



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

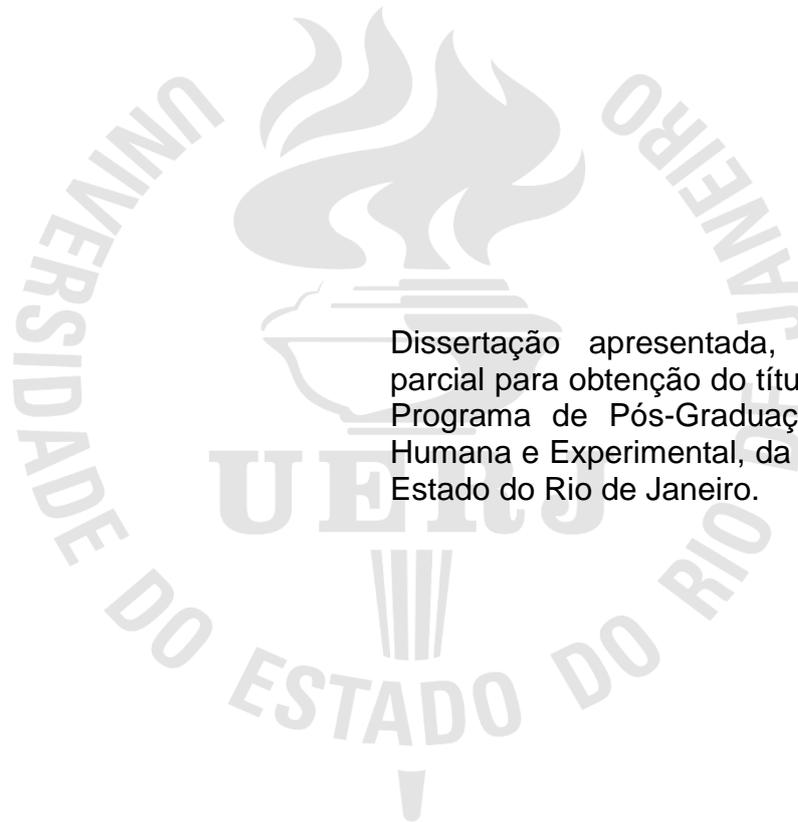
Camilla Rangel Azevedo

**Efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do  
tecido adiposo marrom**

Rio de Janeiro  
2021

Camilla Rangel Azevedo

**Efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do tecido  
adiposo marrom**



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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Souza-Mello

Rio de Janeiro

2021

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

A994 Azevedo, Camilla Rangel.  
Efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do tecido adiposo marrom / Camilla Rangel Azevedo. – 2021.  
80f.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Souza Mello  
  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.  
  
1. Tecido adiposo marrom – Teses. 2. Termogênese - Teses. 3. Obesidade - Teses. 4. Dieta hiperlipídica - Teses. I. Mello, Vanessa Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.  
  
CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Camilla Rangel Azevedo

**Efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do tecido  
adiposo marrom**

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

Aprovada em 06 de agosto de 2021.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Souza-Mello (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

A minha mãe por nunca medir esforços para me ver feliz e me dar todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional, sendo a pessoa que mais acredita em mim, e a minha família pelo apoio diário e todo amor dedicado.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe por ser a maior vitoriosa e meu maior exemplo, por me amar incondicionalmente e por ter batalhado duro para me ver crescendo e realizando meus sonhos.

Ao meu pai por sempre ter sido um parceiro e sempre estar ali nos momentos difíceis me ajudando a superar as situações de dificuldade.

Agradeço ao meu irmão, que mesmo não estando mais presente fisicamente, todos os dias nos ensina uma lição e nos mostra o quão forte somos. Agradeço a você por todos os anos que tive a honra de conviver ao teu lado. Nessa conquista tem muito de você. Amo vocês incondicionalmente e sou grata por tudo que fizeram e fazem por mim.

Ao meu tio Famarion por ter sido um segundo pai pra mim, sempre sendo o maior incentivador da minha carreira, e as minhas primas Carolina e Luciana por sempre apoiarem meus estudos, por serem carinhosas e amorosas comigo. Quero ser um exemplo para o meu afilhado Rafael assim como elas foram um exemplo pra mim, participando do crescimento dele e estando presente nos momentos em que ele mais precisar. Ao meu primo Carlos por sempre estar presente me ajudando e me divertindo, sendo o melhor professor de xadrez que eu conheço. Sou muito grata ao universo pela minha família, eu os amo incondicionalmente e eu não escolheria nenhuma outra família no mundo. Agradeço toda minha família que participou da minha formação e contribuiu com a formação do meu caráter.

À família da Tia Monica e Tio Pascoal por estarem ao nosso lado no momento mais difícil das nossas vidas e por serem amigos bons e verdadeiros.

Agradeço aos mestres que passaram pela minha vida e despertaram em mim a vontade de ser professora/pesquisadora e compartilhar o conhecimento de forma bondosa, fácil e apaixonante assim como eles fazem.

Em primeiro momento, agradeço à professora Vanessa Souza-Mello por toda paixão no que faz e por tornar tudo mais fácil e tranquilo, por ter sido uma grande conselheira e por ter acreditado no meu crescimento tanto pessoal quanto profissional.

Agradeço aos professores Luciana Miragaya, Olivia Fraga e João Portella, por despertarem minha paixão pela odontologia, por mostrarem a odontologia de forma apaixonante e transformadora na vida das pessoas, por todos os conselhos, por todos os momentos de descontração, por todas as clínicas em que aprender com vocês era

pura diversão. Obrigada por me defenderem quando eu precisei, pelo ombro amigo em momentos difíceis e por cada risada que vocês arrancam dos seus alunos de forma fácil. Vocês são minhas maiores inspirações e um dia eu quero poder transformar a vida de diversos alunos como vocês fazem. Obrigada por serem uma grande referência na minha vida e por acreditarem em mim e na minha caminhada. Obrigada por inspirarem tantos alunos, que assim como eu, se encontraram na odontologia graças à oportunidade de aprender com vocês. A equipe de prótese fixa é uma das mais legais da faculdade.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Luciana Lucena, Maria Beatriz Olinto, Gabrielle Brito, Ana Alice Rodrigues, Carlos Alexandre, Caroline Martins, Victor Hugo. Agradeço a todos os meus amigos, que mesmo não citados aqui, contribuem para que eu tenha uma rede de apoio segura e que eu sempre saiba que eu tenho com quem contar. Obrigada a todos que me ajudaram, me apoiaram e aos que mesmo não estando mais presentes na minha vida, em algum momento, acrescentaram para que eu seja a pessoa que me tornei hoje.

A minha dupla Brenda, por compartilhar tantos momentos comigo. Os tensos, divertidos, fáceis e difíceis, os áudios de desespero de madrugada e os momentos de alívio. Obrigada por compartilhar essa jornada comigo.

Às Vanessetes Daiana, Caroline, Fabiane, Isabela, Flávia, por terem transformado um ano com tantas dificuldades em algo mais tranquilo e leve de se levar, a nossa união e o apoio de vocês foram fundamentais nesse momento.

À Fabiane Martins por ser uma professora brilhante e por compartilhar seus ensinamentos de forma fácil e acessível, por ser paciente e por todo apoio nessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, pelos ensinamentos e por toda ajuda. Nada seria possível sem vocês, em especial à Aline Penna por toda ajuda e paciência comigo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda por contribuir com o meu crescimento e com o desenvolvimento desse trabalho.

Ao corpo docente que integra o programa de pós-graduação, em especial a Profa. Dra. Sandra Barbosa que sempre está disposta a ajudar os alunos e por todas as trocas com muitas risadas e descontração.

Aos técnicos e funcionários da UERJ por todo suporte oferecido.

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Souza-Mello, que sempre foi paciente, compreensiva e tornou toda essa jornada mais fácil. Ser orientada por ela é um presente e uma honra. Você é uma grande referência na minha vida e obrigada por sempre acreditar em mim, até nos momentos mais difíceis, uma boa parte do que sou hoje tem muito de seus ensinamentos, sua paciência e sua sabedoria. Obrigada por ser tão bondosa. Você é gigante!

E finalmente, à FAPERJ e demais agências de fomento à pesquisa científica, que puderam tornar esse trabalho possível.

Ame tua metamorfose  
Cuide de você seja como for  
Faz do teu jeito  
Sem tropeçar

*Menina Lagarta – Supercombo*

## RESUMO

AZEVEDO, Camilla Rangel. *Efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do tecido adiposo marrom*. 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O consumo excessivo de dieta rica em gordura saturada causa um desequilíbrio na homeostase energética, sendo uma das causas principais para o desenvolvimento da obesidade levando a disfunção dos adipócitos marrons e consequentemente diminuição da capacidade termogênica, com alterações morfofuncionais denominada “*whitening*”. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da cronicidade da dieta hiperlipídica no remodelamento do tecido adiposo marrom, visando elucidar as vias envolvidas nesse processo. Sessenta camundongos C57BL/6 machos (três meses de idade) foram designados aleatoriamente para receber uma dieta de controle (C, 10% de energia como lipídios) ou uma dieta rica em gordura (HF, 50% de energia como lipídios) em tempos de administração de dieta diferentes (12, 16 e 20 semanas, denominados C12, HF12, C16, HF16, C20 e HF20). Os animais do grupo HF apresentaram sobrepeso, intolerância oral à glicose, acúmulo substancial de gordura intra-abdominal e subcutânea. Além disso, os animais dos grupos HF apresentaram disfunção dos adipócitos marrons com perda da capacidade termogênica, aumento da expressão de marcadores da rarefação vascular, apoptose e inflamação. Essas alterações funcionais foram acompanhadas por mudança morfológica dos adipócitos marrons que apresentaram aumento da gotícula lipídica caracterizando o *whitening* desse tecido. Em conclusão, a dieta HF causou disfunção dos adipócitos marrons (*whitening*) após 12, 16 e 20 semanas. O aumento do tamanho da gotícula lipídica fez com que o adipócito marrom assumisse um arranjo mais próximo ao adipócito branco (unilocular), com consequente redução da sua capacidade termogênica. A inflamação e o estresse do retículo endoplasmático parecem mediar as modificações estruturais e funcionais do tecido adiposo marrom na obesidade.

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

## ABSTRACT

AZEVEDO, Camilla Rangel. *Effects of high-fat diet chronicity on the remodeling of brown adipose tissue*. 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Excessive intake of a diet rich in saturated fat causes an imbalance in energy homeostasis, being one of the main causes for obesity onset, leading to dysfunction of brown adipocytes and, consequently, a decrease in thermogenic capacity, with morphological and functional alterations called whitening. The present study aimed to evaluate the effects of the chronicity of the high-fat diet on brown adipose tissue remodeling, aiming to elucidate the pathways involved in this process. Sixty male C57BL/6 mice (three months old) were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% energy as lipids) or a high-fat diet (HF, 50% energy as lipids) for 12, 16 or 20 weeks (C12, HF12, C16, HF16, C20 and HF20). The animals in the HF groups had overweight, oral glucose intolerance, and substantial accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat pads. Furthermore, the animals in the HF groups showed brown adipocyte dysfunction with loss of thermogenic capacity, increased expression of vascular rarefaction, inflammation, and apoptotic markers. These functional changes were accompanied by morphological alterations in brown adipocytes that showed an increase in the lipid droplet size, characterizing the whitening of this tissue. In conclusion, the HF diet caused brown adipocyte dysfunction (whitening) after 12, 16 and 20 weeks. The increase in the size of the lipid droplet caused the brown adipocyte to assume a closer arrangement to the white (unilocular) adipocyte, with a consequent reduction in its thermogenic capacity. Inflammation and endoplasmic reticulum stress appear to mediate structural and functional changes in brown adipose tissue in obesity.

Keywords: Brown adipose tissue. Whitening. Obesity. Thermogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eutrofia x Obesidade (transição nutricional) .....	19
Figura 2 - A obesidade e suas comorbidades .....	20
Figura 3 - Comorbidades associadas ao diagnóstico da síndrome metabólica.....	21
Figura 4 - Dieta normolipídica x dieta hiperlipídica .....	26
Figura 5 - Representação esquemática dos adipócitos.....	29
Figura 6 - Desenho experimental .....	41
Figura 7 - Ganho ponderal e Ingestão energética .....	50
Figura 8 - Teste oral de tolerância à glicose, área sob a curva e insulina .....	51
Figura 9 - Distribuição de gordura e Leptina .....	52
Figura 10 - Microscopia de Luz .....	53
Figura 11 - Densidade numérica de núcleo por área .....	54
Figura 12 - Quociente respiratório e gasto energético .....	55
Figura 13 - Imunofluorescência e termografia .....	56
Figura 14 - Expressão Gênica: Marcadores termogênicos .....	58
Figura 15 - Expressão Gênica: batocinas .....	59
Figura 16 - Genes marcadores da inflamação e apoptose.....	60
Figura 17 - Expressão Gênica: Marcadores do estresse do RE.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferença entre os adipócitos brancos, marrons e beges .....	29
Tabela 2 - Composição nutricional das dietas experimentais .....	42
Tabela 3 - Detalhamento dos primers utilizados .....	48
Tabela 4 - Massa corporal inicial, final, FIRI e temperatura .....	50

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ASC	Área sob a curva do TOTG
ATP	Adenosina trifosfato
Bmp8	Bone morphogenetic protein
C	Grupo alimentado com dieta controle
cDNA	DNA complementar
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DIO	Obesidade induzida por dieta
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
ERE	Estresse do Retículo endoplasmático
FIRI	Índice de resistência à insulina em jejum
GE	Gasto energético
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (High-fat)
IMC	Índice de massa corporal
MC	Massa corporal
Nlpr3	Domínio pirina da família NLR contendo 3
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLIN1	Perilipina 1
PPAR $\alpha$	Receptores ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
QA	Densidade numérica de núcleos por área
q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
QR	Quociente respiratório
RE	Retículo Endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro

SM	Síndrome metabólica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilgliceróis
TAMi	Tecido adiposo interescapular
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
UCP1	Proteína desacopladora 1
VCO <sub>2</sub>	Volume de gás carbônico produzido
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VO <sub>2</sub>	Volume de oxigênio consumido

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1. Obesidade .....	18
1.2. Dieta hiperlipídica .....	23
1.3. Tecido adiposo .....	26
1.4. Tecido adiposo marrom .....	30
1.5. Termogênes e batocinas .....	32
1.6. <i>Whitening</i> .....	36
2. OBJETIVOS .....	39
2.1. Objetivo Geral .....	39
2.2. Objetivos Específicos .....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
3.1. Animais e Dieta .....	40
3.2. Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal .....	42
3.3. Teste oral de tolerância à glicose .....	43
3.4. Calorimetria indireta .....	43
3.5. Termografia .....	44
3.6. Eutanásia .....	44
3.7. Análise plasmática .....	45
3.8. Microscopia de luz e estereologia .....	45
3.9. Microscopia confocal .....	46
3.10. PCR quantitativo em tempo real .....	47
3.11. Análise estatística .....	48
4. RESULTADOS .....	49
4.1. Ganho ponderal e ingestão energética .....	49
4.2. Metabolismo de carboidratos .....	50
4.3. Distribuição de gordura e leptina plasmática .....	52
4.4. Microscopia de luz e densidade numérica de núcleos por área .....	53
4.5. Quociente respiratório e gasto energético .....	54
4.6. Imunofluorescência e termografia .....	55
4.7. PCR quantitativo em tempo real .....	57
4.7.1. <u>Expressão Gênica: Marcadores termogênicos</u> .....	57

4.7.2. <u>Expressão Gênica: Batocinas</u> .....	58
4.7.3. <u>Expressão Gênica: Marcadores inflamatórios</u> .....	60
4.7.4. <u>Expressão Gênica: Marcadores do estresse do RE</u> .....	61
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
<b>ANEXO A- Comitê de ética</b> .....	79
<b>ANEXO B – Artigo publicado</b> .....	80

## INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença de caráter epidêmico no mundo, podendo-se observar sua prevalência crescente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Bhurosy e Jeewon, 2014). Mudanças alimentares fizeram com que o consumo de açúcares refinados em alimentos e bebidas aumentasse de forma preocupante nas últimas décadas, colaborando para a atual epidemia de obesidade e doenças cardiometabólicas (Bray e Popkin, 2014). A ingestão de gordura na dieta também está associada com o aumento da adiposidade, induzindo a obesidade (Hariri e Thibault, 2010).

A presença da obesidade aumenta o risco de comorbidades por doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), esteatose hepática e alguns tipos de câncer (Niswender, 2010; Hruby e Hu, 2015). Nota-se que alguns fatores etiológicos associados, como mudança do comportamento alimentar, estilo de vida, consumo de alimentos processados e sedentarismo, levam ao desenvolvimento do quadro de obesidade (Swinburn *et al.*, 2011; Seidell e Halberstadt, 2015). O acúmulo excessivo de gordura corporal na obesidade, especialmente o intra-abdominal, está relacionado à resistência à insulina (RI) e ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) em humanos (Fall e Ingelsson, 2014).

O consumo excessivo de gordura saturada promove uma desordem na homeostase energética e se associa com o aumento da massa corporal (MC) (Kapoor e Anand, 2002; Raatz *et al.*, 2017), promovendo uma disfuncionalidade do tecido adiposo (Magdalon e Festuccia, 2017). O ganho de MC gera hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, secreção de adipocinas alteradas, reduzindo a sensibilidade à insulina e modificando o perfil de células imunes residentes do tecido adiposo (TA), resultando em inflamação crônica de baixo grau (Mathis, 2013). A descoberta que uma fração de humanos adultos apresenta tecido adiposo marrom (TAM) ativo fez com que estudos experimentais, que ambicionam desvendar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade, ganhassem relevância científica (Nedergaard *et al.*, 2007).

O TAM, composto ultraestruturalmente por muitas mitocôndrias que conferem a coloração amarronzada do tecido, tem a proteína desacopladora-1 (UCP1 ou termogenina) como um dos principais marcadores para a sua identificação e atividade

termogênica (Langin 2010). Em comparação com o tecido adiposo branco (TAB), os adipócitos marrons são menores e possuem várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos (multilocular), seu citoplasma é relativamente abundante, seu núcleo esférico é levemente excêntrico e a grande quantidade de mitocôndrias produz energia através da oxidação de ácidos (Nedergaard *et al.*, 2007).

A ingestão crônica de dieta hiperlipídica (*High-fat*, HF) por roedores é capaz de gerar um remodelamento adverso do TAM conhecido como “*whitening*” (branqueamento), caracterizado pelo predomínio de inclusões lipídicas grandes no TAM, causado por uma rarefação vascular e disfunção mitocondrial. Conseqüentemente, há prejuízo da atividade termogênica, além do favorecimento da inflamação e da RI (Shimizu e Walsh, 2015).

A presença de aproximadamente 63g de TAM termogenicamente ativo na região cervical de humanos adultos é capaz de evitar o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano (Virtanen *et al.*, 2009). Logo, a disfunção do TAM (*whitening*) pode exercer um papel crucial na gênese da obesidade. Essa constatação estimula estudos para elucidar as vias envolvidas no “*whitening*” do TAM, bem como os efeitos da cronicidade da dieta HF nas modificações estruturais e moleculares desse tecido no sentido de propor estratégias mais eficazes para aumento da termogênese e controle da obesidade e de comorbidades como o DM2, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e DCV (Poher *et al.*, 2015).

A hipótese do presente estudo é que a dieta HF reduza a capacidade termogênica do TAM e produza “*whitening*” desse tecido, com perda da multilocularidade característica e rarefação da vascularização, de maneira tempo dependente.

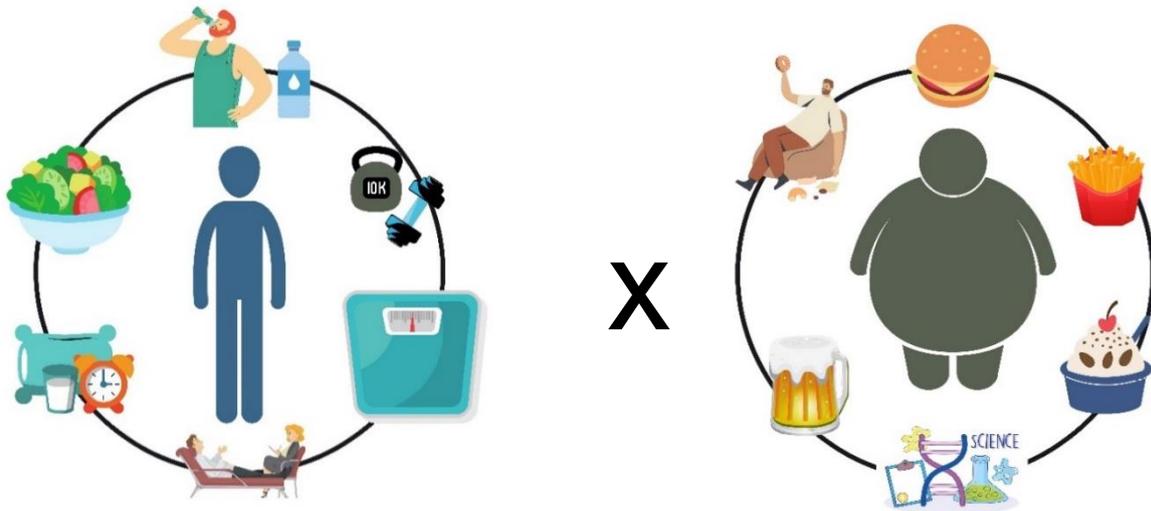
## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Obesidade

A obesidade sendo vista como um problema de saúde pública é algo consideravelmente recente. Em um determinado período da história, foi observada a escassez de alimentos por longos períodos, e este fato teve como consequência a concepção de que os indivíduos considerados saudáveis seriam aqueles que apresentavam um aumento da MC (Eknoyan, 2006).

Os avanços tecnológicos ao longo da história promoveram mudanças na composição, no custo financeiro e no acesso especialmente a alimentos à base de cereais. A ingestão de alimentos com alto teor de energia e pobre em nutrientes teve um crescimento drástico, sendo esses alguns dos fatores que contribuíram para o aumento dramático da obesidade nos últimos 30-40 anos (Morris *et al.*, 2015). Nota-se, nas últimas décadas, uma mudança no padrão dietético que levou à chamada transição nutricional (Figura 1), onde mudanças quantitativas e qualitativas da dieta desencadearam no aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (Kapoor e Anand, 2002; Hruby e Hu, 2015) atrelado a uma crescente prevalência mundial de obesidade (Swinburn *et al.*, 2011) devido ao consumo excessivo de gordura saturada e de açúcares associado ao sedentarismo (Astrup e Brand-Miller, 2012).

Figura 1 - Eutrofia X Obesidade (transição nutricional)

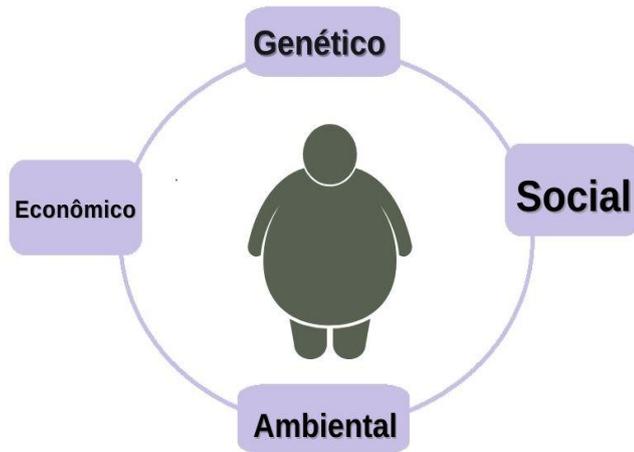


Legenda: Esquema representativo de fatores que podem atenuar a obesidade como uma alimentação adequada, atividade física e sono adequado. À direita, demonstramos fatores que podem promover a obesidade como alimentação baseada em bebidas açucaradas e *fast-food*, sedentarismo, estresse e fatores genéticos.

Fonte: A autora, 2021.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é considerada uma condição de caráter multifatorial onde temos um quadro em que a ingestão energética é maior que o gasto energético (GE) por um longo período de tempo, resultando em um balanço energético positivo que gera um acúmulo excessivo de gordura corporal associado a riscos para a saúde com complicações metabólicas (2000). Alguns fatores relacionados a obesidade são: genéticos, econômicos, sociais, ambientais, entre outros (2000) (Figura 2). O aumento da MC total por um período crônico pode favorecer o desenvolvimento do sobrepeso e, posteriormente, obesidade (Dunham-Snary e Ballinger, 2013).

Figura 2- A obesidade e suas comorbidades



Legenda: Esquema representativo de fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade.  
Fonte: A autora, 2021.

Dados atuais mostram que um total de 1,9 bilhão e 609 milhões de adultos apresentaram sobrepeso e obesidade, respectivamente, representando aproximadamente 39% da população mundial maior de 18 anos. A prevalência de excesso de peso aumentou de 25,5% em 1980 para 39,0% em 2015, representando um aumento de quase 50% nos últimos 35 anos (Chooi *et al.*, 2019). Além disso, a obesidade também está associada com o maior risco de desenvolvimento de dislipidemias, DCV e DM2 (Alberti *et al.*, 2005). Os números crescentes de indivíduos com sobrepeso e obesidade passaram a onerar o sistema de saúde pública devido ao aumento de doenças associadas a esse quadro, gerando redução na expectativa de vida em até oito anos (Swinburn *et al.*, 2011). Essas comorbidades atingem uma parcela cada vez mais significativa da população e incluem maior propensão ao desenvolvimento de mais de dez tipos de câncer, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Martins, 2018).

No Brasil, o aumento 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 2020 mostram que 55,4%, dos adultos apresentam excesso de peso, sendo ligeiramente maior entre homens (57,1%) do que entre mulheres (53,9%). Com relação à obesidade, 20,3% da população adulta apresenta obesidade, sendo semelhante entre homens e mulheres (BRASIL, 2020).

A obesidade promove um desequilíbrio na homeostase corporal, desencadeando hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos brancos (Magliano *et al.*, 2013; Rachid *et al.*, 2015). Na obesidade, as massas de gordura subcutânea e intra-abdominal encontram-se maiores devido ao aumento do percentual de gordura corporal total. Contudo, a hiperplasia ocorre principalmente no tecido adiposo subcutâneo (TABs), enquanto a hipertrofia das células adiposas ocorre tanto no compartimento intra-abdominal quanto no subcutâneo (Engin, 2017).

Enquanto doença inflamatória crônica, a obesidade está associada ao potencial de secreção de citocinas pelo TA, desencadeando infiltração de macrófagos que apresentam um fenótipo pró-inflamatório (M1) (Tilg e Moschen, 2006). A primeira molécula relacionada à obesidade e inflamação foi o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), citocina essa que foi encontrada com uma elevada expressão no TA de roedores em um modelo experimental de obesidade (Hotamisligil *et al.*, 1993). Diversas outras citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-6, são significativamente expressas na obesidade (Lafontan e Girard, 2008).

A secreção dessas citocinas desencadeia um estado inflamatório de baixo grau, induzindo comorbidades a ela associadas, tais como: RI, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), aterosclerose, DCV, DM2 e DHGNA. A associação dessas desordens à um indivíduo configura o quadro de SM (Figura 3) que tem como principal fator desencadeante a obesidade (Eckel *et al.*, 2005).

Figura 3 – Comorbidades associadas ao diagnóstico da síndrome metabólica



Fonte: A autora, 2021.

A leptina é uma adipocina que se encontra elevada na presença da obesidade devido ao aumento da massa adiposa, caracterizando a hiperleptinemia. Tal fato promove uma desregulação do eixo adipoinsular, gerando uma perda da capacidade supressora da leptina sobre a secreção de insulina pela célula beta pancreática, levando ao quadro de hiperinsulinemia e RI (Vickers *et al.*, 2001).

Para avaliar o grau de obesidade, utiliza-se com maior frequência o método de diagnóstico do Índice de Massa Corporal (IMC) ( $\text{IMC} = \text{peso em kg} / \text{altura em m}^2$ ), tendo como vantagem a possibilidade de interpretação em correlação com dados de referência nacionais dos níveis de adiposidade, morbidade e mortalidade em adultos (Lo *et al.*, 2016). A utilização de indicadores adicionais para avaliar a adiposidade central em pessoas com sobrepeso e obesidade são indicados devido ao fato de que o IMC não fornece informações sobre a composição corporal e quantidade de massa livre de gordura ou massa gorda em relação ao peso corporal (Wells e Fewtrell, 2006).

A pandemia da doença causada pelo coronavírus 2019, COVID-19 (sigla em inglês para *coronavirus disease 2019*), teve seu reconhecimento pela OMS no dia 11 de março de 2020 (Malta *et al.*, 2020). Embora seja uma doença de caráter respiratório, ela pode afetar também órgãos como rins, fígado, coração entre outros (Dinakaran *et al.*, 2020). A atual pandemia desafia os sistemas de saúde em todo mundo e encontra-se relatos que apontam que a obesidade é uma das condições que aumentam exponencialmente o risco de mortalidade quando associada ao coronavírus (Petrakis *et al.*, 2020).

Atualmente, com base nas informações disponíveis a respeito do coronavírus, observa-se a obesidade severa (ou seja,  $\text{IMC} \geq 40 \text{kg/m}^2$ ) correlacionada a um pior prognóstico, estando associada a alta mortalidade em pacientes com coronavírus. Entretanto, qualquer outro grau de obesidade também está correlacionado a prognósticos ruins em pacientes portadores da doença mencionada anteriormente (Petrakis *et al.*, 2020).

A hipótese mais disseminada é de que a síndrome respiratória aguda pelo coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é causada devido a capacidade do vírus de penetrar nas células humanas por meio de ligação direta com receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) na superfície celular. Com isso, pacientes com certo grau de obesidade apresentam RI e hiperatividade do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA), gerando resultados piores na infecção por COVID-19. A expressão de ECA2 no TA encontra-se elevada quando comparada ao pulmão que é

um dos principais órgãos-alvo afetados pela COVID-19, sugerindo uma maior vulnerabilidade do TA à infecção pelo vírus (Sanchis-Gomar *et al.*, 2020).

Nesse contexto, estratégias de combate à obesidade e transtornos relacionados classificam-se em: mudança de estilo de vida, terapia farmacológica e cirurgia bariátrica (Haslam, 2016). Mudanças no estilo de vida estão relacionadas a mudanças comportamentais, dieta e atividade física (Wadden *et al.*, 2003). Dessa forma, a perda ponderal é o principal fator para o tratamento da obesidade, reduzindo o risco de diversas comorbidades associadas a esta doença. A redução da MC se dá devido ao controle da ingestão energética, levando a uma diminuição do aporte lipídico e a menor metabolização de nutrientes associada à atividade física regular (McNeel e Mersmann, 2005). O processo de emagrecimento está diretamente relacionado a um balanço energético negativo, sendo caracterizado pela redução da ingestão alimentar em relação ao GE (Lowell e Spiegelman, 2000).

## 1.2. Dieta hiperlipídica

Uma das principais causas para o desenvolvimento da obesidade é o consumo excessivo de gordura saturada, que por sua vez, é capaz de promover desequilíbrio da homeostase energética (Silva-Veiga *et al.*, 2018). A necessidade de processamento e armazenamento de lipídios implica no funcionamento dos adipócitos, incluindo hipertrofia, secreção alterada de adipocinas com predomínio de um perfil pró-inflamatório, RI, maior produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação de baixo grau e estresse do retículo endoplasmático (Hummasti e Hotamisligil, 2010).

O consumo excessivo de gordura saturada leva a um aumento no nível de ácidos graxos (AG), facilitando a lipogênese e maiores taxas de lipólise no TA, gerando um acúmulo ectópico de gordura. Tal fato amplia os efeitos deletérios da obesidade como a esteatose hepática, dislipidemias, hiperglicemia, dentre outros (De Minicis *et al.*, 2013). Além disso, há um declínio da função das células beta pancreáticas, sendo um prenunciador do DM2 (Eckel *et al.*, 2005; Souza-Mello *et al.*, 2011).

A glicose obtida através da alimentação estimula a secreção pancreática de insulina, que atua como regulador fundamental dos processos celulares anabólicos durante o estado de alimentação, gerando um equilíbrio nos níveis de glicose no sangue para manter o estado de energia sistêmica. A ingestão de alimentos ricos em gorduras de forma crônica é capaz de gerar uma meta-inflamação, levando a alterações como redução da sensibilidade à insulina e secreção de insulina estimulada por glicose (Nagy e Einwallner, 2018).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial para o dobramento e montagem de proteínas secretoras e de membrana. Sugere-se que a dieta rica em gordura saturada pode promover maior estresse do RE (ERE), que ocorre quando a demanda celular para o enovelamento de proteínas ultrapassa a capacidade do RE de maturar essas proteínas, levando a um acúmulo de proteínas não dobradas, desencadeando inflamação e esteatose hepática de forma mais proeminente que o excesso de ácido graxo poliinsaturado (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2021). Há evidências crescentes de inflamação de baixo grau cronicamente ativada na obesidade induzida por dieta (DIO), sendo um fenômeno recente denominado de inflamação desencadeada metabolicamente (meta-inflamação) (Zhao *et al.*, 2013).

Estudos com animais demonstram que a ingestão contínua de uma dieta rica em gordura saturada promove danos metabólicos semelhantes em humanos quando desenvolvem excesso de peso. Animais submetidos a dieta rica em gordura apresentam aumento progressivo do ERE, produzindo um aumento da disfunção mitocondrial, dano ao DNA mitocondrial e estresse oxidativo, levando ao um quadro de degradação de proteínas e autofagia (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2021).

O consumo excessivo de alimentos ricos em gordura gera um quadro de obesidade abdominal, hipertensão, homeostase irregular de glicose, RI, DM2 e dislipidemia com graus elevados de triacilgliceróis (TAGs) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), levando ao quadro de síndrome metabólica causada pela dieta, ocasionando efeitos negativos na modulação do gasto energético (Raatz *et al.*, 2017).

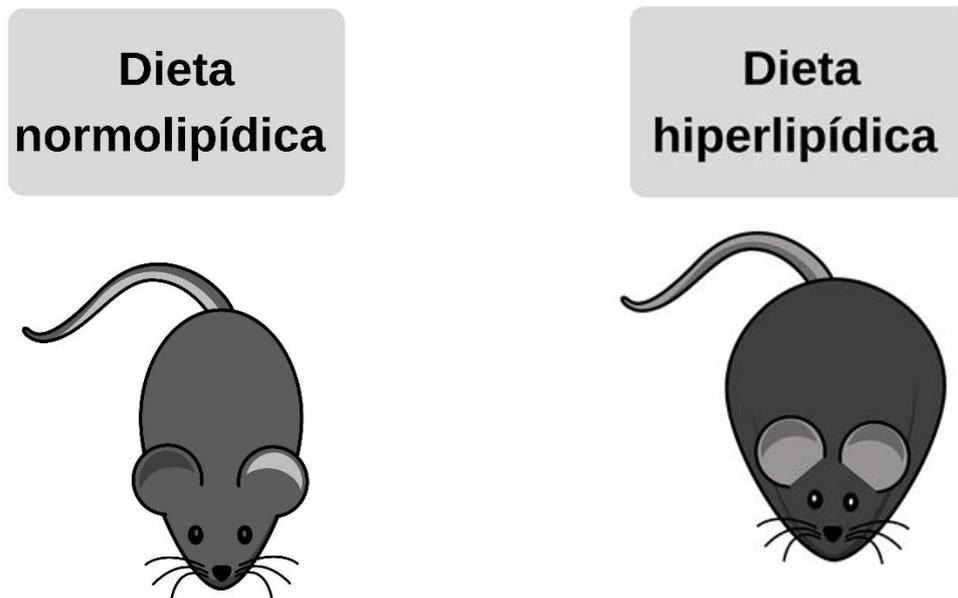
Estudos mostram que a substituição da gordura saturada por gordura poliinsaturada é capaz de evitar eventos coronários em humanos. Terapias dietéticas atuam como uma ferramenta importante para a redução de DCV. Quando as gorduras saturadas ou trans-insaturadas são substituídas por gorduras monoinsaturadas ou poliinsaturadas ocorre a diminuição da LDL. Entretanto, dietas que usam carboidratos como substituição de gorduras saturadas, numa dieta de baixo teor de gordura, a LDL

e a lipoproteína de alta densidade (HDL) diminuem igualmente; enquanto os TAGs aumentam com o aumento de carboidratos (Hooper *et al.*, 2020). Os ácidos graxos são a forma energética circulante mais comumente encontrada, enquanto os TAG são a forma mais comumente encontradas de armazenamento de AG (Nguyen *et al.*, 2008).

A composição de AG da dieta é capaz de estimular a termogênese do TAM durante a hiperfagia voluntária com dietas HF. Uma dieta rica em AG poliinsaturados resulta na estimulação preferencial da atividade termogênica no TAM (Mercer e Trayhurn, 1987). Os altos níveis de gordura saturada na dieta estão associados a concentrações sanguíneas de LDL elevadas, um fator de risco estabelecido para DCV (Khaw *et al.*, 2018). A ingestão dietética de gordura saturada também apresenta associação com disfunção tireoidiana significativa e morfologia anormal em modelos experimentais (Shao *et al.*, 2014). Alterações na microbiota intestinal também são observadas no consumo de dieta rica em gordura saturada, promovendo disbiose e aumento da permeabilidade intestinal (Volynets *et al.*, 2017).

O modelo de camundongo C57BL/6 obeso induzido por dieta (Figura 4) é amplamente utilizado, pois replica vários aspectos do fenótipo diabético (Hull *et al.*, 2017). Animais que fazem ingestão ininterrupta de dieta HF apresenta danos metabólicos (Catta-Preta *et al.*, 2012) tipicamente visto em humanos obesos (Hull *et al.*, 2017). Esta cepa é propensa ao aumento do peso corporal, acúmulo de gordura e interrupções no metabolismo da glicose quando alimentada com uma dieta HF (Airaksinen *et al.*, 2018).

Figura 4 - Dieta normolipídica x dieta hiperlipídica



Legenda: Esquema representativo de camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com diferentes tipos de dieta. À esquerda, camundongo C57BL/6 alimentado com dieta normolipídica, que permanece magro e fisicamente normal. À direita, camundongo C57BL/6 alimentado com dieta hiperlipídica, apresentando obesidade induzida por dieta.

Fonte: A autora, 2021.

### 1.3. Tecido adiposo

Uma das funções do TA é a manutenção do equilíbrio energético, o que implica na gênese da obesidade. O TA tem células especializadas no desempenho de funções reguladoras na homeostase denominadas adipócitos (Gesta *et al.*, 2007). Dois tipos de tecido adiposo são tradicionalmente descritos em mamíferos devido as suas posições anatômicas específicas, estruturas morfológicas e funções que são: TAB e TAM (Gesta *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2014)

Tanto em roedores quanto em humanos existem ambos os tecidos. Os adipócitos do TAB apresentam uma característica unilocular (reserva de uma única e macro gotícula de gordura), encontrando-se distribuído pelo corpo em maior quantidade. O TAM, por sua vez, encontra-se em menor quantidade e em locais

específicos, apresentando como característica adipócitos multiloculares e reserva de gordura em micro gotículas (Kolditz e Langin, 2010).

Os adipócitos são as únicas células especializadas em armazenar lipídios, sem comprometer a sua integridade funcional, possuindo uma maquinaria enzimática necessária para a síntese de AG e estoque de TAG (Ahima e Flier, 2000). As lipases irão exercer o papel de hidrólise dos TAG, gerando liberação de glicerol e AGs na corrente sanguínea para serem utilizados, em um processo conhecido como lipólise. (Koppen e Kalkhoven, 2010).

Os adipócitos brancos têm como características metabólicas principais a síntese e reserva de energia na forma de TAG através da lipogênese, possibilitando a mobilização dessa reserva em momentos de necessidade. O balanço energético é o principal regulador dessa mobilização (Kolditz e Langin, 2010). A distinção da origem do tecido adiposo (por exemplo, gonadal ou subcutâneo) gera diferenças na sua capacidade lipolítica ou lipogênica (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). O TAB se desenvolve em locais anatômicos distintos, sendo dividido em depósitos viscerais (ao redor dos órgãos - mesentérico, retroperitoneal, perigonadal e omental) e depósitos subcutâneos (sob a pele e inguinal). Por outro lado, o TAM é encontrado em menores quantidades e em sítios específicos, como a região interescapular de roedores (Lanthier e Leclercq, 2014; Bargut *et al.*, 2017).

Nos humanos, o TAM é visualizado na região interescapular (TAMi), podendo ainda ser encontrado em sítios cervicais, paravertebrais e perirrenais em menor quantidade e tem como função a liberação de energia sob a forma de calor conhecida como termogênese adaptativa, ou seja, produção de calor a partir de energia química (Foster e Frydman, 1978; Langin, 2010).

O sistema nervoso autônomo (SNA) tem atuação direta no TAB, onde o sistema nervoso simpático (SNS) promove ações catabólicas (lipólise) através da estimulação adrenérgica, ativando a enzima lipase hormônio-sensível (Pénicaud *et al.*, 2000). Em contrapartida, o sistema nervoso parassimpático (SNP) promove ações anabólicas através do estímulo de secreção de insulina, elevando a captação de glicose e ácidos graxos que podem ser estocados sob a forma de TAG (Kreier *et al.*, 2002).

Estima-se que os adipócitos brancos maduros correspondam entre um e dois terços do total de células do tecido adiposo branco, onde sua única e macro gotícula ocupa a maior parte do volume celular, com baixa densidade mitocondrial e núcleos periféricamente localizados, levando a um achatamento dos mesmos. Outros

componentes celulares desse tecido compõem a fração vascular estromal: fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células mesenquimais e pré-adipócitos (Lanthier e Leclercq, 2014; Bargut *et al.*, 2017).

A descoberta da leptina fez com que o TAB fosse reconhecido como um órgão metabolicamente ativo e endócrino (Zhang *et al.*, 1994). Os adipócitos, além de responsáveis pelo metabolismo e acúmulo de gordura, também possuem funções secretoras de caráter autócrino, parácrino e endócrino, sendo responsável pela secreção de uma grande variedade de hormônios, citocinas, fatores de crescimento e fatores vasoativos que conjuntamente são denominadas adipocinas (Rodríguez *et al.*, 2015).

O ganho de peso exacerbado promove hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, levando a alteração na secreção de adipocinas (perfil pró-inflamatório), queda da sensibilidade à insulina e mudança no perfil das células imunes residentes no TA, levando a uma inflamação crônica de baixo grau (Mathis, 2013).

O aumento da massa adiposa na obesidade ocorre pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou pelo aumento do seu número (hiperplasia). O maior depósito de gordura e o local de preferência de armazenamento de excesso de lipídios é o compartimento subcutâneo. O aumento do número de adipócitos está relacionado com a capacidade de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, processo esse denominado adipogênese. Entretanto, a capacidade de expansão dos adipócitos é limitada e quando seu crescimento atinge um grau máximo, o acúmulo além do suportado pela célula desencadeia lipólise, podendo resultar em aumento dos ácidos graxos saturados no plasma e acúmulo ectópico em outros órgãos, processo identificado como lipotoxicidade (DeFronzo, 2004; Gustafson *et al.*, 2015).

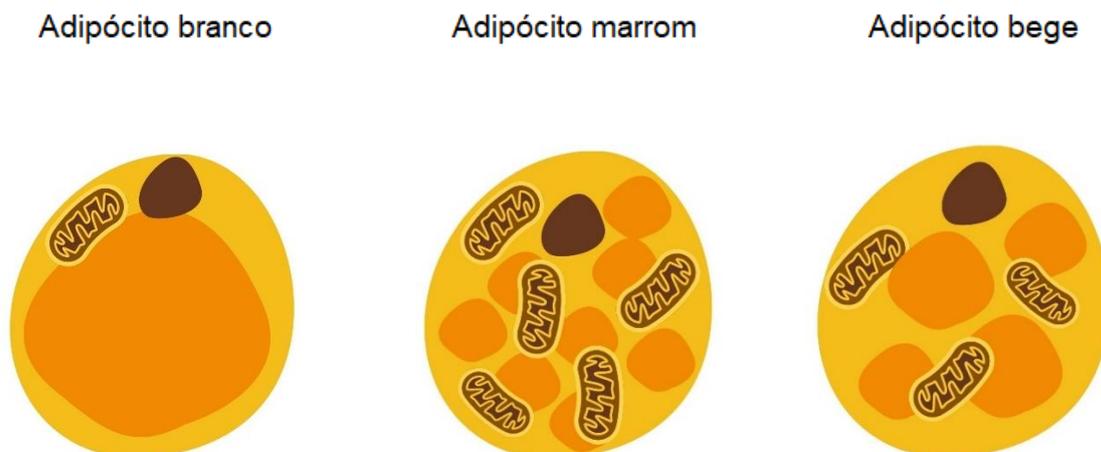
O adipócito bege vem sendo descrito como um novo tipo celular presente no TABs, que possui características fenotípicas e padrão de expressão gênica termogênica semelhante ao TAM. Contudo, suas células estão localizadas em sítios originalmente de tecido adiposo branco, surgindo a partir de diversos estímulos, como por exemplo, tratamentos com agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR)-alfa (Petrovic *et al.*, 2010). A tabela 1 resume as principais diferenças entre os três tipos de adipócitos descritos.

Tabela 1- Diferenças entre os adipócitos brancos, marrons e beges

	Adipócito Branco	Adipócito Marrom	Adipócito Bege
<b>Origem</b>	Células tronco mesenquimais do TAB	Linhagem miogênica (Myf5+)	Transdiferenciação de células tronco mesenquimais do TAB
<b>Função</b>	Armazenamento lipídico	Dissipação de energia química	Termogênese adaptativa
<b>Gotícula lipídica</b>	Unilocular	Multilocular	Multilocular
<b>Densidade Mitochondrial</b>	Baixa	Alta	Média
<b>Localização em Humanos</b>	Subcutânea ou ectópica	<u>Interescapular, cervical, paravertebral e perirenal</u>	Supraclavicular e subcutânea

A denominação bege advém do processo conhecido como amarronzamento (*browning*) que o TABs passa para exibir esse fenótipo intermediário entre um adipócito branco e um marrom. Portanto, os adipócitos beges são células que apresentam um tecido especializado no gasto energético na presença de estímulos, sendo originados frente a estímulo adrenérgico, a partir da transdiferenciação de adipócitos brancos maduros ou da diferenciação a partir de pré-adipocitos beges, não tendo como precursor comum adipócitos marrons (Wu *et al.*, 2013; Gustafson e Smith, 2015). A Figura 5 ilustra os três tipos de adipócitos.

Figura 5 - Representação esquemática dos adipócitos



Legenda: Esquema representativo dos três tipos de adipócitos e suas configurações estruturais.  
Fonte: A autora, 2021.

## 1.4 Tecido adiposo marrom

O TAM tornou-se alvo de interesse após estudos identificarem ativação da UCP1 nas últimas décadas em humanos adultos, sendo possível observar atividade termogênica (produção de calor) nesse tecido (Collins *et al.*, 2004). O TAM é encontrado principalmente em mamíferos pequenos, é ativado pela exposição a baixas temperaturas (por exemplo, 20°C) e sua atividade é estimulada por meios de centros no cérebro, ativando os nervos simpáticos responsáveis pela inervação do tecido.

Através desses nervos ocorre a liberação de norepinefrina que ativa a lipólise nos adipócitos marrons e, sugere-se que através dessa quebra também ocorra a produção de calor via ativação da UCP1. Até 2007 acreditava-se que a presença de TAM ativo em humanos era limitada aos neonatos e que se atrofiava e desaparecia já no final da infância. Entretanto, atualmente já há relatos de gordura marrom em humanos adultos, porém em condições fisiológicas específicas (Nedergaard *et al.*, 2007; Cannon *et al.*, 2020).

A localização clássica do TAM em humanos é na região interescapular, podendo ser encontrado em sítios cervicais, paravertebrais e perirrenais em menor quantidade. Sua origem é a partir das células progenitoras de miócitos (células musculares), chamadas de mioblastos, que expressam o fator miogênico 5 positivo (Myf5+), sendo intensamente vascularizado e innervado pelo SNS (Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Bargut *et al.*, 2017).

Os adipócitos marrons encontram-se compactados com mitocôndrias que contêm UCP1, que ao serem ativadas provocam um gradiente eletroquímico, estimulando a atividade da cadeia respiratória. A UCP1 é um canal alternativo para o retorno dos elétrons para a matriz mitocondrial, a qual não resulta em produção de ATP. Os elétrons que retornam pela UCP1 geram energia sob a forma de calor, desacoplando esse movimento do armazenamento de energia (ATP). O calor, proveniente da combustão de substratos disponíveis que são distribuídos para o resto do corpo por meio da circulação, é liberado e contribui para um balanço energético negativo (Harms e Seale, 2013).

Apresentando menor tamanho quando comparados com adipócitos do TAB, os adipócitos marrons são multiloculares (várias gotículas lipídicas), com citoplasma

relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico, com numerosas mitocôndrias que são responsáveis pela produção de energia através da oxidação de ácidos (Nedergaard *et al.*, 2007).

O TAM desempenha papéis autócrinos, parácrinos e endócrinos. Em seu papel autócrino, ocorre a secreção de proteínas de membrana basal, como colágeno IV e fibronectina (Haraida *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2013). Além do mais, pode sintetizar e secretar adpsina (também conhecida como fator de complemento D), fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento semelhante a insulina I, prostaglandinas e adenosina (White *et al.*, 1992; Yamashita *et al.*, 1994).

Em sua função parácrina, o tecido adiposo marrom pode secretar o fator de crescimento nervoso, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o óxido nítrico e o angiotensinogênio (Villarroya *et al.*, 2013; Gómez-Hernández *et al.*, 2016). Como órgão endócrino, apenas em circunstâncias especiais, atua na produção de leptina, adiponectina e resistina (Puerta *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que a UCP1 é a principal marcadora para a identificação do TAM (Langin, 2010). A UCP1 se encontra na membrana mitocondrial interna, atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de ATP e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (Nedergaard *et al.*, 2007).

Dessa forma, a termogênese consome energia lipídica e libera calor, causando desacoplamento de energia e aumentando o GE (Crowley e Vidal-Puig, 2001). Os adipócitos termogênicos conduzem a produção de calor através da coordenação próxima do suprimento de substrato com o maquinário oxidativo mitocondrial eficiente, que controlam a taxa de oxidação do substrato, fazendo com que em conjunto esse aparelho seja capaz de fornecer a esses adipócitos uma grande capacidade termogênica (Chouchani *et al.*, 2019).

A cascata de reações para efetuar a termogênese se dá a partir de estímulos a receptores adrenérgicos constantes (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1), levando a um aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ativação da proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) e indução da lipólise. Uma série de marcadores são ativados pelos ácidos graxos livres (AGL), levando à ativação da proteína efetora da termogênese, a UCP-1 (Ricquier e Bouillaud, 2000; Li *et al.*, 2005; Spiegelman, 2013; Bargut *et al.*, 2017)

Estudos experimentais que visam revelar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa no controle da obesidade, ganharam grande importância a partir da descoberta de que há TAM em uma parte da população adulta (Nedergaard *et al.*, 2007)

Embora a massa total de TAM em mamíferos seja pequena, estudos anteriores demonstram que a estimulação poderia aumentar o GE em até quatro vezes quando se observa no animal um aumento na perfusão tecidual (Smith e Hock, 1963; Smith, 1964; Nedergaard *et al.*, 2010). Além da gordura armazenada em gotículas lipídicas para gerar calor, os AGL e a glicose da circulação sistêmica aumentam exponencialmente a capacidade termogênica desse tecido (Nedergaard *et al.*, 2010). Como forma de sustentação de sua atividade metabólica oxidativa, o TAM utiliza uma grande quantidade de nutrientes intracelulares e circulantes, com efeitos benéficos sobre a obesidade (Bartelt *et al.*, 2011), RI (Stanford *et al.*, 2013) e aterosclerose (Berbée *et al.*, 2015; Bartelt *et al.*, 2017)

Devido à exposição ao frio, de forma adaptativa, o TAM sofre expansão, aumentando o tamanho do tecido, levando a uma elevação da capacidade metabólica total. Tanto a diferenciação de novos adipócitos quanto o aumento da atividade metabólica dos adipócitos existentes estão envolvidos nesse processo (Cannon e Nedergaard, 2004; Harms e Seale, 2013; Gnad *et al.*, 2014).

### 1.5. Termogênese e Batocinas

A estratégia de gastar calorias armazenadas para geração de calor também tem efeitos substanciais nos resultados das doenças metabólicas. Estudos que visam elucidar mecanismos envolvidos na termogênese adaptativa (associada ou não ao tremor) foram estimulados pelo enorme interesse de seus efeitos possivelmente benéficos a respeito de doenças metabólicas humanas ligadas à obesidade, incluindo DM2 e acúmulo de gordura ectópica no fígado (Chouchani *et al.*, 2019), além de sua capacidade de aumentar o GE e reduzir os efeitos obesogênicos (Whittle *et al.*, 2012).

O GE está correlacionado com três elementos: taxa metabólica basal (energia necessária para manter o funcionamento normal do organismo), a atividade física (gasto energético necessário para a realização de atividade extra laboral) e a

termogênese adaptativa (causada por tremor ou não tremor) (Lowell e Spiegelman, 2000).

A exposição ao frio, quando detectada pelo cérebro, leva a uma ativação das vias eferentes que são responsáveis pelo controle de dissipação de energia, tendo como principal componente efetor da resposta ao controle de temperatura o SNS. Este é responsável pela inervação de alvos termogênicos como o TAM e músculo esquelético (Kopelman, 2000)

A principal função da termogênese é a manutenção da temperatura corporal adequada (em torno dos 37 °C em humanos) em ambientes com baixas temperaturas. A termogênese adaptativa consiste na capacidade de geração de calor frente a alguns estímulos, como por exemplo o frio, que é capaz de desencadear processos de regulação da temperatura corporal e, em casos mais extremos, induzir o tremor e favorecer a liberação de calor (Bargut *et al.*, 2017). A dieta, por sua vez, também atua como um regulador da termogênese adaptativa, onde a fome pode gerar a redução da taxa metabólica de repouso em até 40%. Dessa forma, a restrição alimentar está associada a um menor GE (Kopelman, 2000). Cabe ressaltar que a dieta hiperenergética pode estimular o TAM no objetivo da manutenção da temperatura corporal (Wu *et al.*, 2013)

A termogênese não associada ao tremor, “*non-shivering*”, foi descrita primeiramente como uma característica exclusiva do TAM, devido a sua capacidade de dissipar o excesso de consumo energético sob a forma de calor. Porém, relatos recentes demonstram que a expressão da UCP1, juntamente com expressão gênica semelhante aos adipócitos marrons, induz também o TAB a adquirir características de TAM, sendo os adipócitos bege também capaz de realizarem a termogênese “*non-shivering*” (Spiegelman, 2013; Wu *et al.*, 2013).

A termogênese adaptativa do TAM está relacionada a duas funções distintas: manutenção da temperatura corporal e queima do excesso de energia ingerida. A termogênese termorregulatória (induzida pelo frio) está relacionada com a manutenção da temperatura corporal num estado de homeostase. A exposição aguda ao frio é capaz de promover termogênese através da contração involuntária da musculatura esquelética (termogênese *shivering*). Num processo de cronicidade, a dissipação de energia sem tremor se instala no TAM (termogênese *non-shivering*), a qual é um tipo de termogênese reguladora do metabolismo (induzida por dieta, sempre do tipo *non-shivering*), cada dia sendo mais estudada (Cannon e Nedergaard, 2004).

O responsável pela regulação central da termogênese *non-shivering* é o SNS, através da norepinefrina via receptores adrenérgicos localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons. Os subtipos mais comuns são o receptor  $\beta$ 3-adrenérgico (mais relevante na ativação aguda da termogênese em roedores) e o receptor  $\beta$ 1-adrenérgico (mais comum em humanos). A estimulação simpática induzida pelo frio nos adipócitos marrons desencadeia a lipólise e, posteriormente, a produção de calor (Ježek *et al.*, 2018)

A UCP1, proteína localizada na membrana interna mitocondrial é regulada através de sinalizações mediadas por estímulos simpáticos adrenérgicos, desencadeando um desacoplamento da cadeia respiratória entre o consumo de oxigênio e síntese de ATP, gerando uma dissipação de energia sob a forma de calor (Langin, 2010). A UCP-1 tem capacidade de acelerar o retorno de prótons para a matriz mitocondrial, fazendo com que a maior parte da energia proveniente do ciclo de Krebs e, por conseguinte, da oxidação dos substratos energéticos, seja perdida na forma de calor. Logo, a UCP1 é considerada a principal efetora da termogênese (Bianco, 2000).

Estudos experimentais associam a atividade termogênica realizada pelo TAM como uma importante ferramenta contra a obesidade e doenças metabólicas como DM2 e dislipidemia, onde a presença do TAM em humanos pode ter sua atividade prejudicada com a instalação dessa condição. Entretanto, o TAM também exerce um papel secretor podendo contribuir para as consequências sistêmicas oriundas da obesidade onde a atividade termogênica é alterada (Villarroya *et al.*, 2017).

Em adultos humanos encontra-se 50-80 g TAM ativo. A exposição aguda ao frio (18°C por 3h) é capaz de aumentar o GE de seres humanos devido ao aumento da captação de glicose e AG por esse tecido (Ouellet *et al.*, 2012). A exposição a temperaturas baixas de forma crônica também possui relação com o recrutamento de novas mitocôndrias em humanos e, conseqüentemente, elevação nas taxas termogênicas (van der Lans *et al.*, 2013).

As batocinas são adipocinas secretadas pelo TAM com efeitos autócrinos e parácrinos, podendo ser positivo ou negativo frente a estímulos na função termogênica dos adipócitos marrons. Moléculas de sinalização são liberadas pelos adipócitos e têm como sítios alvo as terminações nervosas simpáticas, células vasculares e células imunológicas para promover o remodelamento tecidual associado ao recrutamento adaptativo do tecido em resposta a estímulos

termogênicos. Além disso, é comprovado que o TAM desempenha uma função endócrina devido a liberação de batocinas que agem em outros órgãos distantes, como por exemplo reconhecimento do fator de crescimento de fibroblasto 21 e a miostatina, secretados pelo TAM, que têm como alvo o coração e o músculo esquelético (Villarroya *et al.*, 2019).

Diversas moléculas derivadas do TAM agem de maneira parácrina ou autócrina, influenciando a hipertrofia e hiperplasia do TAM, vascularização, inervação e fluxo sanguíneo. O fator de crescimento de fibroblastos 21, a IL-6 e a neuregulina4 (NRG4) estão entre os primeiros fatores endócrinos derivados do TAM que foram identificados (Villarroya *et al.*, 2017).

Em 2012, a BMP (*bone morphogenetic protein*) 8b, um membro da família de proteínas BMP, foi identificada como uma batocina secretada por adipócitos marrons em resposta ao estímulo termogênico mediado por noradrenalina. A literatura confirma que o *Bmp8b* está entre os genes mais intensamente regulados positivamente em adipócitos expostos a estímulos termogênicos (Villarroya *et al.*, 2019). O *Bmp8* atua de forma central aumentando a produção simpática para o sítio termogênico e de forma localizada para ampliar a resposta termogênica frente ao estímulo adrenérgico (Miranda *et al.*, 2020). Sua atuação também está presente na indução da produção endógena de NRG4, outra batocina conhecida, além de aumentar a vascularização do depósito de gordura marrom pela indução de fatores angiogênicos (Villarroya *et al.*, 2019).

A NRG4 também é uma batocina secretada predominantemente no TAM termogenicamente estimulado, que auxilia na regulação do metabolismo de glicose e lipídios (Wang *et al.*, 2019). Estudos comprovam que camundongos com deficiência de NRG4 apresentam aumento da RI e esteatose hepática após alimentação rica em gordura. Em contrapartida, camundongos com uma super expressão de NRG4, ao serem expostos a dieta HF, são capazes de desenvolver um estado metabólico melhorado. Com um menor ganho ponderal, melhoram o quadro de dislipidemia e a sensibilidade à insulina. Nota-se que a NRG4 é uma batocina de suma importância devido a sua capacidade de melhorar efeitos deletérios oriundos da obesidade como o DM2 e a DHGNA em pacientes obesos (Chen *et al.*, 2017). A NRG4 secretada por gordura marrom está diminuída na doença renal crônica humana e murina (Kralisch *et al.*, 2019).

O VEGFA é um fator chave pra angiogênese tecidual, entretanto há evidências que ele atua como um fator de crescimento no controle do metabolismo energético e na função do TA, auxiliando no controle da homeostase energética. O VEGFA super expresso é capaz de proteger contra a DIO e RI, devido ao aumento da termogênese. Além disso, o VEGFA apresenta propriedades pró-inflamatórias, porém há atividade quimiotática específica por macrófagos anti-inflamatórios M2 (Villarroya *et al.*, 2019).

O aumento da expressão de VEGFA resulta em aumento do número e tamanho dos vasos sanguíneos tanto no TAM como no TAB, protegendo contra a hipóxia induzida por dieta HF e pela obesidade. Estratégias associadas a superexpressão do VEGFA no TA é uma abordagem terapêutica potencialmente favorável para a prevenção da obesidade e da RI (Elias *et al.*, 2012).

O declínio da atividade do VEGFA nos adipócitos resulta na diminuição da vascularização do TA, levando à diminuição da capacidade termogênica, além de reduzir a capacidade oxidativa da mitocôndria em adipócitos marrons, gerando a diminuição da termogênese devido a falhas na atividade mitocondrial. O VEGFA serve para administrar a capacidade termogênica de adipócitos marrons por meio da função mitocondrial em conjunto com o recrutamento de vasos sanguíneos (Mahdaviani *et al.*, 2016).

## 1.6 *Whitening*

O TAM é especializado na dissipação de energia por meio da produção de calor, os adipócitos marrons contêm TAGs armazenados em numerosas inclusões lipídicas de tamanho pequeno e têm como organela mais característica as mitocôndrias (Saely *et al.*, 2012).

A obesidade promove alterações associadas a fatores de risco intermediários, como hipertensão, dislipidemia e intolerância oral à glicose, promovendo alterações estruturais e funcionais do TAM, as quais envolvem disfunção mitocondrial pela função oxidativa alterada, anormalidades ultraestruturais e aumento do estresse oxidativo, esse processo é conhecido como “clareamento” do tecido adiposo marrom ou “*whitening*” (Gao *et al.*, 2020). Dessa forma, os adipócitos marrons são

transformados em adipócitos fenotipicamente brancos e, conseqüentemente, com reduzida atividade termogênica (Miranda *et al.*, 2020).

O “*whitening*” pode ser induzido por vários fatores, incluindo alta temperatura ambiente, deficiência de receptor de leptina, deficiência de sinalização  $\beta$ -adrenérgica, deficiência de lipase, obesidade, entre outros, onde cada um desses fatores é capaz de induzir a infiltração de macrófagos no TAM, causando morte celular. A exposição crônica a um ambiente obesogênico pode induzir o clareamento dos adipócitos marrons, favorecendo o processo de morte celular pois contribui para o desenvolvimento do quadro de inflamação, ERE, disfunção mitocondrial e aumento de espécies reativas de oxigênio no TAM. Todos esses fatores estão envolvidos na morte dos adipócitos induzida pela disfunção desse tecido (Kotzbeck *et al.*, 2018).

A mudança na conformação da gotícula lipídica do adipócito marrom, através de um processo de aumento do tamanho das gotículas (coalescência), pode ser observada no “*whitening*”, deixando-o semelhante ao adipócito branco. A obesidade e o envelhecimento promovem distúrbios metabólicos onde o desequilíbrio da homeostase acarreta um quadro de disfunção mitocondrial durante o “*whitening*”, provocando o aumento do estresse oxidativo (Deng *et al.*, 2020). No clareamento do TAM observa-se a rarefação vascular como um fator causal significativo para esse efeito. A insuficiência vascular leva à disfunção mitocondrial e perda de estrutura do TAM, contribuindo para a RI (Shimizu e Walsh, 2015).

A rarefação vascular está intimamente relacionada ao processo de “*whitening*” no TAM, onde estudos mostram que a deleção direcionada de VEGFA é um fator predisponente para esse processo de clareamento. Em contrapartida, o aumento da expressão de VEGFA no TAM de camundongos obesos é capaz de restaurar a vascularização, melhorando a disfunção dos adipócitos e, conseqüentemente, melhorando a sensibilidade à insulina. A rarefação capilar no TAM, provocada pela obesidade ou ablação de VEGFA, diminui a sinalização  $\beta$ -adrenérgica, aumentando a disfunção mitocondrial, e promove a mitofagia, indicando que a supernutrição leva ao desenvolvimento de um estado de hipóxia no TAM, causando seu clareamento por disfunção e perda mitocondrial (Shimizu *et al.*, 2014).

Em camundongos alimentados com uma dieta padrão e mantidos em temperatura ambiente, os adipócitos estão localizados em vários compartimentos subcutâneos e viscerais (Vitali *et al.*, 2012). Contudo, no órgão adiposo de animais e humanos obesos, os adipócitos marrons são dificilmente encontrados devido à

hipótese de que o “*whitening*” faz com que o TAM adote características de TAB. Conseqüentemente, ocorre dificuldade na identificação do TAM e redução dos efeitos da atividade termogênica. Estudos visam elucidar as vias envolvidas no processo de mudanças fenotípicas realizadas pelo TAM quando há instalação de obesidade de forma crônica (Sbarbati *et al.*, 1991; Cinti *et al.*, 1997).

O “*whitening*” pode ser desencadeado por alguns mecanismos como: baixa atividade do SNS (Cannon e Nedergaard, 2004; Frontini e Cinti, 2010), onde a manutenção fenotípica do TAM se dá através da sinalização adrenérgica, essencial para o controle da atividade termogênica (Bartness e Wade, 1984; Dulloo e Miller, 1984). A atividade enzimática da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) também é fundamental para a morfologia e função normais do TAM (Haemmerle *et al.*, 2006; Ahmadian *et al.*, 2011), bem como a temperatura ambiente exerce influência na conformação do adipócito marrom (Cannon e Nedergaard, 2004; Frontini e Cinti, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Examinar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o gasto energético, mediadores termogênicos e inflamatórios envolvidos no “*whitening*” no tecido adiposo marrom (TAM) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em três tempos diferentes de administração (12, 16 e 20 semanas).

### 2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica em três tempos diferentes (12, 16 e 20 semanas) sobre:

- a) A massa corporal, ingestão alimentar, temperatura corporal e tolerância oral à glicose nos diferentes grupos experimentais;
- b) A morfologia do TAM;
- c) Expressão de UCP1 por imunofluorescência no TAM nos animais dos diferentes grupos experimentais;
- d) Expressão gênica de fatores termogênicos e ligados ao “*whitening*”, batocinas e marcadores do estresse do retículo endoplasmático no TAM dos animais estudados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e Dieta

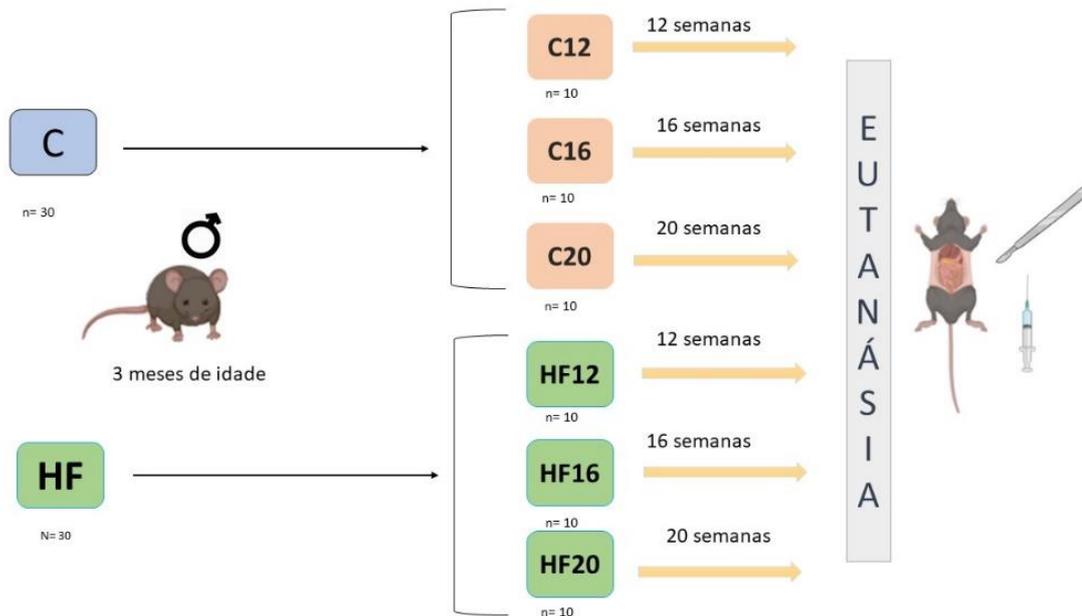
Os procedimentos apresentados no presente estudo foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996). Além disso, as normas impostas internacional e nacionalmente foram seguidas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o protocolo CEUA 041/2018.

Sessenta camundongos da linhagem C57BL/6 machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram alocados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e mantidos em condições controladas de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $60\pm 10\%$ ) e luminosidade (ciclos de 12/12h de claro-escuro), com livre acesso à água e dieta, em caixas *pathogen-free* durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

Com três meses de idade os animais foram aleatoriamente divididos para início do protocolo de indução da obesidade para avaliar os efeitos da ingestão de dieta HF em diferentes períodos de administração da dieta, perfazendo os seis grupos experimentais (Figura 6):

- a) **C12** (n=10, dieta controle por 12 semanas);
- b) **HF12** (n=10, dieta hiperlipídica por 12 semanas);
- c) **C16** (n=10, dieta controle por 16 semanas);
- d) **HF16** (n=10, dieta hiperlipídica por 16 semanas);
- e) **C20** (n=10, dieta controle por 20 semanas);
- f) **HF20** (n=10, dieta hiperlipídica por 20 semanas).

Figura 6 - Desenho experimental



Legenda: Esquema representativo dos grupos experimentais. Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

Fonte: A autora, 2021.

Todos os grupos alimentados com dieta controle (C12, C16 e C20) receberam dieta padrão para roedores (C, n=30, 10% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 76% sob a forma de carboidratos, 15 kJ/g de dieta), enquanto os grupos high-fat (HF12, HF16, HF20) receberam dieta rica em lipídios (HF, n=30, 50% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 36% sob a forma de carboidratos, 21 kJ/g de dieta). As dietas foram produzidas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil) de acordo com as recomendações da AIN-93M para roedores, incluindo o aporte de vitaminas e minerais (Reeves, Nielsen et al. 1993). As dietas experimentais encontram-se detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição nutricional das dietas experimentais

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

A escolha dos tempos de avaliação da cronicidade da dieta HF sobre os desfechos propostos se basearam em estudo prévio do grupo, no qual a partir da 12ª semana de administração da dieta HF foi verificado *whitening* no TAM (Miranda *et al.*, 2020) e num relato anterior da literatura de que o TAB, após 16 semanas de dieta HF, sofre remodelamento com renovação dos adipócitos (Strissel *et al.*, 2007).

### 3.2. Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal

Avaliou-se a ingestão alimentar diariamente (cada grupo em seu respectivo tempo de dieta) através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). O cálculo da ingestão energética foi realizado pela multiplicação da ingestão alimentar em gramatura pela energia ofertada por grama da respectiva dieta. Posteriormente, o valor obtido em quilocalorias foi

convertido em quilojoules, medida universal de energia. A MC foi aferida semanalmente (durante todo o período de indução de obesidade por dieta HF, ou seja, 12 semanas, 16 semanas e 20 semanas, cada grupo em seu respectivo tempo) em balança digital (precisão 0,01g). O ganho ponderal foi calculado a partir da subtração da MC final pela MC inicial.

### **3.3. Teste oral de tolerância à glicose**

A realização do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) ocorreu na semana antecedente à eutanásia (em seu respectivo tempo de dieta), onde os animais foram submetidos ao jejum durante o período de seis horas e, logo após, foi administrada uma solução glicosada (25% em salina estéril-0,9 NaCl), via gavagem orogástrica, na dose de 2g de glicose por kg de MC de cada animal.

A coleta sanguínea foi obtida através do método de ordenha da veia caudal (em animais escolhidos aleatoriamente) e foram medidas as glicemias no tempo 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos, através de glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil). O tempo zero (0) foi utilizado como glicose em jejum. A área sob a curva (ASC) foi calculada usando a ferramenta trapezoide do programa GraphPad Prism versão 8.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### **3.4. Calorimetria indireta**

Na penúltima semana de dieta (de seu respectivo tempo), os animais de todos os grupos (selecionados de forma aleatória) foram alocados em gaiolas metabólicas (com livre acesso à água e à dieta) durante o período de 48 horas e as gaiolas estavam conectadas a um sistema de módulos de calorimetria (Oxylet System, Panlab Havard Apparatus).

O presente sistema é programado para monitorar simultânea e continuamente o volume de oxigênio consumido ( $VO_2$ ), volume de gás carbônico produzido ( $VCO_2$ ) e a taxa de troca respiratória. Os dados foram coletados a cada três minutos durante 48 horas, com as primeiras 24 horas consideradas um período de climatização (Penna-de-Carvalho, Graus-Nunes et al. 2014).

O  $VO_2$  foi calculado por grama de peso corporal metabólico (PC)<sup>0,75</sup>. O GE (Kcal/dia/animal) foi relativizado pela MC de cada animal e apresentado como Kcal/g de MC.

### 3.5. Termografia

Através de imagens obtidas com uma câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, EUA), foi possível aferir a temperatura corporal dos animais (de todos os grupos), onde as imagens foram captadas em temperatura ambiente, com os animais conscientes (sem utilização de sedativos). Tais imagens foram obtidas na semana antecedente à eutanásia.

### 3.6. Eutanásia

Ao final do respectivo tempo (em semanas) do protocolo experimental, os animais foram mantidos em jejum por seis horas e, após a administração de heparina, foram prontamente anestesiados com cetamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Foi realizada a abertura torácica através de incisão mediana ventral e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a realização de dosagens bioquímicas.

O TAMi foi cuidadosamente dissecado, pesado com o auxílio de balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) e fixado em formalina de Millonig para processamento de microscopia de luz e microscopia confocal, além de congelados (-80 °C) para análises de RT-qPCR. Também foi realizada a dissecação e pesagem dos compartimentos que correspondem à gordura intra-abdominal: retroperitoneal (ligada à parede posterior

do abdômen e aos rins e ureteres) e epididimária (ligada ao epidídimo, na porção inferior do abdômen).

### 3.7. Análise plasmática

Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, o plasma foi separado por centrifugação (712 xg) e estocado em -80 °C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de insulina e leptina foram mensuradas através do método de ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. #EZRMI-13K e Rat/Mouse Leptin ELISA kit Cat. #EZML-82K, Millipore, Missouri, EUA) usando o equipamento Fluostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Alemanha).

Os resultados de glicemia e insulinemia de jejum foram utilizados para calcular o FIRI (Índice de resistência à insulina em jejum), utilizando a fórmula insulina de jejum ( $\mu\text{U/L}$ ) x glicemia de jejum ( $\text{mmol/L}$ ) / 25 (Duncan MH. 1995).

### 3.8. Microscopia de luz e estereologia

Com o intuito de preservar as amostras o mais próximo possível do seu estado natural, o TAMi seguiu para a fixação, permanecendo submerso durante 48 horas em formalina de Millonig (formaldeído a 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2). Após esse período, foi realizada a desidratação dos tecidos (utilizou-se uma escala crescente de álcoois, até chegar em sua forma absoluta com o intuito de homogeneizar a desidratação tecidual sem danificar a estrutura), a diafanização (clareamento), que foi realizada com uso de substâncias intermediárias (xilol), que sendo miscíveis em álcool e meio de inclusão, conseguem evaporar o álcool, tornando a estrutura pronta para a inclusão. Os tecidos foram incluídos em Paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) e foram seccionados em cortes de 5 $\mu\text{m}$  com o auxílio de um micrótomo, dotado de uma navalha de aço que é capaz de nos conceder secções muito finas de tecido. Posteriormente, o tecido foi corado com hematoxilina-eosina, todas as etapas

relatadas anteriormente seguiram um protocolo previamente estabelecidos para o tecido em questão.

O tamanho das vesículas de gordura no padrão multilocular do TAMi foi observado através de tomadas de imagens digitais em campos microscópios aleatórios e não consecutivos com o microscópio Olympus BX51 e câmera acoplada (Infinity 15c, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada), através do software Image-Pro Plus (versão 7.0 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

A fim de estimar indiretamente a densidade numérica de adipócito marrom por área, foi realizado a densidade numérica de núcleos por área ( $Q_A$ ), uma vez que o adipócito marrom é uma célula mononucleada. O  $Q_A$  foi obtido pela divisão do número total de núcleos contados na área teste, à exceção dos que tocam a linha proibida, pela área teste (em  $\mu\text{m}^2$ ), obtida a partir do software STEPanizer ([www.stepanizer.com](http://www.stepanizer.com)), versão beta offline 0.28.

### 3.9. Microscopia confocal

Para imunofluorescência, foi realizada a remoção de parafina e secções desparafinizadas e hidratadas de tecido (5  $\mu\text{m}$  de espessura) 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). As secções foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo anti-UCP-1 (Cusabio, PA025554ESR2HU, Houston, TX, EUA) na diluição 1:100 em PBS/1%BSA. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 1h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com fluorocromo Alexa 488, na diluição 1:50 em PBS/1%BSA. As lâminas, então, foram lavadas com PBS e montadas com SlowFade *Antifade* para manter a fluorescência (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA).

Imagens digitais imunofluorescentes para a marcação de UCP1 foram obtidas utilizando-se microscopia confocal (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Model C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

### 3.10. PCR quantitativo em tempo real

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos genes relacionados ao ERE, termogênese, inflamação e batocinas de camundongos. Os TAMi coletados foram transferidos para microtubos autoclavados contendo solução de lise - Trizol (Invitrogen, CA, EUA) para que o RNAm fosse transferido e isolado. Este foi quantificado utilizando contador espectrofotômetro (equipamento Nanovue - GE Life Sciences) usando 1 ug de RNA e DNase I (Invitrogen).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando oligonucleotídeos Oligo (dT) para RNAm e transcriptase-reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e a mistura SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). Os iniciadores foram projetados usando o software on-line Primer 3web versão 4.0. O gene beta-actina foi utilizado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo.

A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95° C), com 44 ciclos, cada um consistindo em 95°C por 10s e 60°C por 15s, seguido de uma curva de fusão (60 a 95°C, com aquecimento taxa de 0,1°C / s).

A razão de expressão relativa (QR) do mRNA foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct$  expressou a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes alvo e o controle endógeno. As sequências de primers sensíveis e anti-sentido utilizadas para amplificação estão descritas na Tabela 3.

Ao longo do texto, os genes serão descritos com a primeira letra maiúscula e em itálico e as proteínas com siglas em letras maiúsculas, conforme padronizado internacionalmente (Davisson 1994).

Tabela 3 - Detalhamento dos primers utilizados

Primers	Forward	Reverse
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Beta-actin</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Chop</i>	CTGCCTTTTACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Cidea</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAAGTGTCCCGTCATCTGT
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTTCGTCACCAGCACACAGT
<i>Nlpr3</i>	ATGCTGCTTCGACATCTCCT	GTTTCTGGAGGTTGCAGAGC
<i>Nrg-4</i>	GCCCATTCTGTAGGTGCATT	TTACTTTTCGCTTGGGATGCT
<i>Plin1</i>	ACGACCAGACAGACACAGAG	GGCTGTAACCTCTCTGAGCA
<i>Ppar-a</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>Vegfa</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG

### 3.11. Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão e as análises foram realizadas por ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett t3 (em todos os grupos), pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos utilizando-se o índice de significância com  $P < 0,05$  (GraphPadPrism, versão 8.3, CA, EUA).

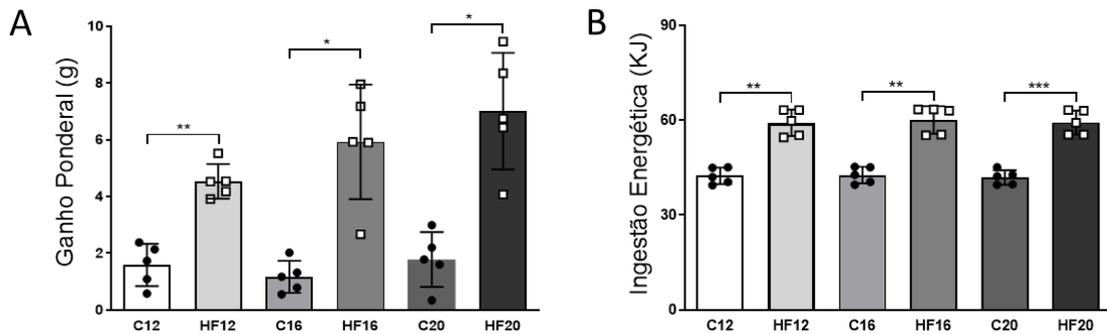
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ganho ponderal e ingestão energética

Os grupos C e HF iniciaram o experimento (semana 0) com massas corporais similares (tabela 4). Ao final do experimento observou-se que o ganho ponderal foi maior nos grupos HF em relação aos grupos C, independente do tempo de administração de dieta. Esse ganho pode ser observado a partir da décima segunda semana, onde há um aumento expressivo na MC dos animais de todos os grupos HF quando comparados com suas contrapartes (+186% HF12 vs. C12, +407% HF16 vs. C16, +293% HF20 vs. C20, Figura 7A).

Os achados correlacionados à densidade energética corroboram com os resultados do ganho ponderal, devido à maior densidade energética da dieta HF (21 kJ/g de dieta) em comparação com a dieta C (15 kJ/g de dieta). Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram consumo energético maior do que a necessidade para a manutenção do seu metabolismo basal. Dessa forma, apesar de não haver diferença estatística significativa em relação à ingestão alimentar das diferentes dietas, houve aumento do consumo energético nos grupos HF independentemente da idade (+40% HF12 vs. C12, +41% HF16 vs. C16, +41% HF20 vs. C20, Figura 7B).

Figura 7 - Ganho ponderal (A) e Ingestão energética (B)



Legenda: Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

Tabela 4 – Massa corporal inicial, Massa corporal final, FIRI e Temperatura corporal

Parâmetro	C12	HF12	C16	HF16	C20	HF20
Massa corporal inicial (g)	25,29 $\pm$ 0,6 2	27,03 $\pm$ 2,99	26,36 $\pm$ 1,4 0	26,08 $\pm$ 1,91	26,39 $\pm$ 1,6 6	25,86 $\pm$ 1,79
Massa corporal final (g)	26,87 $\pm$ 1,0 5	29,22 $\pm$ 0,65 a	26,27 $\pm$ 1,2 1	31,81 $\pm$ 2,63 c	25,85 $\pm$ 1,6 5	32,88 $\pm$ 1,99 e
FIRI	0,27 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	0,21 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,06
Temperatura corporal (°C)	31,44 $\pm$ 0,90	28,52 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	35,45 $\pm$ 0,44	35,50 $\pm$ 0,54	34,30 $\pm$ 0,35	33,37 $\pm$ 0,23 <sup>e</sup>

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  $\neq$  C12; c  $\neq$  C16; e  $\neq$  C20 conforme determinado pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

## 4.2 Metabolismo de carboidratos

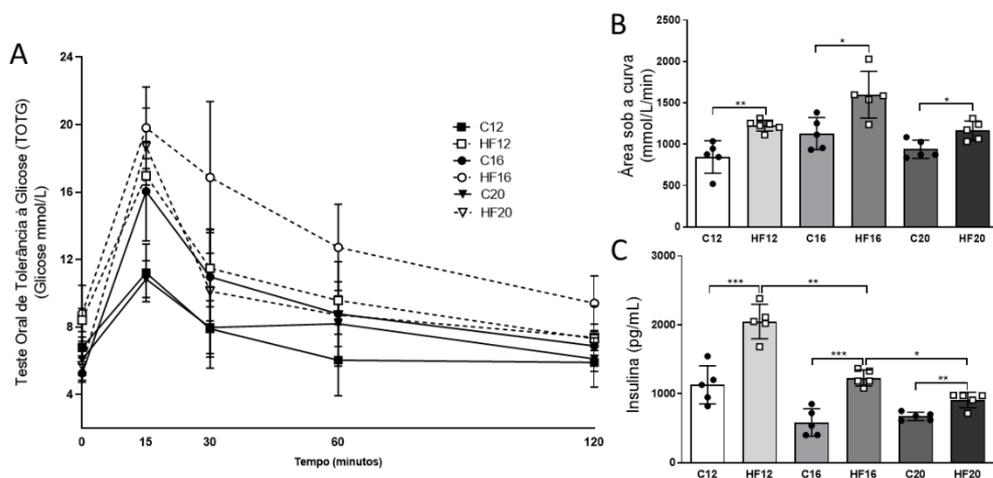
Após a análise da área sob a curva (ASC) do TOTG, observa-se que a dieta HF promoveu intolerância oral à glicose nos animais de todos os grupos HF (independentemente do tempo de ingestão de dieta HF), por um aumento significativo

na ASC quando comparado ao grupo C (+45% HF12 vs. C12, +41% HF16 vs. C16, +24% HF20 vs. C20, Figura 8A).

Concordando com os dados do TOTG, observou-se hiperinsulinemia em todos os grupos HF quando comparados aos grupos C (+81% HF12 vs. C12, +111% HF16 vs. C16, +35% HF20 vs. C20, Figura 8B). Observou-se também uma redução progressiva da concentração plasmática de insulina com a cronicidade da dieta HF, com o grupo HF16 apresentando uma redução de 40% em relação ao HF12 e o grupo HF20 apresentando uma redução de 26% em relação ao HF16 (Figura 8C).

A análise do FIRI (Tabela 4) revelou RI no grupo HF12 quando comparado ao C12 (+54%) e no grupo HF16 quando comparado ao C16 (+186%). Contudo, o grupo HF20 não apresentou RI em comparação ao C20, concordando com a hipótese de senescência e exaustão das ilhotas pancreáticas nesse grupo.

Figura 8 - Teste oral de tolerância à glicose (A), Área sob a curva (B) e Insulina (C)



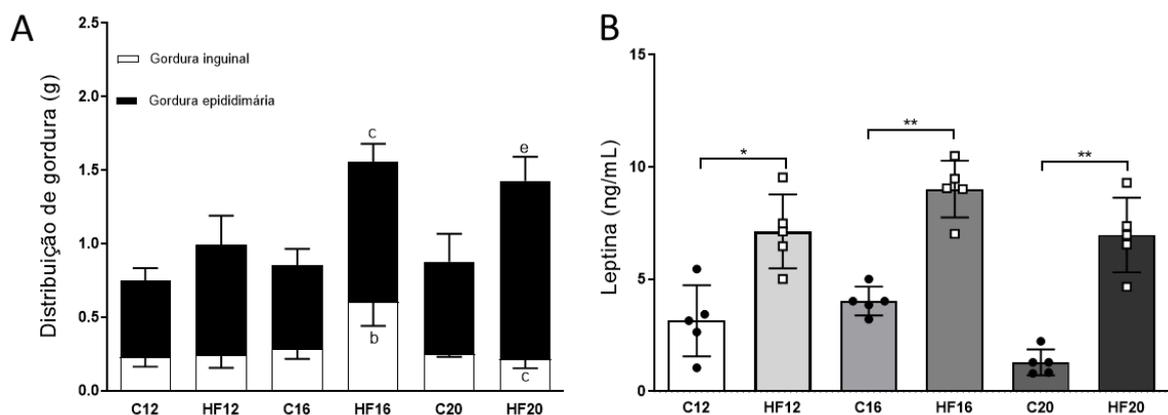
Legenda: Valores representados como média  $\pm$  DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ( $P < 0,05$ ): a  $\neq$  C12; c  $\neq$  C16; e  $\neq$  C20 conforme determinado pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

### 4.3 Distribuição de gordura e leptina plasmática

Com relação ao acúmulo de gordura visceral (epididimária), na semana 12 não houve diferença significativa entre os grupos HF12 e C12 (figura 9A). Entretanto, nas demais semanas avaliadas (16 e 20), houve incremento do depósito de gordura nesse compartimento nos grupos que consumiram dieta HF em comparação ao grupo controle de mesma idade (+67% HF16 vs. C16, +93% HF20 vs. C20, Figura 9A).

Houve hiperleptinemia nos grupos HF nos três tempos de administração da dieta HF (+126% HF12 vs. C12, +124% HF16 vs. C16, +437% HF20 vs. C20, Figura 9B), confirmando uma disfunção dos adipócitos brancos compatível com o quadro de metainflamação característico da obesidade nos diferentes tempos de administração da dieta.

Figura 9 - Distribuição de gordura (A) e Leptina (B)

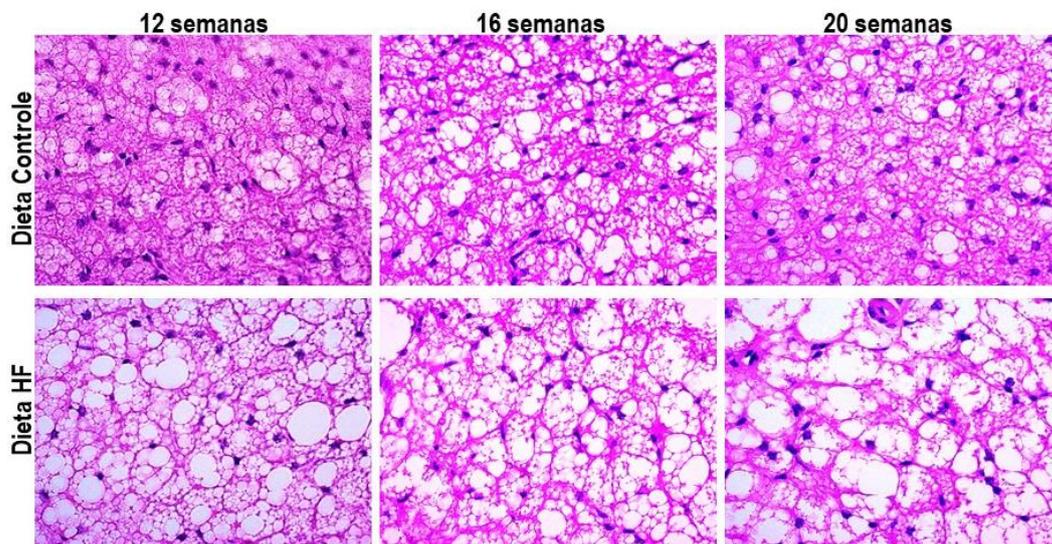


Legenda: Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média a (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T33. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

#### 4.4 Microscopia de luz e densidade numérica de núcleos por área

As fotomicrografias (Figura 10) permitem verificar as características padrões de célula multilocular no TAM dos grupos C12, C16 e C20. Contudo, devido à cronicidade da ingestão lipídica nos grupos HF, observa-se um aumento pronunciado do acúmulo de gotículas de gordura nos grupos HF12, HF16 e HF20 quando comparados com o grupo C (independente do tempo), dificultando a visualização da delimitação dos adipócitos marrons multiloculares que, frequentemente, passam a lembrar um padrão de armazenamento lipídico de um adipócito branco. Esse fenômeno é denominado de “*whitening*” e esse evento foi maximizado de maneira tempo-dependente no presente estudo (Figura 10).

Figura 10 – Microscopia de Luz

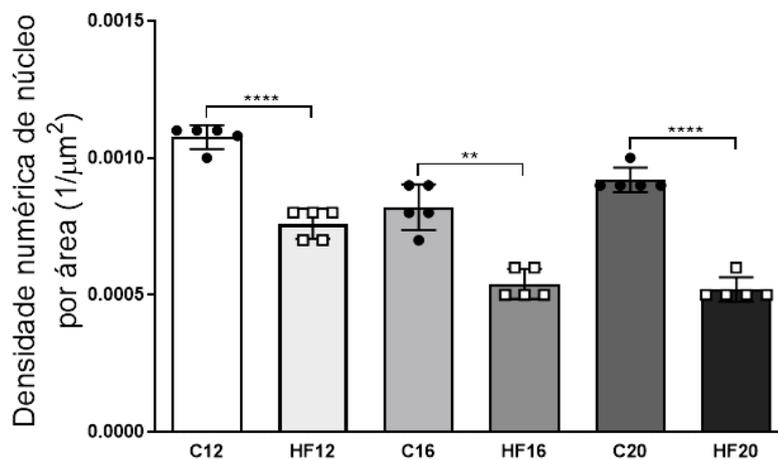


Legenda: Fotomicrografias do TAM coradas com hematoxilina e eosina com grupo Controle na parte superior e grupo HF na parte inferior, barra de calibração=30 $\mu$ m.

Os resultados referentes ao  $Q_A$  de núcleo sugerem que, devido ao fenômeno de “*whitening*”, há um aumento do tamanho das gotículas de gordura no grupo HF quando comparado com o grupo C (independente do tempo). Tal aumento promove um maior distanciamento entre os núcleos de adipócitos marrons vizinhos. Desta

forma, há uma redução do  $Q_A$  de núcleos nos grupos HF (independente do tempo) em comparação aos grupos C (-29% HF12 vs. C12, -34% HF16 vs. C16, -44% HF20 vs. C20, Figura 11). As imagens histológicas corroboram com os resultados obtidos no  $Q_A$  de núcleo (Figura 10).

Figura 11 - Densidade numérica de núcleo por área



Legenda: Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

#### 4.5 Quociente respiratório e gasto energético

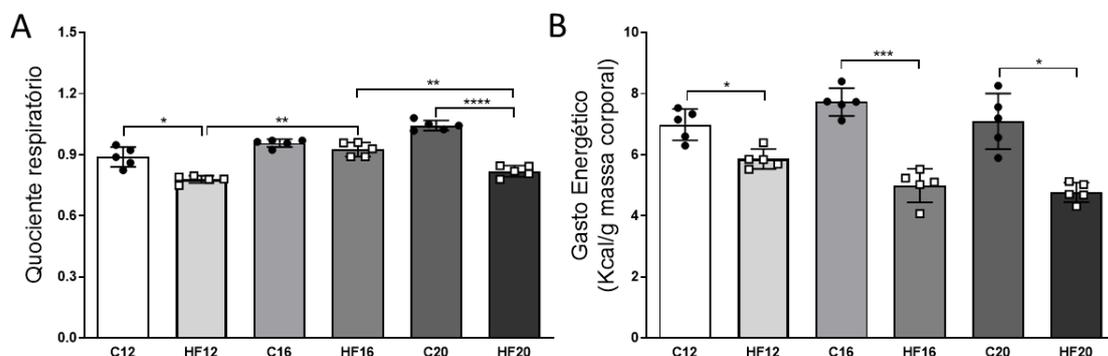
Foi utilizado o ensaio da calorimetria indireta para o cálculo do quociente respiratório (QR, Figura 12A), estimado pela razão  $VCO_2/VO_2$  e que pode ser um indicador do principal combustível para a manutenção do metabolismo basal desses animais. O grupo C (independente do tempo) atingiu um maior QR em comparação aos grupos HF, apresentando um QR próximo a 1,0, onde pode-se inferir que o grupo C utilizou preferencialmente carboidratos como principal fonte energética sem apresentar diferença estatística significativa entre si.

Os grupos HF12 (-12% vs. C12) e HF20 (-21% vs. C20) apresentaram um QR próximo ao valor 0,7, o que se pode inferir que esses grupos possivelmente

consumiram lipídios como fonte energética preferencial (Figura 12A), entretanto o HF16 apresentou um consumo preferencial por carboidratos (Figura 12A).

Com relação ao GE por grama de massa corporal, houve redução significativa nos grupos HF (-16% HF12 vs. C12, -35% HF16 vs. C16, -33% HF20 vs. C20, Figura 12B), enquanto o grupo C apresentou GE elevado, sugerindo adipócitos com atividade termogênica preservada (Figura 12B). Esses achados corroboram o “*whitening*” dos adipócitos marrons nos grupos HF, onde temos disfunção dos TAM e dificuldade em realizar termogênese.

Figura 12 - Quociente respiratório (A) e gasto energético (B)



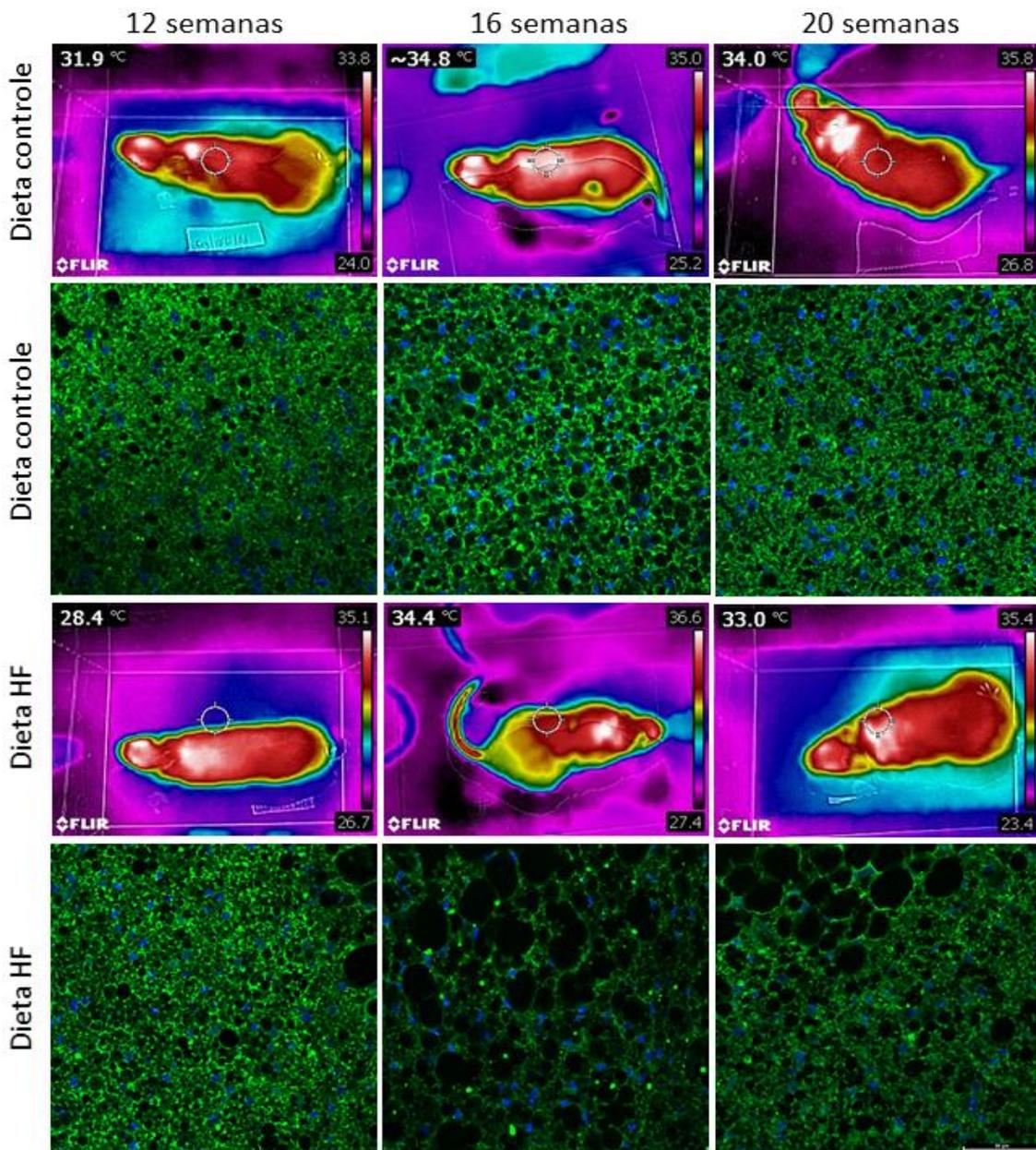
Legenda: Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), high-fat 12 semanas (HF12), controle 16 semanas (C16), high-fat 16 semanas (HF16), controle 20 semanas (C20), high-fat 20 semanas (HF20).

#### 4.6 Imunofluorescência e termografia

A imunofluorescência para UCP1 (Figura 13) confirma os achados histológicos (Figura 10), onde os animais alimentados com a dieta HF apresentaram adipócitos marrons com arranjo similar a um adipócito unilocular (*whitening*). Observa-se uma menor área de marcação de UCP1 (a proteína que está intimamente relacionada à atividade termogênica, situada na mitocôndria), com grande área de adipócitos uniloculares (as gotículas lipídicas aparecem em preto na Figura 13). Em contrapartida, observou-se uma imunomarcagem positiva para UCP1 mais expressiva nos grupos controle (Figura 13), independente do tempo de dieta.

Corroborando com os resultados da imunofluorescência, a temperatura corporal dos animais do grupo controle, independente do tempo, encontravam-se mais elevadas quando comparadas com o grupo HF12 e HF20. Entretanto, o grupo HF16 apresentou uma diferença significativa com relação aos outros grupos (Figura 13 e Tabela 4) e tais achados serão discutidos posteriormente com os dados do RT-qPCR.

Figura 13 - Termografia e Imunofluorescência



Legenda: Vista dorsal das imagens termográficas seguindo a seguinte ordem: C12, C16 E C20/HF12, HF16 e HF20. Microscopia confocal do tecido adiposo marrom marcado com dapi (azul, núcleo) e anticorpo anti-UCP1 (verde). Mesmo aumento para todas as fotomicrografias, barra de calibração = 50µm.

## 4.7 PCR quantitativo em tempo real

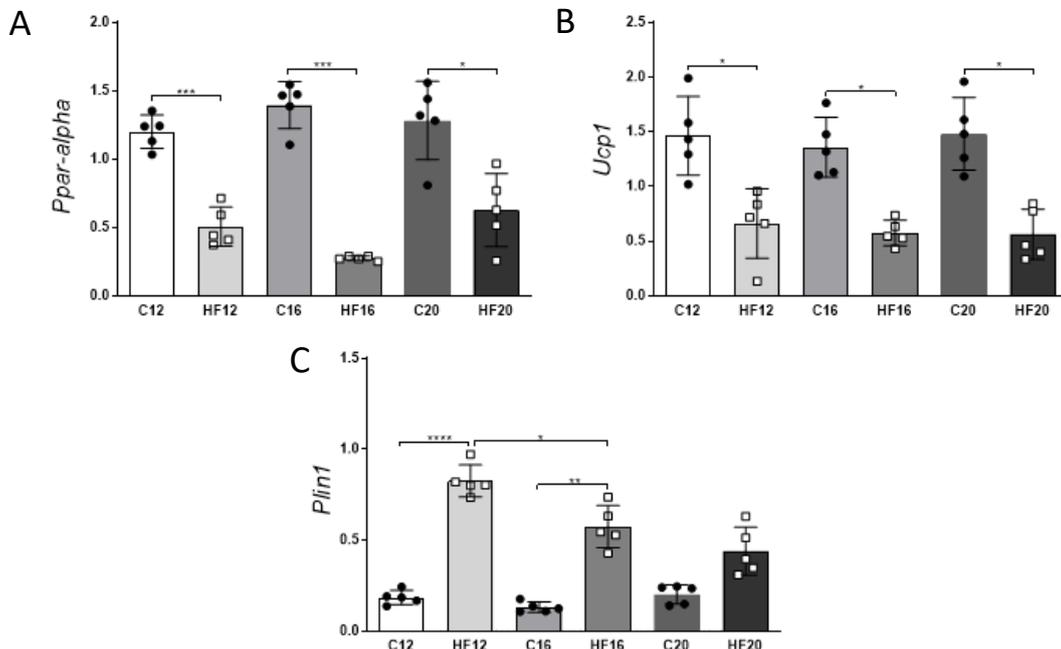
### 4.7.1. Expressão gênica: Marcadores termogênicos

A expressão relativa do RNAm de *Ppar- $\alpha$* , um fator de transcrição que tem marcadores termogênicos como genes-alvo, foi menor no grupo HF que no grupo C independente do tempo de administração da dieta HF (-58% HF12 vs. C12, -81% HF16 vs. C16, -52% HF20 vs. C20, Figura 14A)

A *Ucp-1*, responsável pela dissipação de calor na cadeia respiratória mitocondrial, corrobora com os resultados relacionados ao *Ppar- $\alpha$* , que tem como um de seus genes alvos a *Ucp1*. A expressão da *Ucp-1* foi menor nos grupos HF quando comparada aos grupos C independente do tempo (-55% HF12 vs. C12, -58% HF16 vs. C16, -63% HF20 vs. C20, Figura 14B).

Os resultados relacionados ao *Plin1* (Perilipina 1), que é um marcador relacionado à lipólise e instabilidade das gotas lipídicas, mostraram um aumento significativo nos grupos HF12 e HF16 em relação aos grupos controles de mesma idade (+346% HF12 vs. C12, +338% HF16 vs. C16, Figura 14C), entretanto no grupo HF20 não houve diferença estatística significativa quando comparado com o C20, onde sugere-se um quadro de exaustão e disfunção celular.

Figura 14 - Genes marcadores termogênicos



Legenda: Expressão gênica de *Ppar-a* (A), *Ucp1* (B), *Plin1* (C). Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), Controle 16 semanas (C16), Controle 20 semanas (C20), dieta rica em gordura 12 semanas (HF12), dieta rica em gordura 16 semanas (HF16), dieta rica em gordura 20 semanas (HF20).

#### 4.7.2. Expressão gênica: Batocinas

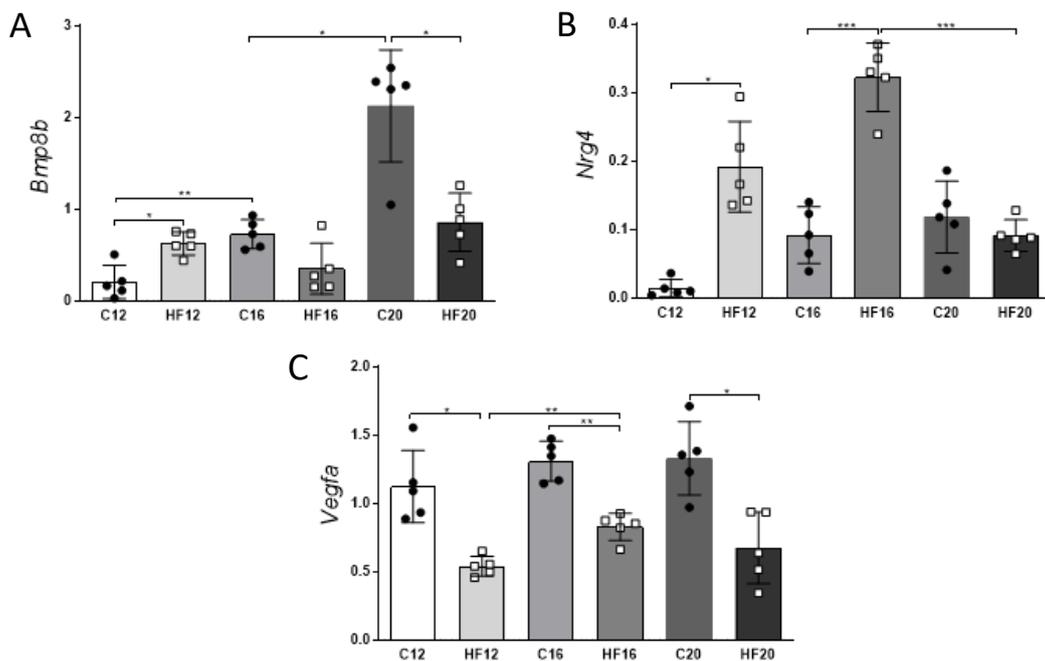
O *Bmp8*, que é um gene relacionado ao estímulo adrenérgico e atua na resposta termogênica positivamente, apresentou expressão aumentada no grupo HF12 quando comparado ao grupo C12 (+206%, Figura 15A). Já na semana 16, não observamos diferença estatística significativa entre os grupos C e HF, corroborando com as imagens termográficas, onde é possível observar um comportamento similar em relação a temperatura corporal tanto no grupo HF16 quanto no grupo C16. Por outro lado, o grupo C20 apresentou um aumento expressivo do *Bmp8* devido ao seu potencial termogênico preservado quando comparado com o grupo HF20 (+148% C12 vs. HF12 Figura 15A).

A expressão do gene *Nrg4* está intimamente relacionado à presença de obesidade, levando a efeitos deletérios em sítios distintos. Nos grupos HF12 e HF16

observou-se um aumento significativo da expressão gênica do *Nrg4* quando comparados com os grupos controle do mesmo tempo (+1.230% HF12 vs. C12, +251% HF16 vs. C16, Figura 15B), entretanto não houve diferença significativa entre os grupos HF20 e C20, contribuindo com a hipótese de disfunção celular.

O *Vegfa* é um gene relacionado à vascularização e suprimento celular, onde sua expressão nos grupos HF independente do tempo encontrou-se reduzida quando comparada com os grupos C (-52% HF12 vs. C12, -37% HF16 vs. C16, -50% HF20 vs. C20, Figura 15C). Tais resultados corroboram com os achados do QA de núcleo, onde há presença reduzida de núcleos por área nos grupos alimentados com dieta HF devido ao aumento do tamanho das gotículas de lipídios.

Figura 15 - Batocinas



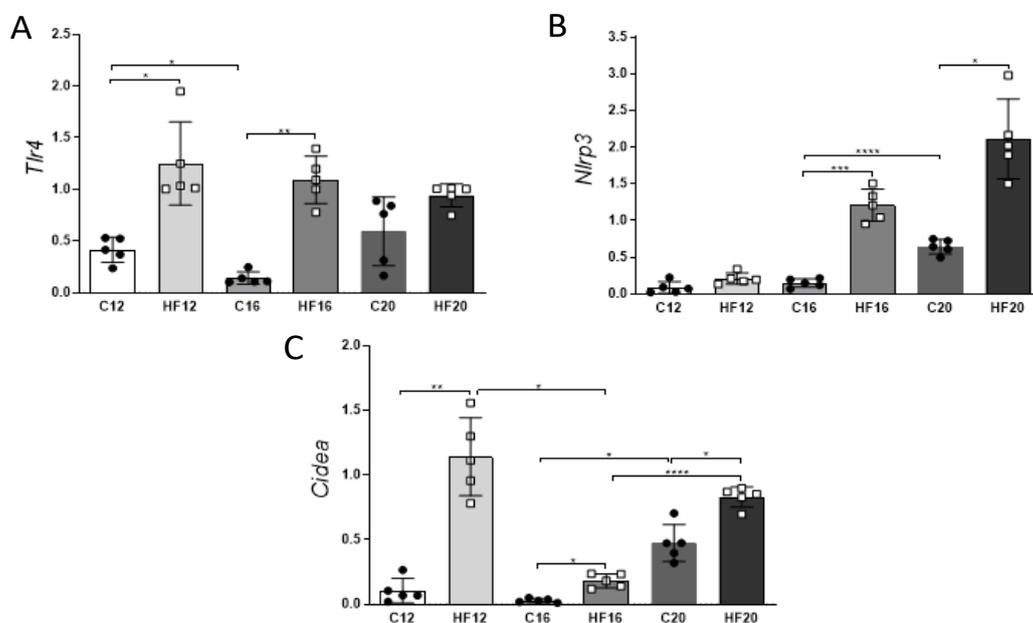
Legenda: Expressão gênica de *Bmp8b* (A), *Nrg4* (B), *Vegfa* (C). Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), Controle 16 semanas (C16), Controle 20 semanas (C20), dieta rica em gordura 12 semanas (HF12), dieta rica em gordura 16 semanas (HF16), dieta rica em gordura 20 semanas (HF20).

#### 4.7.3. Expressão Gênica: Marcadores inflamatórios

O *Tlr4* é um receptor pró-inflamatório que apresentou expressão elevada nos tempos HF12 e HF16 quando comparados com os grupos C12 e C16 (+201% HF12 vs. C12, +672% HF16 vs. C16, Figura 16A). Contudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos HF20 e C20.

Da mesma forma, com relação à expressão de *Nlrp3*, um inflamassoma associado ao processamento e secreção de citocinas pró inflamatórias, embora não houve diferença estatística significativa entre os grupos HF12 e C12 para sinais pró-inflamatórios, nos grupos H16 e HF20 houve um aumento expressivo quando comparados aos seus controles (+706% HF16 vs. C16, +227% HF20 vs. C20, Figura 16B). O *Cidea*, que é um marcador de apoptose, teve sua expressão mais pronunciada nos grupos HF quando comparado com os grupos C (+984% HF12 vs. C12, +535% HF16 vs. C16, +75% HF20 vs. C20, Figura 16C).

Figura 16 - Genes marcadores da inflamação e apoptose



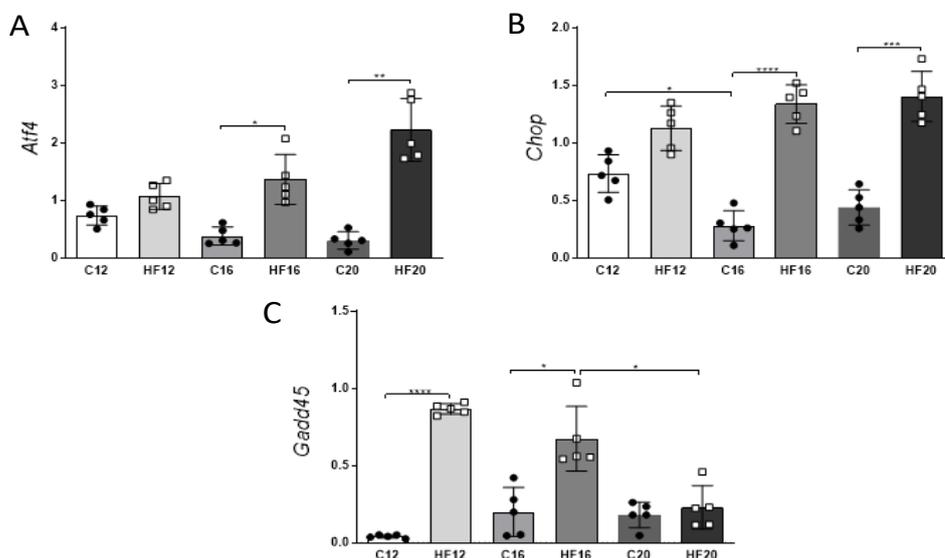
Legenda: Expressão gênica de *Tlr4* (A), *Nlrp3* (B), *Cidea* (C). Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), Controle 16 semanas (C16), Controle 20 semanas (C20), dieta rica em gordura 12 semanas (HF12), dieta rica em gordura 16 semanas (HF16), dieta rica em gordura 20 semanas (HF20).

#### 4.7.4. Expressão Gênica: Marcadores do estresse do retículo endoplasmático

A Expressão do *Atf4*, um fator de transcrição que regula vários genes envolvidos na resposta às proteínas desdobradas (UPR) como resultado ao ERE, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos C e HF na semana 12. Contudo, houve um aumento da expressão gênica do *Atf4* nos grupos HF16 e HF20 (+257% HF16 vs. C16, +630% HF20 vs. C20, Figura 17A).

O *Chop*, que atua como um fator de transcrição envolvido na mediação do apoptose, embora não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos C12 e HF12, nas semanas subsequentes houve um aumento da expressão desse marcador apoptótico nos grupos HF16 e HF20 (+377% HF16 vs. C16, +219% HF20 vs. C20, Figura 17B). O *Gadd45*, gene relacionado à parada do ciclo celular, apresentou-se mais expresso nos grupos HF12 e HF16 quando comparados com os grupos C12 e C16 (+2.024% HF12 vs. C12, +238% HF16 vs. C16 Figura 17C).

Figura 17 - Genes marcadores da inflamação e estresse do retículo endoplasmático



Legenda: Expressão gênica de *Atf4* (A), *Chop* (B), *Gadd45* (C). Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5) e foram testados pelo ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3. Diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ) estão indicadas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Abreviações: Controle 12 semanas (C12), Controle 16 semanas (C16), Controle 20 semanas (C20), dieta rica em gordura 12 semanas (HF12), dieta rica em gordura 16 semanas (HF16), dieta rica em gordura 20 semanas (HF20).

## 5. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo mostraram que o excesso de gordura saturada na dieta promoveu *whitening* do TAM nos três tempos de administração da dieta. Essa disfunção dos adipócitos marrons resultou em redução da expressão de fatores termogênicos, da expressão de batocinas e do gasto energético, conduzindo ao sobrepeso e intolerância oral à glicose, ambos relacionados ao ERE.

Nesse estudo, os camundongos que foram submetidos ao protocolo de DIO apresentaram excesso de peso devido a maior densidade energética da dieta HF e RI secundária à hipertrofia dos adipócitos (Souza-Mello *et al.*, 2010). A análise do FIRI revelou RI nos grupos HF12 e HF16 quando comparados com os grupos C de mesma idade, entretanto o grupo HF20 não apresentou RI quando comparado com o C20. Tais achados corroboram com relato na literatura de que o processo de hipertrofia e hipersecreção de insulina de animais obesos leva à exaustão das ilhotas pancreáticas, fenômeno que pode ser maximizado pelo envelhecimento dos animais no presente experimento, uma vez que a hipertrofia compensatória pode acelerar o processo de senescência das células beta pancreáticas (Sone e Kagawa, 2005). A hiperleptinemia ocorre devido ao aumento da massa adiposa decorrente da obesidade, levando a um quadro de resistência à leptina (Vickers *et al.*, 2001). Ainda que não haja aumento significativo da massa de gordura visceral na semana 12, provavelmente já havia um quadro de hipertrofia desses adipócitos no grupo HF12 devido ao aumento da concentração de leptina plasmática, pois as concentrações plasmáticas de leptina refletem majoritariamente a secreção dos adipócitos brancos (Martinez-Sanchez, 2020).

Com relação ao TAM, os resultados apresentados nas fotomicrografias mostram que a dieta HF induziu o *whitening* após um protocolo de 12 semanas, onde observa-se um aumento pronunciado do tamanho da gotícula de gordura em todos os grupos HF em relação aos grupos C de mesma idade. Tal fenômeno provoca um maior distanciamento entre os núcleos de adipócitos marrons vizinhos, ocasionando uma redução do  $Q_A$  de núcleos nos grupos HF independente do tempo.

O fator de transcrição PPAR $\alpha$  regula o metabolismo lipídico, atuando na transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial, oxidação, captação de AG e expressão de UCP1 (Barbera *et al.*, 2001). No presente estudo, observou-se

que os marcadores termogênicos relacionados ao PPAR $\alpha$  foram significativamente menos expressos nos grupos HF quando comparados aos grupos C (independente do tempo). Um estudo anterior do grupo mostrou que a administração de um agonista PPAR $\alpha$  restaurava a capacidade termogênica de adipócitos marrons em camundongos alimentados com dieta HF (Miranda *et al.*, 2020). Dessa forma, a expressão reduzida de PPAR $\alpha$  parece ser um fator chave na disfunção do adipócito marrom (*whitening*).

A UCP1, transcrito do PPAR $\alpha$ , é a efetora da termogênese e funciona como um canal de prótons alternativo, desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, aumentando o gasto de energia que é liberada sob a forma de calor (Ricquier, 2017). Nos grupos HF, que apresentaram menor expressão de PPAR $\alpha$ , houve uma menor marcação positiva para UCP1 independente do tempo de administração da dieta. Os ensaios de imunofluorescência e de RT-qPCR confirmaram que o *whitening* foi capaz de reduzir a capacidade termogênica do TAM no presente estudo, resultando no menor GE aferido pela calorimetria indireta.

O aumento da expressão de *Plin1* nos grupos HF é um indicativo de aumento da lipólise por estímulo simpático (Clifford *et al.*, 2000). Essa observação sugere que há um intenso remodelamento das gotículas lipídicas nos adipócitos marrons dos animais alimentados com excesso de gordura saturada. Considerando a reduzida capacidade termogênica nos grupos HF, os AG resultantes da lipólise provavelmente são desviados para depósitos ectópicos como o fígado, configurando a lipotoxicidade (Longo *et al.*, 2019).

Além das alterações estruturais que caracterizam o *whitening*, os animais dos grupos HF exibiram alterações na funcionalidade dos adipócitos marrons como alterações na expressão gênica das batocinas. Nesse contexto, o *Bmp8b* é secretado por adipócitos marrons e tem um potencial regulador dos processos neuro-vasculares que é essencial para acoplar a responsividade adrenérgica, remodelação do TA e termogênese eficiente. Com isso, sua expressão potencializa a atividade termogênica (Whittle *et al.*, 2012; Pellegrinelli *et al.*, 2018). Os achados no presente estudo demonstram uma tentativa de compensação termogênica do *Bmp8b* ao observarmos o grupo HF12, que teve expressão gênica significativamente maior quando comparado com o grupo C12. Tal resultado se correlaciona com a expressão de UCP1, que se encontra reduzida nesse grupo, revelando uma tentativa de compensação do *Bmp8b* para manter a atividade termogênica. Os grupos C16 e HF16

não apresentaram diferença significativa da atividade do *Bmp8b*, corroborando com os resultados das imagens termográficas, onde os animais dos grupos C16 e HF16 não apresentam diferença significativa entre a temperatura corporal. Entretanto, no grupo HF20 visualizamos um declínio da atividade do *Bmp8b* quando comparados com o grupo C20 devido aos efeitos deletérios crônicos da dieta HF e da obesidade sobre a funcionalidade dos adipócitos marrons.

A *Nrg4* é uma batocina que está relacionada à *Bmp8b* porque também influencia o suprimento neuro-vascular no TAM (Tutunchi *et al.*, 2020). Nos grupos HF12 e HF16, onde a expressão de BMP8 ainda indica um acoplamento do estímulo adrenérgico com a reduzida expressão de UCP1 numa tentativa de compensar o balanço energético positivo nesses grupos (Pellegrinelli *et al.*, 2018), houve aumento da expressão de *Nrg4*. Com a cronicidade da obesidade, o grupo HF20 exibiu expressão reduzida da *Nrg4*, correlacionada com o menor aporte de oxigênio por uma reduzida vascularização e estímulo à apoptose no TAM. A obesidade leva a um déficit potencial da expressão de NRG4, onde citocinas pró-inflamatórias regulam negativamente sua expressão, aumentando possíveis complicações metabólicas como DM2 e DHGNA (Tutunchi *et al.*, 2020).

Uma proteína importante para o tecido adiposo marrom é a VEGFA, responsável por induzir a vascularização e o aumento do fluxo sanguíneo, onde sua superexpressão é capaz de aumentar a regulação de UCP1, consequentemente aumentando a capacidade termogênica do TAM (Villarroya *et al.*, 2017). Em animais obesos, induzidos por dieta, ocorre uma hipóxia local devido à vascularização deficiente do TAM, configurando um microambiente adverso que, por sua vez, leva à disfunção da atividade mitocondrial (Zhao *et al.*, 2018). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que houve uma queda significativa da expressão de *Vegfa* em todos os grupos alimentados com dieta HF independente do tempo. A redução do  $Q_A$  de núcleo corrobora com a sugestão de rarefação vascular a partir da expressão de *Vegfa*. O aumento do tamanho da gotícula de lipídio no TAM, aferido pela menor densidade de núcleos por área de tecido, deixa implícito uma rarefação vascular. Consequentemente, um citoplasma, ocupado em sua maior parte pela inclusão lipídica, apresenta uma diminuição do aporte sanguíneo com disfunção mitocondrial, caracterizando o *whitening*.

Além da rarefação vascular e da RI, a inflamação é um importante indicador de *whitening*. Nesse contexto, a indução de *Tlr4* gera um aumento de processos pró-

inflamatórios, levando ao comprometimento da função mitocondrial e ativação de inflamassoma (Okla *et al.*, 2015). Nos grupos HF12 e HF16 houve o aumento da expressão de *Tlr4* devido aos efeitos deletérios e pró-inflamatórios gerados pelo *whitening*. Com relação aos grupos C20 e HF20, não houve diferença na expressão de *Tlr4*, supostamente devido ao processo de envelhecimento dos animais do grupo controle. Entretanto, o *Tlr4*, que não diferiu dos grupos HF16 e HF12, ativou o processo inflamatório crônico no grupo HF20, levando à hipótese de que houve a passagem do sinal de inflamação com exacerbação da atividade do inflamassoma *Nlrp3* (Swanson *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020).

Estudos apontam que a atividade do inflamassoma NLRP3, um complexo de multiproteínas intracelulares que consistem em um receptor de reconhecimento de padrões, quando tem sua expressão elevada no TAM se correlaciona positivamente à obesidade e suas complicações metabólicas e prejudica a sensibilidade à insulina na DIO (Wu *et al.*, 2020).

O *Cidea* funciona molecularmente como um inibidor da termogênese e tem íntima relação com mecanismos de morte celular. Sua atividade pode ter implicações terapêuticas, onde tratamentos que levariam à diminuição da expressão da *Cidea* ou à inibição de sua atividade na gordura marrom poderiam ser considerados como potenciais ativadores do GE, neutralizando a obesidade (Fischer *et al.*, 2017). No presente estudo, observamos que o *Cidea* teve expressão mais pronunciada em todos os grupos HF independente do tempo, sugerindo uma maior atividade apoptótica nesses grupos alimentados com dieta rica em gordura.

O ERE está associado a condições induzidas por lipotoxicidade, onde os efeitos nocivos da dieta rica em gordura são capazes de gerar uma condição de estresse na função do RE no dobramento das proteínas, o que deflagra a UPR (reação a proteínas mal dobradas). Com o tempo, ocorre um desequilíbrio químico tóxico dos níveis de cálcio do retículo, inflamação, privação de glicose e influxo de lipídios. Animais submetidos à dieta HF mostram crescimento progressivo das cisternas do RE, caracterizando o ERE, produzindo aumento da disfunção mitocondrial, dano ao DNA mitocondrial e estresse oxidativo, terminando em autofagia e degradação de proteínas (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2021)

A morte celular apoptótica ocorre por indução de vários genes pró-apoptóticos e por supressão da síntese de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, mediadas por ATF4-CHOP (Rozpedek *et al.*, 2016). Os resultados mostram que houve uma maior

atividade do *Atf4* nos grupos HF, uma das vias da UPR, numa tentativa de compensação dos efeitos deletérios do ERE. A ativação do fator de transcrição CHOP (Proteína homóloga C/EBP) induz apoptose para proteger as células dos efeitos nocivos de proteínas desdobradas (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2021). Logo, o aumento da expressão de *Chop* denota que há uma acentuação do *whitening* pela administração crônica da dieta HF.

Os genes da família de interrupção do crescimento e dano ao DNA 45 (*Gadd45*) regulam o reparo do DNA, ciclo celular, sobrevivência celular, apoptose e senescência celular sob vários estímulos de estresse, como estresse oxidativo, radiação UV e estresse oncogênico (Zhang *et al.*, 2014). A expressão de *Gadd45a* está positivamente correlacionada com metabolismo lipídico e obesidade (You *et al.*, 2020), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo onde os animais obesos apresentaram uma maior expressão de *Gadd45a* no TAM, sugerindo uma maior atividade apoptótica.

Nosso estudo apresenta como limitação o fato de não ter sido realizada a imuno-histoquímica para caspase 3 clivada, o que nos ajudará a comprovar o aumento do apoptose com a cronicidade do *whitening*. As restrições impostas pela pandemia de COVID-19 nos impediram de terminar essa análise a tempo de ser incluída nessa versão do trabalho para a banca.

## CONCLUSÃO

A dieta HF causou sobrepeso, intolerância oral à glicose, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, levando à disfunção dos adipócitos marrons (*whitening*) após 12, 16 e 20 semanas de administração dietética. O aumento do tamanho da gotícula lipídica fez com que o adipócito marrom assumisse um arranjo mais próximo ao adipócito branco (unilocular), com conseqüente redução da sua capacidade termogênica e do gasto energético. A inflamação e o ERE parecem mediar as modificações estruturais e funcionais do TAM, o qual apresentou perfil alterado de expressão gênica de batocinas relacionado à rarefação vascular, reduzido acoplamento do estímulo simpático com a ativação da UCP1, ativação de inflamassoma e estímulos pró-apoptóticos no tecido adiposo marrom dos animais obesos. Esses resultados podem ajudar a entender melhor o papel da disfunção adipocitária marrom nos efeitos metabólicos deletérios da obesidade e sugerir alvos potenciais para estudos futuros que ambicionem tratar a obesidade.

## REFERÊNCIAS

- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: i-xii, 1-253
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332 (doi: 10.1016/s1043-2760(00)00301-5)
- Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* 2011; 13: 739-748 (doi: 10.1016/j.cmet.2011.05.002)
- Airaksinen K, Jokkala J, Ahonen I, Auriola S, Kolehmainen M, Hanhineva K et al. High-Fat Diet, Betaine, and Polydextrose Induce Changes in Adipose Tissue Inflammation and Metabolism in C57BL/6J Mice. *Mol Nutr Food Res* 2018; 62: e1800455 (doi: 10.1002/mnfr.201800455)
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059-1062 (doi: 10.1016/s0140-6736(05)67402-8)
- Astrup A, Brand-Miller J. Diet composition and obesity. *Lancet* 2012; 379: 1100; author reply 1100-1101 (doi: 10.1016/s0140-6736(12)60456-5)
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2001; 276: 1486-1493 (doi: 10.1074/jbc.M006246200)
- Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017; 31: (doi: 10.1515/hmbci-2016-0051)
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011; 17: 200-205 (doi: 10.1038/nm.2297).
- Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbée JFP, Worthmann A, Cherradi ML et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun* 2017; 8: 15010 (doi: 10.1038/ncomms15010)
- Bartness TJ, Wade GN. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav Neurosci* 1984; 98: 674-685 (doi: 10.1037//0735-7044.98.4.674)
- Berbée JF, Boon MR, Khedoe PP, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun* 2015; 6: 6356 (doi: 10.1038/ncomms7356)
- Bhurosy T, Jeewon R. Overweight and obesity epidemic in developing countries: a problem with diet, physical activity, or socioeconomic status? *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 964236 (doi: 10.1155/2014/964236)

Bianco AC. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44: (doi: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302000000400003>)

BRASIL. *Vigitel Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.*

Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care* 2014; 37: 950-956 (doi: [10.2337/dc13-2085](https://doi.org/10.2337/dc13-2085))

Cannon B, de Jong JMA, Fischer AW, Nedergaard J, Petrovic N. Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? *Exp Physiol* 2020; 105: 1191-1200 (doi: [10.1113/ep087875](https://doi.org/10.1113/ep087875))

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359 (doi: [10.1152/physrev.00015.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003))

Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition* 2012; 28: 212-219 (doi: [10.1016/j.nut.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.05.011))

Chen Z, Wang GX, Ma SL, Jung DY, Ha H, Altamimi T et al. Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Mol Metab* 2017; 6: 863-872 (doi: [10.1016/j.molmet.2017.03.016](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.016))

Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* 2019; 92: 6-10 (doi: [10.1016/j.metabol.2018.09.005](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005))

Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab* 2019; 29: 27-37 (doi: [10.1016/j.cmet.2018.11.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002))

Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* 1997; 138: 797-804 (doi: [10.1210/endo.138.2.4908](https://doi.org/10.1210/endo.138.2.4908))

Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 5011-5015 (doi: [10.1074/jbc.275.7.5011](https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5011))

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-248 (doi: [10.1016/j.physbeh.2004.02.006](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006))

Crowley V, Vidal-Puig AJ. Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11: 70-75 (doi: [10.1016/S1054-2818\(01\)00001-1](https://doi.org/10.1016/S1054-2818(01)00001-1))

De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 5239-5249 (doi: [CPD-EPUB-20130204-12 \[pii\]](https://doi.org/10.1080/13813457.2013.820412))

- DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl* 2004; (em impressão, doi: 10.1111/j.1368-504x.2004.00389.x): 9-21 (doi: 10.1111/j.1368-504x.2004.00389.x)
- Deng J, Guo Y, Yuan F, Chen S, Yin H, Jiang X et al. Autophagy inhibition prevents glucocorticoid-increased adiposity via suppressing BAT whitening. *Autophagy* 2020; 16: 451-465 (doi: 10.1080/15548627.2019.1628537)
- Dinakaran D, Manjunatha N, Naveen Kumar C, Suresh BM. Neuropsychiatric aspects of COVID-19 pandemic: A selective review. *Asian J Psychiatr* 2020; 53: 102188 (doi: 10.1016/j.ajp.2020.102188)
- Dulloo AG, Miller DS. Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62: 235-240 (doi: 10.1139/y84-035)
- Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 1229-1237 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.007)
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428 (doi: 10.1016/s0140-6736(05)66378-7)
- Eknoyan G. A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006; 13: 421-427 (doi: 10.1053/j.ackd.2006.07.002)
- Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2012; 61: 1801-1813 (doi: 10.2337/db11-0832)
- Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 1-17 (doi: 10.1007/978-3-319-48382-5\_1)
- Fall T, Ingelsson E. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 740-757 (doi: 10.1016/j.mce.2012.08.018)
- Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Santana-Oliveira DA, Oliveira-Cordeiro B, Rangel-Azevedo C, Silva-Veiga FM et al. Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur J Nutr* 2021; (em impressão, doi: 10.1007/s00394-021-02542-y): (doi: 10.1007/s00394-021-02542-y)
- Fischer AW, Shabalina IG, Mattsson CL, Abreu-Vieira G, Cannon B, Nedergaard J et al. UCP1 inhibition in Cidea-overexpressing mice is physiologically counteracted by brown adipose tissue hyperrecruitment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; 312: E72-e87 (doi: 10.1152/ajpendo.00284.2016)
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83: S192-203 (doi: 10.2223/jped.1709)
- Foster DO, Frydman ML. 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* 1978; 56: 110-122 (doi: 10.1139/y78-015)
- Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 2010; 11: 253-256 (doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.004)

- Gao P, Jiang Y, Wu H, Sun F, Li Y, He H et al. Inhibition of Mitochondrial Calcium Overload by SIRT3 Prevents Obesity- or Age-Related Whitening of Brown Adipose Tissue. *Diabetes* 2020; 69: 165-180 (doi: 10.2337/db19-0526)
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007; 131: 242-256 (doi: 10.1016/j.cell.2007.10.004)
- Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; 516: 395-399 (doi: 10.1038/nature13816)
- Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol* 2016; 2016: 1216783 (doi: 10.1155/2016/1216783)
- Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26: 193-200 (doi: 10.1016/j.tem.2015.01.006)
- Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2015; 241: 27-35 (doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.812)
- Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006; 312: 734-737 (doi: 10.1126/science.1123965)
- Haraida S, Nerlich AG, Wiest I, Schleicher E, Löhrs U. Distribution of basement membrane components in normal adipose tissue and in benign and malignant tumors of lipomatous origin. *Mod Pathol* 1996; 9: 137-144
- Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010; 23: 270-299 (doi: 10.1017/S0954422410000168)
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252-1263 (doi: 10.1038/nm.3361)
- Haslam D. Weight management in obesity - past and present. *Int J Clin Pract* 2016; 70: 206-217 (doi: 10.1111/ijcp.12771)
- Hooper L, Martin N, Jimoh OF, Kirk C, Foster E, Abdelhamid AS. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 8: Cd011737 (doi: 10.1002/14651858.CD011737.pub3)
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91 (doi: 10.1126/science.7678183)
- Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 2015; 33: 673-689 (doi: 10.1007/s40273-014-0243-x)
- Hull RL, Willard JR, Struck MD, Barrow BM, Brar GS, Andrikopoulos S et al. High fat feeding unmasks variable insulin responses in male C57BL/6 mouse substrains. *J Endocrinol* 2017; 233: 53-64 (doi: 10.1530/joe-16-0377)
- Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 2010; 107: 579-591 (doi: 10.1161/circresaha.110.225698)

- Ježek P, Holendová B, Garlid KD, Jabůrek M. Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal* 2018; 29: 667-714 (doi: 10.1089/ars.2017.7225)
- Kapoor SK, Anand K. Nutritional transition: a public health challenge in developing countries. *J Epidemiol Community Health* 2002; 56: 804-805 (doi: 10.1136/jech.56.11.804)
- Khaw KT, Sharp SJ, Finikarides L, Afzal I, Lentjes M, Luben R et al. Randomised trial of coconut oil, olive oil or butter on blood lipids and other cardiovascular risk factors in healthy men and women. *BMJ Open* 2018; 8: e020167 (doi: 10.1136/bmjopen-2017-020167)
- Kolditz CI, Langin D. Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 377-381 (doi: 10.1097/MCO.0b013e32833bed6a)
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643 (doi: 10.1038/35007508)
- Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS Lett* 2010; 584: 3250-3259 (doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.035)
- Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res* 2018; 59: 784-794 (doi: 10.1194/jlr.M079665)
- Kralisch S, Hoffmann A, Kloting N, Frille A, Kuhn H, Nowicki M et al. The brown fat-secreted adipokine neuregulin 4 is decreased in human and murine chronic kidney disease. *Eur J Endocrinol* 2019; 181: 151-159 (doi: 10.1530/EJE-19-0017)
- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 1243-1250 (doi: 10.1172/jci15736)
- Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* 2008; 34: 317-327 (doi: 10.1016/j.diabet.2008.04.001)
- Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 372-376 (doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.008)
- Lanthier N, Leclercq IA. Adipose tissues as endocrine target organs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 545-558 (doi: 10.1016/j.bpg.2014.07.002)
- Lee SH, Park HS, Lee JA, Song YS, Jang YJ, Kim JH et al. Fibronectin gene expression in human adipose tissue and its associations with obesity-related genes and metabolic parameters. *Obes Surg* 2013; 23: 554-560 (doi: 10.1007/s11695-012-0801-2)
- Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E617-626 (doi: 00010.2005 [pii]10.1152/ajpendo.00010.2005)
- Lo K, Wong M, Khalechelvam P, Tam W. Waist-to-height ratio, body mass index and waist circumference for screening paediatric cardio-metabolic risk factors: a meta-analysis. *Obes Rev* 2016; 17: 1258-1275 (doi: 10.1111/obr.12456)

- Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* 2019; 20: (doi: 10.3390/ijms20092358)
- Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404: 652-660 (doi: 10.1038/35007527)
- Magdalon J, Festuccia WT. Regulation of adiposity by mTORC1. *Einstein (Sao Paulo)* 2017; 15: 507-511 (doi: S1679-45082017000400507 [pii] 10.1590/S1679-45082017RB4106)
- Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 2013; 8: e64258 (doi: 10.1371/journal.pone.0064258)
- Mahdaviani K, Chess D, Wu Y, Shirihai O, Aprahamian TR. Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism* 2016; 65: 26-35 (doi: 10.1016/j.metabol.2015.09.012)
- Malta DC, Szwarcwald CL, Barros MBA, Gomes CS, Machado Í E, Souza Júnior PRB et al. The COVID-19 Pandemic and changes in adult Brazilian lifestyles: a cross-sectional study, 2020. *Epidemiol Serv Saude* 2020; 29: e2020407 (doi: 10.1590/s1679-49742020000400026)
- Martinez-Sanchez N. There and Back Again: Leptin Actions in White Adipose Tissue. *Int J Mol Sci* 2020; 21: (doi: 10.3390/ijms21176039)
- Martins APB. É PRECISO TRATAR A OBESIDADE COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. *Rev. adm. empres.* 2018; 58: (doi: <https://doi.org/10.1590/S0034-759020180312>)
- Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab* 2013; 17: 851-859 (doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.008)
- McNeel RL, Mersmann HJ. Low- and high-carbohydrate diets: body composition differences in rats. *Obes Res* 2005; 13: 1651-1660 (doi: 10.1038/oby.2005.203)
- Mercer SW, Trayhurn P. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J Nutr* 1987; 117: 2147-2153 (doi: 10.1093/jn/117.12.2147)
- Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR- $\alpha$  activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition* 2020; 78: 110791 (doi: 10.1016/j.nut.2020.110791)
- Morris MJ, Beilharz JE, Maniam J, Reichelt AC, Westbrook RF. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 58: 36-45 (doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.12.002)
- Nagy C, Einwallner E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). *J Vis Exp* 2018; (em impressão, doi: 10.3791/56672): (doi: 10.3791/56672)
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-452 (doi: 10.1152/ajpendo.00691.2006)

- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: E20-36 (doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05905.x)
- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008; 92: 272-283 (doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x)
- Niswender K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 267-287 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2009.01175.x)
- Okla M, Wang W, Kang I, Pashaj A, Carr T, Chung S. Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) attenuates adaptive thermogenesis via endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2015; 290: 26476-26490 (doi: 10.1074/jbc.M115.677724)
- Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 2012; 122: 545-552 (doi: 10.1172/jci60433)
- Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6: 33-42 (doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.33)
- Pellegrinelli V, Peirce VJ, Howard L, Virtue S, Türei D, Senzacqua M et al. Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. *Nat Commun* 2018; 9: 4974 (doi: 10.1038/s41467-018-07453-x)
- Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000; 16: 903-908 (doi: 10.1016/s0899-9007(00)00427-5)
- Petrakis D, Margină D, Tsarouhas K, Tekos F, Stan M, Nikitovic D et al. Obesity - a risk factor for increased COVID-19 prevalence, severity and lethality (Review). *Mol Med Rep* 2020; 22: 9-19 (doi: 10.3892/mmr.2020.11127)
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. 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* 2010; 285: 7153-7164 (doi: 10.1074/jbc.M109.053942)
- Poher AL, Altirriba J, Veyrat-Durebex C, Rohner-Jeanrenaud F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Front Physiol* 2015; 6: 4 (doi: 10.3389/fphys.2015.00004)
- Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res* 2002; 34: 629-634 (doi: 10.1055/s-2002-38252)
- Raatz SK, Conrad Z, Johnson LK, Picklo MJ, Jahns L. Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9050438)
- Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 402: 86-94 (doi: 10.1016/j.mce.2014.12.027)

Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* 2017; 134: 3-8 (doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.018)

Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 2000; 529 Pt 1: 3-10 (doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00003.x)

Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 309: E691-714 (doi: 10.1152/ajpendo.00297.2015)

Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med* 2016; 16: 533-544 (doi: 10.2174/1566524016666160523143937)

Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 2012; 58: 15-23 (doi: 10.1159/000321319)

Sanchis-Gomar F, Lavie CJ, Mehra MR, Henry BM, Lippi G. Obesity and Outcomes in COVID-19: When an Epidemic and Pandemic Collide. *Mayo Clin Proc* 2020; 95: 1445-1453 (doi: 10.1016/j.mayocp.2020.05.006)

Sbarbati A, Morroni M, Zancanaro C, Cinti S. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *Int J Obes* 1991; 15: 581-587 (doi: 10.1038/sj.ijo.1991.0011)

Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutr Metab* 2015; 66 Suppl 2: 7-12 (doi: 10.1159/000375143)

Shao SS, Zhao YF, Song YF, Xu C, Yang JM, Xuan SM et al. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2014; 35: 1411-1420 (doi: 10.1038/aps.2014.82)

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest* 2014; 124: 2099-2112 (doi: 10.1172/JCI71643)

Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Curr Obes Rep* 2015; 4: 224-229 (doi: 10.1007/s13679-015-0157-8)

Silva-Veiga FM, Rachid TL, de Oliveira L, Graus-Nunes F, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 474: 227-237 (doi: 10.1016/j.mce.2018.03.013)

Smith RE. THERMOREGULATORY AND ADAPTIVE BEHAVIOR OF BROWN ADIPOSE TISSUE. *Science* 1964; 146: 1686-1689 (doi: 10.1126/science.146.3652.1686)

Smith RE, Hock RJ. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science* 1963; 140: 199-200 (doi: 10.1126/science.140.3563.199)

Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 2005; 48: 58-67 (doi: 10.1007/s00125-004-1605-2)

- Souza-Mello V, Gregório BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 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)* 2010; 119: 239-250 (doi: 10.1042/cs20100061)
- Souza-Mello V, Gregório BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas* 2011; 40: 715-722 (doi: 10.1097/MPA.0b013e3182153922)
- Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 2013; 62: 1774-1782 (doi: 10.2337/db12-1665)
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2013; 123: 215-223 (doi: 10.1172/jci62308)
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56: 2910-2918 (doi: 10.2337/db07-0767)
- Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019; 19: 477-489 (doi: 10.1038/s41577-019-0165-0)
- Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011; 378: 804-814 (doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-783 (doi: 10.1038/nri1937)
- Tutunchi H, Ostadrahimi A, Hosseinzadeh-Attar MJ, Miryan M, Mobasser M, Ebrahimi-Mameghani M. A systematic review of the association of neuregulin 4, a brown fat-enriched secreted factor, with obesity and related metabolic disturbances. *Obes Rev* 2020; 21: e12952 (doi: 10.1111/obr.12952)
- van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest* 2013; 123: 3395-3403 (doi: 10.1172/jci68993)
- Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 2001; 170: 323-332 (doi: 10.1677/joe.0.1700323)
- Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giral M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 26-35 (doi: 10.1038/nrendo.2016.136)
- Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giral M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol* 2019; 243: R19-r27 (doi: 10.1530/joe-19-0295)
- Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305: E567-572 (doi: 10.1152/ajpendo.00250.2013)

- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360: 1518-1525 (doi: 10.1056/NEJMoa0808949)
- Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 2012; 53: 619-629 (doi: 10.1194/jlr.M018846)
- Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaff MJ, Wehkamp J et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr* 2017; 147: 770-780 (doi: 10.3945/jn.116.242859)
- Wadden TA, McGuckin BG, Rothman RA, Sargent SL. Lifestyle modification in the management of obesity. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 452-463 (doi: 10.1016/s1091-255x(03)00048-9)
- Wang Y, Huang S, Yu P. Association between circulating neuregulin4 levels and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2019; 14: e0225705 (doi: 10.1371/journal.pone.0225705)
- Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Arch Dis Child* 2006; 91: 612-617 (doi: 10.1136/adc.2005.085522)
- White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P et al. Human adipisin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* 1992; 267: 9210-9213 (doi: 10.1074/jbc.267.14.9210)
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149: 871-885 (doi: 10.1016/j.cell.2012.02.066)
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150: 366-376 (doi: S0092-8674(12)00595-8 [pii]10.1016/j.cell.2012.05.016)
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27: 234-250 (doi: 10.1101/gad.211649.112)
- Wu KK, Cheung SW, Cheng KK. NLRP3 Inflammasome Activation in Adipose Tissues and Its Implications on Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 2020; 21: (doi: 10.3390/ijms21114184)
- Yamashita H, Kizaki T, Ookawara T, Sato Y, Yamamoto M, Ohira Y et al. Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sci* 1994; 55: 141-148 (doi: 10.1016/0024-3205(94)90105-8)
- You W, Xu Z, Sun Y, Valencak TG, Wang Y, Shan T. GADD45 $\alpha$  drives brown adipose tissue formation through upregulating PPAR $\gamma$  in mice. *Cell Death Dis* 2020; 11: 585 (doi: 10.1038/s41419-020-02802-5)
- Zhang L, Yang Z, Liu Y. GADD45 proteins: roles in cellular senescence and tumor development. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239: 773-778 (doi: 10.1177/1535370214531879)

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432 (doi: 10.1038/372425a0)

Zhao M, Zang B, Cheng M, Ma Y, Yang Y, Yang N. Differential responses of hepatic endoplasmic reticulum stress and inflammation in diet-induced obese rats with high-fat diet rich in lard oil or soybean oil. *PLoS One* 2013; 8: e78620 (doi: 10.1371/journal.pone.0078620)

Zhao Y, Li X, Yang L, Eckel-Mahan K, Tong Q, Gu X et al. Transient Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor A in Adipose Tissue Promotes Energy Expenditure via Activation of the Sympathetic Nervous System. *Mol Cell Biol* 2018; 38: (doi: 10.1128/mcb.00242-18)

## ANEXO A – Comitê de Ética



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



## CERTIFICADO

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

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

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

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

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

**ANEXO B** – Artigo publicado no *European Journal of Nutrition* (fator de impacto 5.614)

European Journal of Nutrition  
<https://doi.org/10.1007/s00394-021-02542-y>

REVIEW



## Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas

Aline Fernandes-da-Silva<sup>1</sup> · Caroline Santos Miranda<sup>1</sup> · Daiana Araujo Santana-Oliveira<sup>1</sup> ·  
Brenda Oliveira-Cordeiro<sup>1</sup> · [Camilla Rangel-Azevedo<sup>1</sup>](#) · Flávia Maria Silva-Veiga<sup>1</sup> · Fabiane Ferreira Martins<sup>1</sup> ·  
Vanessa Souza-Mello<sup>1</sup>

Received: 11 July 2020 / Accepted: 11 March 2021  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Obesity challenges lipid and carbohydrate metabolism. The resulting glucolipotoxicity causes endoplasmic reticulum (ER) dysfunction, provoking the accumulation of immature proteins, which triggers the unfolded protein reaction (UPR) as an attempt to reestablish ER homeostasis. When the three branches of UPR fail to correct the unfolded/misfolded proteins, ER stress happens. Excessive dietary saturated fatty acids or fructose exhibit the same impact on the ER stress, induced by excessive ectopic fat accumulation or rising blood glucose levels, and meta-inflammation. These metabolic abnormalities can alleviate through dietary interventions. Many pathways are disrupted in adipose tissue, liver, and pancreas during ER stress, compromising browning and thermogenesis, favoring hepatic lipogenesis, and impairing glucose-stimulated insulin secretion within pancreatic beta cells. As a result, ER stress takes part in obesity, hepatic steatosis, and diabetes pathogenesis, arising as a potential target to treat or even prevent metabolic diseases. The scientific community seeks strategies to alleviate ER stress by avoiding inflammation, apoptosis, lipogenesis suppression, and insulin sensitivity augmentation through pharmacological and non-pharmacological interventions. This comprehensive review aimed to describe the contribution of excessive dietary fat or sugar to ER stress and the impact of this adverse cellular environment on adipose tissue, liver, and pancreas function.

- PMID: 33742254
- DOI: [10.1007/s00394-021-02542-y](https://doi.org/10.1007/s00394-021-02542-y)