. Jimenez, et al. (2011). "Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor-beta activation in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **58**(4): 733-43.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.
- Zhou, Z., S. Yon Toh, et al. (2003). "Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity." Nat Genet **35**(1): 49-56.

APÊNDICE – Comprovantes de publicação de artigos científicos



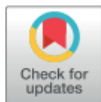
RESEARCH ARTICLE

Differential actions of PPAR- α and PPAR- β/δ on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice

Tamiris Lima Rachid, Flavia Maria Silva-Veiga, Francielle Graus-Nunes, Isabele Brighenti, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello*

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* souzamello.uerj@gmail.com





Molecular and Cellular Endocrinology

Volume 474, 15 October 2018, Pages 227-237



GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice

Flavia Maria Silva-Veiga, Tamiris Lima Rachid, Letícia de Oliveira, Francielle Graus-Nunes, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello   

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.013>

[Get rights and content](#)



Biochimie

Volume 140, September 2017, Pages 106-116



Research paper

Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-*alpha* agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice

Flavia Maria Silva Veiga ¹, Francielle Graus-Nunes ¹, Tamiris Lima Rachid, Aline Barcellos Barreto, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello   

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.003>

[Get rights and content](#)



[Endocrine](#)

March 2017, Volume 55, [Issue 3](#), pp 786–798 | [Cite as](#)

AT₁ receptor antagonist induces thermogenic beige adipocytes in the inguinal white adipose tissue of obese mice

Authors

Authors and affiliations

Francielle Graus-Nunes ¹
Tamiris Lima Rachid ¹
Felipe de Oliveira Santos ¹
Sandra Barbosa-da-Silva ¹
Vanessa Souza-Mello ¹
[Email author](#)
[View author's OrcID profile](#)

1. Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular disease, Biomedical Centre, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



Review

Beneficial effects of the Mediterranean spices and aromas on non-alcoholic fatty liver disease

Laura Baselga-Escudero ^{a, 1}, Vanessa Souza-Mello ^{b, 1}, Aïda Pascual-Serrano ^c, Tamiris Rachid ^b, Adriana Voci ^d, Ilaria Demori ^d, Elena Grasselli ^{d, e}  

^a Grup de Recerca en Nutrició i Salut (GRNS), EURECAT-CTNS, Reus, Spain

^b Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

^c Nutrigenomic Research Group, Department of Biochemistry and Biotechnology, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

^d DISTAV, Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova, Genova, Italy

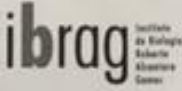
^e Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma, Italy

Received 8 June 2016, Revised 18 November 2016, Accepted 22 November 2016, Available online 6 January 2017.

ANEXO - Comitê de ética em experimentação animal



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

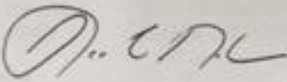


CERTIFICADO

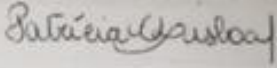
Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos singulares do PPAR- α e do PPAR- β/δ sobre a termogênese e Plasticidade do tecido adiposo branco-marrom de camundongos obesos", registrada com o nº 34/2016, sob a responsabilidade de Vanessa de Souza Mello - que envolve a produção, manutenção ou utilização 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 26/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos C57Bl/6
Nº de animais	60
Peso/Idade	20 g / 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Julho de 2016.



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



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

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>
ceua.ibrag@yahoo.com.br