



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Bruna Cadete Martins

**Efeito do consumo de café sobre o remodelamento do tecido adiposo em
modelo murinho de obesidade**

Rio de Janeiro

2021

Bruna Cadete Martins

Efeito do consumo de café sobre o remodelamento do tecido adiposo em modelo murinho de obesidade

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Coorientadora: Profa. Dra. Nathália Moura Nunes

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CEH/A

M386 Martins, Bruna Cadete
Efeito do consumo de café sobre o remodelamento do tecido adiposo em modelo murinho de obesidade / Bruna Cadete Martins. - 2021.
81f.

Orientador: Júlio Beltrame Delaprane.
Coorientadora: Nathália Moura Nunes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição - Teses. 2. Tecido adiposo - Teses. 3. Obesidade - Teses. I. Delaprane, Júlio Beltrame. II. Nunes, Nathália Moura. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

mvf

CDU 612.3

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

Assinatura

Data

Bruna Cadete Martins

**Efeito do consumo de café sobre o remodelamento do tecido adiposo em modelo
murinho de obesidade**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em 28 de julho de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Sandra Fernandes Arruda

Universidade de Brasília - UNB

Prof.^a Dr.^a. Vanessa Souza Mello

Instituto de Nutrição - UERJ

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Ao meu pai por todo amor e apoio dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus que é a força maior que rege todas as minhas realizações e por mais esta conquista;

Aos meus pais por todo o amor e dedicação, por sempre acreditarem em mim e fazer o meu sonho o de vocês. Obrigada pela confiança e força. Pai mesmo não estando presente fisicamente, você continua sendo meu incentivador número um;

Ao melhor companheiro da vida que eu poderia ter, meu irmão Felipe; As minhas avós por todas as orações e palavras de conforto;

A minha dinda e tias por sempre me apoiarem e torcerem por mim;

Aos meus primos e, em especial, a Luiza, que desde que nasceu é como se fosse um sopro de vida para mim, me passando tanto amor e força;

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Julio Beltrame e Prof^a. Dr^a Nathália Nunes, por todo o ensinamento nessa caminhada, por contribuírem com o meu crescimento acadêmico e de vida e, pelo desenvolvimento desse trabalho. Vocês foram maravilhosos, me senti acolhida no pior momento da minha vida, vocês tiveram toda a paciência comigo, tornando meu sonho realidade; Ao meu IC, Alexandre Soares, pelo companheirismo, caronas e risadas no meio da loucura que foi fazer pesquisa experimental em plena quarentena;

Aos meus colegas de laboratório LEING e IBRAG, pelos ensinamentos, ajuda, conversas, nada seria possível sem o auxílio de vocês. Em especial, a Fabiane Martins, que foi uma maravilhosa surpresa nessa minha caminhada;

A minha segunda família, casa 28, por todo o apoio, incentivo, confiança e amor. Eu não vivo sem vocês;

Aos meus melhores amigos da vida, Anny Carollyni, Anny Alves, Isabella, Luiza e Victor pela amizade de anos, paciência, lanches, apoio, amor, confiança, por tornarem minha vida mais leve e surtarem comigo quando necessário. Amo vocês demais;

As minhas amigas da graduação, Nathália, Karine e Jade pela torcida e carinho de sempre; Ao corpo docente que integra o programa de pós-graduação;

Aos técnicos e funcionários da UERJ por todo suporte oferecido;

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

“A invenção do hoje é o meu único meio de instaurar o futuro.”

Clarice Lispector

RESUMO

MARTINS, Bruna Cadete. *Efeito do consumo de café sobre o remodelamento do tecido adiposo em modelo murinho de obesidade*. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A obesidade é um problema de saúde pública mundial, de origem multifatorial com repercussões negativas à saúde levando ao aumento da massa de tecido adiposo (TA). O TA é composto por diferentes células, dentre elas os adipócitos. Os adipócitos podem ser brancos, caracterizados como reservatório energéticos, ou adipócitos marrons, especializados na produção de energia, dissipando-a na forma de calor, aumentando assim o gasto energético. Adicionalmente, os adipócitos classificados como beges, que são adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) que expressam genes termogênicos semelhante ao do tecido adiposo marrom (TAM), caracterizando o efeito conhecido como *browning*. Estudos recentes demonstram que transdiferenciação do TAB a TAM pode ser mediada por compostos bioativos presentes nos alimentos. O café é um alimento popular, rico em compostos bioativos que apresentam efeitos biológicos resultantes da ação sinérgica destes compostos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito preventivo e terapêutico do consumo de café sobre os aspectos metabólicos e moleculares do remodelamento do tecido adiposo em modelo murino de obesidade induzido por dieta hiperlipídica. Cinquenta camundongos da cepa C57BL/6 com 90 dias de vida foram divididos em três grupos: Controle (C) dieta padrão AIN-93M (n=10); High-fat (HF) dieta hiperlipídica dieta rica em banha de porco com 50% de energia proveniente de lipídeos (n=25) e café prevenção (HF-CP) dieta rica em banha de porco com 50% de energia proveniente de lipídeos adicionada de 1% p/p de café (n=15). Após 10 semanas, o grupo HF deu origem ao grupo café tratamento (HF-CT) dieta rica em banha de porco com 50% de energia proveniente de lipídeos adicionada de 1% p/p de café (n=15). Ao final do experimento, na 14ª semana, o grupo HF-CP apresentou massa corporal inferior ao grupo HF (-8%, $p < 0,05$) e melhor distribuição do TA, com maior massa para o compartimento de TAB subcutâneo, do TAM e redução do TAB visceral. Além disso, os adipócitos do TAB epididimário do grupo HF-CP apresentaram menor hipertrofia e menor área seccional média. No grupo HF-CT houve tendência de melhora na morfologia. Ambos os grupos que receberam café associados a dieta hiperlipídica apresentaram melhora no metabolismo de glicose quando comparados ao grupo HF, o teste de tolerância à glicose do grupo HF-CP foi semelhante à do grupo C, e embora o grupo HF-CT, não tenha se igualado ao mesmo valor do grupo C, foi inferior ao grupo HF (-8%, $p < 0,05$). O consumo de café preveniu a hiperinsulinemia e hiperleptinemia no grupo HF-CP, esse grupo não desenvolveu RI e no grupo HF-CT a hiperinsulinemia foi atenuada. A concentração plasmática de IL-6 foi reduzida nos grupos tratados com café quando comparados ao grupo HF, redução maior no grupo HF-CP. A expressão de genes envolvidos na termogênese adaptativa e biogênese mitocondrial (PPAR γ , PRDM16, PCG1 α , R β 3A, UCP-1, OPA-1) foi superior no TAB e no TAM dos animais HF-CP e HF-CT, sendo no modelo de prevenção mais efetivo, assim como, a imunofluorescência da UCP-1 no TAM desses animais. O café apresentou melhores efeitos quando consumido de maneira preventiva com melhor remodelamento do TA, com manutenção do fenótipo marrom, atividade termogênica. Além disso, foi capaz de atenuar o ganho de massa corporal, melhorar a homeostase da glicose e da leptina. Quando consumido após a indução da obesidade, como tratamento, não foi tão efetivo quanto à prevenção, porém, também houve melhor remodelamento do TA com atenuação do *whitening*, maior expressão de genes termogênicos e reversão da hipersinsulinemia.

Palavras chaves: Obesidade. Tecido adiposo. Inflamação. Browning. Termogênese adaptativa. Café.

ABSTRACT

MARTINS, Bruna Cadete. *Effect of coffee consumption on adipose tissue remodeling in murine model of obesity*. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Obesity is a global public health problem, of multifactorial origin, with negative repercussions on health, with an increase in adipose tissue mass. Adipose tissue is composed of different cells, including adipocytes. Adipocytes can be white, characterized as an energy reservoir, or brown adipocytes, specialized in energy production, dissipating it in the form of heat, thus increasing energy expenditure. Additionally, adipocytes classified as beige, which are TAB adipocytes that express thermogenic genes similar to TAM, characterizing the effect known as browning. Recent studies demonstrate that transdifferentiation from TAB to TAM can be mediated by bioactive compounds present in food. Coffee is a popular food, rich in bioactive compounds that have biological effects resulting from the synergistic action of these compounds. The objective of this work was to evaluate the preventive and therapeutic effect of coffee consumption on the metabolic and molecular aspects of adipose tissue remodeling in a murine model of high-fat diet-induced obesity. Fifty 90-day-old C57BL/6 mice were divided into three groups: Control (C) standard diet AIN-93M (n=10); High-fat (HF) high-fat diet lard-rich diet with 50% energy from lipids (n=25) and Prevention Coffee (HF-CP) lard-rich diet with 50% energy from added lipids 1% w/w coffee (n=15). After 10 weeks, the HF group gave rise to the treatment coffee group (HF-CT) a lard-rich diet with 50% energy from lipids added with 1% w/w coffee (n=15). At the end of the experiment, the HF-CP group had lower body mass than the HF group (-8%, $p < 0.05$) and better distribution of TA, with greater mass for the subcutaneous TAB compartment, TAM and reduced TAB visceral. In addition, the adipocytes from the epididymal TAM of the HF-CP group showed less hypertrophy and a smaller mean sectional area. In the HF-CT group, this improvement was slighter. Both groups that received coffee associated with a high-fat diet showed an improvement in glucose metabolism when compared to the HF group, and the glucose tolerance test in the HF-CP group was similar to that in the C group, and although the HF-CT group, did not equal the same value as in group C, it was lower than in group HF (-8%, $p < 0.05$). Coffee consumption prevented hyperinsulinemia and hyperleptinemia in the HF-CP group and in the HF-CT group only hyperinsulinemia. The plasma concentration of IL-6 was reduced in the groups treated with coffee when compared to the HF group. The expression of genes involved in adaptive thermogenesis and mitochondrial biogenesis was higher in the TAB and TAM of HF-CP and HF-CT animals, being the most effective prevention model, as well as the immunofluorescence of UCP-1 in the TAM of these animals. Coffee showed better effects when consumed preventively with better TA remodeling, with the maintenance of the brown phenotype, thermogenic activity. Furthermore, it was able to attenuate body mass gain, improve glucose and leptin homeostasis. When consumed after obesity induction, as a treatment, there was also better AT remodeling with attenuation of whitening, greater expression of thermogenic genes and reversal of hyperinsulinemia.

Key words: Obesity. Adipose tissue. Inflammation. Browning. Adaptive thermogenesis.

Coffee.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Alterações morfológicas no tecido adiposo resultantes do ganho excessivo de Peso.....	17
Figura 2 -	Adipocinas e suas ações sistêmicas.....	22
Figura 3 -	Regulação transcricional da diferenciação e ativação do adipócito marrom	25
Figura 4 -	Composição química de grãos de café verde.....	30
Figura 5 -	Composição química de grãos de café torrado.....	30
Figura 6 -	Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico.....	32
Figura 7 -	Estrutura química da cafeína.....	33
Figura 8 -	Café liofilizado adicionado à ração.....	38
Figura 9 -	Fórmula de transição de dose entre humanos e animais baseada na área Corporal.....	39
Figura 10 -	Delineamento Experimental.....	41
Figura 11 -	Evolução da massa corporal.....	48
Figura 12	Distribuição do tecido adiposo branco e marrom.....	49
Figura 13 -	TOTG e área sob a curva dos níveis plasmáticos de glicose.....	50
Figura 14 -	Morfologia do TAB.....	53
Figura 15	Morfologia do TAM.....	53
Figura 16 -	Imunofluorescência e imagens termográficas.....	54
Figura 17 -	Expressão de genes envolvidos na termogênese no TAM.....	55
Figura 18 -	Expressão de genes envolvidos na termogênese no TAB.....	57
Figura 19 -	Expressão de genes envolvidos na termogênese do tecido adiposo subcutâneo, subcutâneo dos animais submetidos à intervenção com café.oncomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nasúltimas 4 semanas.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das rações ofertadas.....	40
Tabela 2 -	Comportamento alimentar.....	47
Tabela 3 -	Análise bioquímica do plasma.....,	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AG	Ácido Graxo
AGL	Ácidos graxos livres
AMP	Adenosinamonofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATGL	Lipase de triacilgliceróis dos adipócitos
BE	Balanco energético
C/EBP	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT
C/EBP α	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT α
C/EBP β	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT β
C/EBP δ	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT δ
CGA	Ácidosclorogênicos
ChREBP	Proteína de ligação a elementos responsivos acarboidrato
DAG	Hidrolase dediacilglicerol
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doença carviovascular
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
FAS	Ácido graxosintase
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase-3 β
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
LHS	Lipase hormônio sensível
L-PK	Piruvato quinase do fígado
LPL	Lipoteínalipase
MAG	Lipase demonoacilglicerol
MAPK	Proteína quinase ativada pormitógeno
Myf5-	Fator miogênico 5 negativo
Myf5+	Fator miogênico 5 positivo

OMS	Organização Mundial da Saúde
PCG1- α	Coativador de 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ
RI	Resistência a Insulina
R β 3A	Receptor 3 β adrenergico
SCD1	Esteari- 1CoA- desaturase 1
SM	Síndrome metabólica
SREBP1c	Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABe	Tecido adiposo bege
TAM	Tecido adiposo marrom
TAMi	Tecido adiposo marrom interescapular
TG	Triglicerídeo
TNF α	Fator de necrose tumoral
UCP-1	Proteína desacopladora- 1
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	Obesidade	16
1.2	Tecido Adiposo (TA)	19
1.2.1	<u>Tecido Adiposo Branco (TAB)</u>	19
1.2.1.1	Metabolismo do TAB	20
1.2.1.2	Adipogênese	22
1.2.2	<u>Tecido Adiposo Marrom (TAM)</u>	24
1.2.2.1	Metabolismo do TAM	25
1.3	Remodelamento do Tecido Adiposo: <i>Browning</i> e <i>Whitening</i>	26
1.3.1	<u><i>Browning</i> e Tecido Adiposo Bege (TABe)</u>	26
1.3.2	<u><i>Whitening</i></u>	27
1.4	Efeito do café sobre o remodelamento do tecido adiposo	29
1.4.1	<u>Características botânicas, produção e consumo de café</u>	29
1.4.2	<u>Composição química</u>	29
1.4.2.1	Ácidos clorogênicos	31
1.4.2.2	Cafeína	32
1.4.3	<u>Efeito do café e seus compostos bioativos sobre o remodelamento do TA</u>	33
2	OBJETIVO	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivo Específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Café	38
3.2	Dieta e modelo experimental	38
3.3	Consumo alimentar e evolução ponderal	41
3.4	Teste de tolerância oral à glicose (TOTG)	42
3.5	Termografia	42
3.6	Eutanásia	42

3.7	Análises Bioquímicas	43
3.8	Perfil inflamatório	43
3.9	Índice HOMA-IR	43
3.10	Análise histológica do tecido adiposo	43
3.11	Estereologia	44
3.12	Imunofluorescência	44
3.13	Expressão gênica	44
3.14	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Comportamento alimentar e massa corporal	47
4.2	Distribuição de gordura corporal	48
4.3	Teste de tolerância oral à glicose	50
4.4	Análises Bioquímicas	51
4.5	Estereologia do TAB	52
4.6	Morfologia do TAM	53
4.7	Imunofluorescência e termografia	54
4.8	Expressão de genes envolvidos na termogênese do 55	55
4.8.1	<u>TAM</u>	55
4.8.2	<u>TAB Subcutâneo</u>	58
5	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO 1 -Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais	
	Experimentais (CEUA)	81

INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial. No Brasil, o IBGE na última Pesquisa Nacional de Saúde, em 2013, demonstrou que um a cada cinco adultos era obeso. Em 2019, a prevalência de obesidade na população brasileira era cerca de 20% (Ministério da Saúde, 2019). Devido ao acúmulo de gordura corporal, essa condição pode levar ao desenvolvimento de outras comorbidades, incluindo a diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), alguns tipos de câncer, entre outras (Hammarstedt *et al.*, 2018). A obesidade é considerada uma doença multifatorial que surge de interações complexas entre genes e fatores ambientais (ex: alimentação e prática de atividade física) e resulta de um desequilíbrio entre consumo e gasto de energia, levando a um balanço energético positivo a longo prazo e ao consequente aumento excessivo de gordura corporal (Perez-Cornago *et al.*, 2014).

O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino e pode ser dividido em tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo bege (TABe). Os adipócitos brancos são especializados em armazenar energia, enquanto os adipócitos marrons dissipam energia na forma de calor. Os beges são adipócitos do TAB que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1) em resposta à estímulo adrenérgico ou ao frio. As respostas termogênicas nos adipócitos marrons e beges dependem da abundância da UCP-1, proteína mitocondrial que é responsável pelo desacoplamento respiratório durante a termogênese (Ricquier, 2017).

Indivíduos obesos apresentam menor quantidade de TAM com função diminuída pela baixa expressão da proteína UCP-1, resultando em menor atividade termogênica (Kwan *et al.*, 2017). O TAM adquire, então, uma aparência branca, que é o processo conhecido como *whitening*. Além do decréscimo da função termogênica, a infiltração lipídica desordenada ocorre nesse tecido e, como consequência, há o desarranjo na arquitetura celular, hipóxia, recrutamento de células imunes e morte celular, culminando na instalação de ambiente inflamatório (Cinti, 2001; Kotzbeck *et al.*, 2018). Por outro lado, *browning* é o termo utilizado para indicar a modificação das propriedades do TAB que passa a assumir características semelhantes às do TAM através do processo de transdiferenciação. Os adipócitos brancos começam a sintetizar marcadores de adipócitos marrons, incluindo a proteína UCP-1. Tornam-se, portanto, células

semelhantes à adipócitos marrons e são então denominadas de células beges. Estudos em animais indicam que tanto o processo de escurecimento das células do TAB quanto a ativação das células marrons pode ser mediada por nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos (Montanari *et al.*, 2017).

O café, bebida amplamente consumida no mundo, apresenta composição química complexa, com extensa variedade de compostos químicos que apresentam efeitos biológicos. Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de café reduz o risco de desenvolver obesidade e suas doenças associadas, principalmente, pela ação dos ácidos clorogênicos (CGA, do inglês *chlorogenic acids*) e da cafeína (Takahashi *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019). Os efeitos benéficos do café na obesidade e no desenvolvimento de suas comorbidades foi também demonstrado em estudos experimentais quando administrado na forma de bebida ou incorporado à ração (Fukushima *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2014; Maki *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2017).

A hipótese do presente trabalho é a de que o consumo de café promove o remodelamento do TA, especialmente aumentando o *browning* e reduzindo o *whitening*, levando a melhora dos agravos causados pelo consumo de dieta hiperlipídica.

1- REVISÃO DE LITERATURA

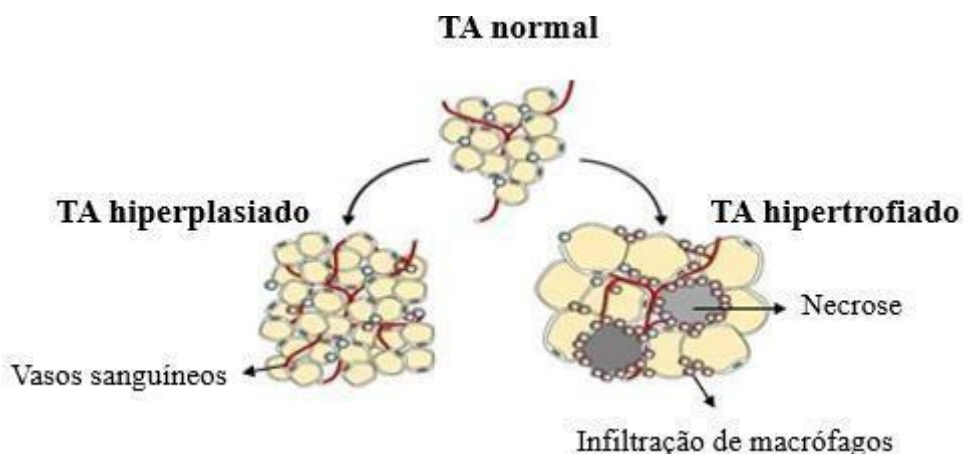
1.1. Obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a condição crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura que traz repercussões negativas à saúde, especialmente o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e câncer (Ministério da Saúde, 2020). Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial e sua elevada prevalência é observada em todos os níveis socioeconômicos da população. No Brasil, de acordo com a pesquisa intitulada Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquéritos Telefônicos – VIGITEL, a taxa de obesidade passou de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018 (Ministério da Saúde, 2019).

Os principais fatores associados ao crescimento das taxas de sobrepeso e obesidade são as alterações no consumo de alimentos e comportamentais ocorridas nas últimas décadas (Bray *et al.*, 2018). A modificação do padrão dietético, especialmente por meio do consumo elevado de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares simples, em conjunto com a redução da prática de atividade física, ocasionam um balanço energético positivo e levam a alterações no controle hipotalâmico da fome e saciedade que favorecem o aumento da massa e da adiposidade corporal (Bray *et al.*, 2018; Gregor; Hotamisligil, 2011; Jais; Brüning, 2017). O excesso de energia consumido tende a ser armazenado na forma de triglicerídeos (TG) e esse acúmulo causa mudanças morfológicas no TA, especialmente hipertrofia, quando o TA aumenta de tamanho, e hiperplasia, quando aumenta o número de células adiposas no TA.

O aumento desproporcional das dimensões celulares alonga a distância a ser percorrida pelo oxigênio difundido constituindo um ambiente hipóxico no TA. Restrições do fluxo sanguíneo (hipoperfusão) no TA tem como consequência a ativação das vias do fator de transcrição nuclear NFkB, aumento da expressão de genes envolvidos na inflamação com maior liberação de citocinas e recrutamento de macrófagos para o tecido e isquemia desse tecido, o que contribui para a instalação de um estado inflamatório (Figura 1) (Schenk *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2015; Jeremic *et al.*, 2017).

Figura 1. Alterações morfológicas no tecido adiposo resultantes do ganho excessivo de peso, infiltração de macrófagos, necrose de adipócitos, baixa irrigação e hipóxia



Legenda: TA – Tecido adiposo. Fonte: Adaptado de Ouch *et al.* (2011).

A inflamação crônica de baixo grau apresentada pelo TA hipertrofiado favorece o estabelecimento da resistência à insulina (RI) pela lipotoxicidade quando o TA ultrapassa sua capacidade de oxidar e estocar lipídios ocorre o chamado efeito lipotóxico que é relacionado com a diminuição da atividade de uma proteína da cascata de sinalização da insulina, a IRS-1 (substrato do receptor da insulina 1), prejudicando o transporte de glicose e, também pode prejudicar a translocação e síntese do transportador de glicose (GLUT4) no músculo esquelético e no TA. E, conseqüentemente, prejudicando a homeostase da glicose com possível desenvolvimento da DM2, bem como de outras DCNT (Ouch *et al.*, 2011). A associação de três ou mais comorbidades, geralmente associadas à obesidade, caracteriza a síndrome metabólica (SM) (Grover *et al.*, 2015; Gustafson *et al.*, 2015), um outro problema de saúde pública devido à elevada prevalência e aos altos custos envolvidos no seu tratamento (Schmidt *et al.*, 2011).

A região de distribuição do TA é um forte preditor de saúde metabólica na obesidade. Indivíduos obesos que expandem, majoritariamente, tecido adiposo branco intra-abdominal (“obesidade em forma de maçã”) estão em maior risco de doenças associadas à obesidade do que aqueles que acumulam tecido adiposo subcutâneo (“obesidade em forma de pêra”) (Vishvanath, Lavanya, & Rana, 2019). Uma razão para os efeitos prejudiciais do acúmulo de gordura visceral pode estar na localização do próprio depósito. Metabólitos e ácidos graxos livres podem ser drenados diretamente do

tecido adiposo branco (TAB) visceral para a circulação portal e prejudicar a função hepática (Rytka *et al.*, 2011). Além disso, a proximidade com o intestino torna a gordura visceral mais receptiva aos produtos derivados da microbiota intestinal (Geurts *et al.*, 2014; Hersoug *et al.*, 2016; Hersoug *et al.*, 2018).

As análises de TAB de indivíduos obesos revelam que o tamanho e o número dos adipócitos se correlacionam bem com o risco de síndrome metabólica, independente do IMC (Klötting *et al.*, 2010; Gustafson *et al.*, 2015). TAB de pacientes com síndrome metabólica, frequentemente, exibe um fenótipo patológico marcante: depósitos de gordura são caracterizados por adipócitos hipertróficos, hipóxia, fibrose e acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios (Lee *et al.*, 2010; Klötting *et al.*, 2010; Klötting *et al.*, 2015). Este fenótipo também se correlaciona bem com níveis mais baixos de adiponectina sérica e deposição de lipídeos ectópicos (Klötting *et al.*, 2010). Em contraste, os depósitos de TAB de indivíduos metabolicamente saudáveis contêm adipócitos numerosos e relativamente menores, bem como uma densidade de vasos sanguíneos relativamente maior.

Esses estudos apoiam uma "hipótese de expansibilidade limitada", em que a incapacidade dos depósitos TAB de se expandir adequadamente para atender às demandas de armazenamento de energia resulta em disfunção do tecido adiposo, deposição de lipídios ectópicos e resistência à insulina (Maldonado-Ruiz *et al.*, 2017).

Para o tratamento da obesidade, e conseqüente redução dos riscos de doenças associadas, é importante que se reduza a massa corporal. As variáveis da alimentação, com a redução do aporte calórico, e a prática de atividade física, para aumento do gasto energético são os pilares para o tratamento da obesidade (Ministério da Saúde, 2020).

Ainda nesse contexto, o consumo de compostos bioativos pode ser uma alternativa coadjuvante para a redução do acúmulo lipídico, sendo capaz de promover um efeito positivo na saúde (Bargut *et al.*, 2017; Graus-Nunes *et al.*, 2017; Concha *et al.*, 2019). Esse efeito é baseado na capacidade dos compostos em ativar a termogênese adaptativa sem tremores, aumentando o gasto calórico. Dentre esses compostos se destacam a capsaicina, carotenoides, curcumina, resveratrol, cafeína, polifenóis (Concha *et al.*, 2019), cinamaldeído (Jiang *et al.*, 2017) e proantocianidinas (Zhou *et al.*, 2020).

1.2. Tecido Adiposo (TA)

O TA é caracterizado por armazenar gordura na forma de TG em células especializadas, denominadas adipócitos (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). Essas células são as únicas que possuem especialização para armazenar lipídeos, até um limite, sem que isso comprometa a sua integridade funcional (Ahima & Flier, 2000).

1.2.1. Tecido Adiposo Branco (TAB)

Inicialmente, o TAB era caracterizado apenas como um reservatório energético de animais e seres humanos. Após a descoberta da leptina, ficou evidenciado que esse tecido, como consequência de estímulos neurais, nutricionais e hormonais, apresenta outras funções sistêmicas de caráter parácrino, autócrino e endócrino que ocorrem pela ação das adipocinas com funções neuroendócrinas, termogênicas, imunológicas e de controle da ingestão alimentar (Rodriguez *et al.*, 2015).

O TAB tem origem em células tronco mesenquimais multipotentes que não expressam o fator miogênico 5 (Myf5-) (Gustafson & Smith, 2015), residentes no estroma do TA e na medula óssea, que possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tecidos como adiposo, cartilaginoso, ósseo e muscular (Tang & Lane, 2012; Rosen & Spiegelman, 2014; Hammarstedt *et al.*, 2018). Em nível celular, a diferenciação das células tronco mesenquimais compreende duas fases: determinação e diferenciação terminal (Rosen & Spiegelman, 2014). A fase de determinação resulta no comprometimento dessas células com o fenótipo adipocítico. Sendo assim, a célula mesenquimal, análoga ao fibroblasto, é convertida em pré-adipócito, que assume morfologia semelhante à da sua célula precursora, entretanto sem o potencial de se diferenciar em outros tipos celulares. Na segunda fase (diferenciação terminal), o pré-adipócito passa a expressar diversos fatores de transcrição que induzem a sua diferenciação em adipócito (Rosen & Macdougald, 2006; Armani *et al.*, 2010). Dentre os fatores de transcrição envolvidos neste processo, destacam-se o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas γ (PPAR γ), considerado o regulador central do processo de adipogênese, e a família de proteínas ligadas ao amplificador CAAT, os C/EBPs (C/EBP- α , C/EBP- β e C/EBP- δ) (Zuo *et al.*, 2006; Rosen & Macdougald, 2006; Lefterova & Lazar, 2009).

O arranjo estrutural do TAB consiste em adipócitos circundados de tecido conjuntivo frouxo, apresentando ainda macrófagos, fibroblastos e pré-adipócitos, dentre

outros tipos celulares. É pouco innervado e exibe menor vascularização quando comparado aos outros tipos de TA. Apresenta gotícula unilocular localizada no centro do adipócito que ocupa a maior parte do volume celular, fazendo com que as demais organelas se desloquem para a periferia, que o núcleo fique achatado, e a célula apresente baixa densidade mitocondrial (Giralt & Villarroya, 2013; Kim *et al.*, 2016).

Os adipócitos apresentam a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos (AG), podendo estocá-los na forma de TG durante períodos de abundância energética (BE positivo) ou degradá-los quando houver déficit calórico (BE negativo). O sistema nervoso central age na regulação desses processos de estoque e degradação. Ele atua via atividade neural direta, através das divisões simpáticas e parassimpáticas do sistema nervoso autônomo, e sob a forma indireta, pela liberação da insulina que regula a lipólise (degradação de lipídeos) e a lipogênese (síntese de lipídeos) (Guarino *et al.*, 2017).

1.2.1.1. Metabolismo do TAB

A maior parte das reações metabólicas que ocorrem no TA, especialmente lipogênese e lipólise, são executadas pelo TAB.

A lipogênese é o processo caracterizado pela síntese de AG e TG no TA e no fígado que serão armazenados subsequentemente. A formação dos TG demanda o fornecimento de AG, que acontece pela alimentação, sob a forma direta, através da hidrólise dos TG e, sob a forma indireta, pela transformação da glicose em AG na síntese de novo.

Após a absorção, os TG são transportados pelos quilomícrons até os capilares, onde são hidrolisados pela enzima lipase lipoproteica (LPL), dando origem aos ácidos graxos livres (AGL) (Buzelle, 2016).

A síntese de novo ocorre sob influência das elevadas concentrações plasmáticas de glicose e insulina, por meio da ativação dos fatores de transcrição ChREBP e SREBP1c, respectivamente. Estes, por sua vez, promovem a transcrição de genes que expressam as enzimas lipogênicas ácido graxo sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), estearil-CoA-desaturase (SCD1), lipin-1 e piruvato quinase do fígado (L-PK) (Gluchowshi *et al.*, 2017). A glicose plasmática é captada pelo adipócito ou hepatócito, onde é convertida em piruvato que vai a acetil-coA e se associa ao oxalacetato para incorporação no ciclo do ácido tricarboxílico, sendo convertido a

citrato. Este é levado ao citoplasma onde é convertido em acetil-coA, pela enzima ATP-citrato liase. Parte da acetil-coA é metabolizada a malonil-coA pela enzima ACC e malonil-coA é utilizado pela enzima FAS para a formação de AG. Grande parte dos AG, independente da origem, é alongada pelas enzimas elongases e pode ser estocada, na forma de TG, para uso posterior como fonte de energia (Buzelle, 2016).

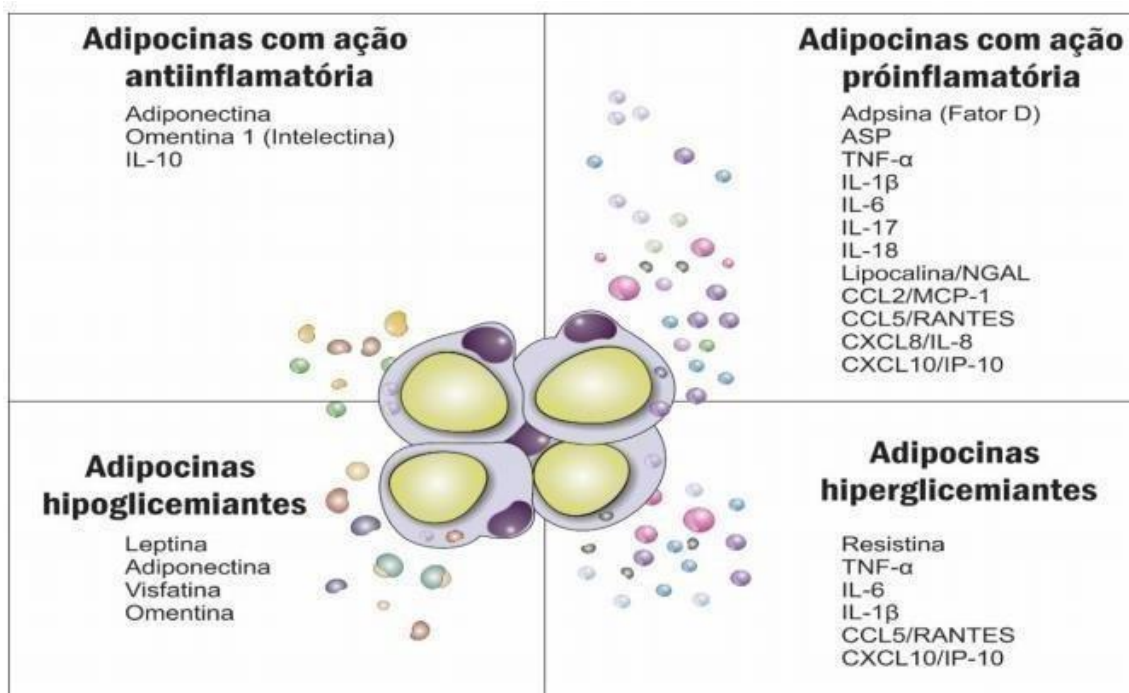
Outra função metabólica do TAB é a lipólise, que consiste na degradação de TG e posterior liberação de AG e glicerol. Participam desse processo enzimas classificadas como hidrolases, sendo as mais importantes: a lipase de triacilgliceróis dos adipócitos (ATGL), que apresenta alta especificidade para TG; a lipase hormônio sensível (LHS), que atua principalmente como hidrolase de diacilglicerol (DAG); e as lipases de monoacilglicerol (MAG), que finalizam a degradação dos TG, liberando o último AG e uma molécula de glicerol (Antonucci *et al.*, 2017).

A lipólise é majoritariamente regulada pelo sistema nervoso simpático. A ação das catecolaminas no TAB depende principalmente do fluxo plasmático de adrenalina e/ou da concentração de noradrenalina nas terminações de inervação simpática. As catecolaminas estimulam a lipólise através dos receptores β -1, β -2, β -3 adrenérgicos, principalmente o 3, e a inibem através dos receptores α -2 (Bargut *et al.*, 2017; Ricquier, 2017). A interação das catecolaminas com os receptores β , acoplados a proteína G estimulatória, resulta no aumento da atividade da enzima adenil ciclase, aumentando os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que leva a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA é responsável pela fosforilação da LHS e perilipina A, a principal proteína estrutural localizada na superfície da gota lipídica. A perilipina A ao ser fosforilada facilita o acesso da LHS à gota lipídica e expõe a superfície para a ação das enzimas que vão promover hidrólise dos TG em AG e glicerol (Zimmermann *et al.*, 2004). Além disso, ela também é uma potente ativadora da ATGL (Nielsen *et al.*, 2014). Ao contrário das catecolaminas, a insulina inibe a lipólise pela fosforilação e ativação da fosfodiesterase (PDE) específica do AMPc, a PDE-3, que catalisa a hidrólise do AMPc em AMP, reduzindo os níveis de AMPc e, como consequência, impedindo a fosforilação da LHS (Caminhotto *et al.*, 2014).

Além da produção e degradação de lipídeos, o TA também sintetiza e secreta proteínas chamadas adipocinas (Figura 2). Elas existem em grande variedade e desempenham funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas, interferindo no metabolismo de lipídeos e de glicose e podendo contribuir para o desenvolvimento de

DCNT. Dentre as adipocinas mais estudadas e de maior relevância em pesquisas, estão o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), IL-10, adiponectina, leptina e resistina.

Figura 2: Adipocinas e suas ações sistêmicas



Legenda: FIAF: fator adipocitário induzido pelo jejum; ASP: proteína estimulante da ascilação; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; PAI-I: inibidor do ativador de plasminogênio I; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; NGF: fator de crescimento neural; IL- 6: interleucina 6; IL-1: interleucina 1 β ; IL-10: interleucina 10; IL-17: interleucina 17; IL-18: interleucina 18; PCR: proteína C reativa; NGAL: lipocalina associada à gelatinaseneutrofílica; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos; RANTES: Regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais; IL-8: interleucina 8; IP-10: proteína 10 induzida por interferon. Fonte: Silva *et al.*, 2019.

Estas adipocinas são capazes de atuar sobre diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos e sua produção pode ser influenciada por condições metabólicas. Em estados inflamatórios, como a obesidade, ocorre maior produção de adipocinas inflamatórias do que de adipocinas anti-inflamatórias (Bastard *et al.*, 2006; Greenberg & Obin, 2006; Guimarães *et al.*, 2007; Karmiris *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Adipogênese

O desenvolvimento de pré-adipócitos em adipócitos maduros é conhecido como adipogênese. Este processo difere da lipogênese, que é caracterizada pela ocorrência de

síntese de lipídeos e hipertrofia do TA. A adipogênese, caracterizada pela hiperplasia do TA, é regulada por uma complexa rede de fatores de transcrição que coordenam a expressão de centenas de proteínas responsáveis por comprometer o fenótipo adipocítico maduro (De Sá *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). Embora tenha sido estabelecido que o PPAR γ e a C/EBP α são os fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação adipogênica e pela manutenção do fenótipo adipocitário (De Sá *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019), as cascatas de sinalização subjacentes à adipogênese, especialmente os eventos iniciais, não são totalmente compreendidos.

O fator de transcrição PPAR γ é o principal regulador da adipogênese e tem sua transcrição regulada pela família C/EBPs (C/EBP α , C/EBP β e C/EBP δ) (Hou *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2017). A expressão de C/EBP β e C/EBP δ é fundamental para a adipogênese. De fato, a supressão concomitante destes dois fatores de transcrição foi capaz de causar redução do TA de camundongos, devido principalmente à redução no número dos adipócitos (Algire, Medrikova & Herzig, 2013). Na cascata da adipogênese, imediatamente após a indução da diferenciação dos pré-adipócitos, o fator de transcrição CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc) torna-se fosforilado e ativa a expressão de C/EBP β . Após a indução, o C/EBP β adquire capacidade de se ligar ao DNA do pré-adipócito, à medida que essas células são reintroduzidas no ciclo celular, fazendo com que o fator de transcrição C/EBP β possa desempenhar, assim, um papel importante na expansão clonal mitótica, fundamental para a diferenciação das células. No início do processo de diferenciação, o C/EBP β é fosforilado pela ação das enzimas proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e pelo glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK3 β) e, uma vez capaz de se ligar ao DNA, o C/EBP β leva à expressão de C/EBP α e PPAR γ (De Sá *et al.*, 2017).

Uma vez expressos, PPAR γ e C/EBP α se autorregulam em um feedback positivo para manter a sua expressão, importante para a manutenção do fenótipo nos adipócitos maduros. Ligantes endógenos adicionais para PPAR γ ainda não foram elucidados com sucesso, mas é conhecido que os fatores de transcrição SREBP-1c (proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis 1) e C/EBP β podem aumentar a produção destes ligantes (Algire, Medrikova & Herzig, 2013).

O SREBP-1c é outro fator de transcrição envolvido na adipogênese (Rodríguez *et al.*, 2015), cujo mRNA é ativado após a expressão de C/EBP α e PPAR γ . A SREBP-1c é encontrada complexada com a SCAP (proteína ativada pela clivagem de SREBP-

1c) e ligada à membrana do retículo endoplasmático. Após a sua liberação do retículo endoplasmático, por meio do estímulo da insulina, o complexo SCAP/SREBP-1c pode se mover para o aparelho de Golgi, onde a SREBP1-c é clivada por proteases e o domínio contendo o componente bHLH é liberado, podendo ser translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, ocorre à transcrição de genes que codificam enzimas lipogênicas, envolvidas no metabolismo do AG e na síntese de TG, etapas importantes para a formação das características do adipócito (Tang & Lane, 2012).

1.2.2. Tecido Adiposo Marrom (TAM)

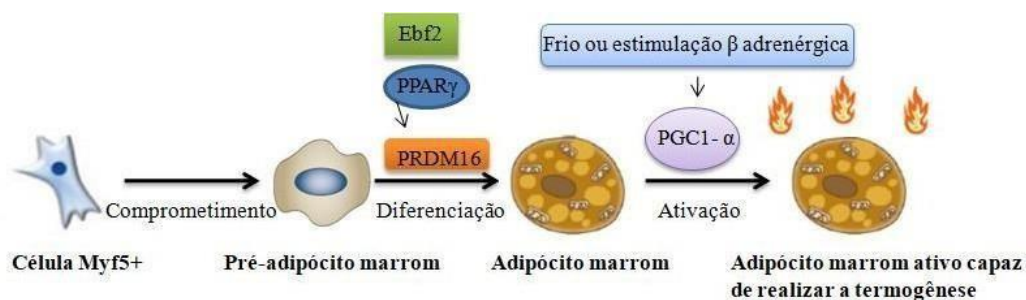
O TAM foi inicialmente identificado em crianças e mamíferos hibernantes, em resposta ao frio (Cannon & Nedergaard, 2004; Wu *et al.*, 2013). E, de fato, esse tecido é especializado na geração de energia, expressa sob a forma de calor, o que contribui para o aumento do gasto energético, conferindo ao TAM uma atividade termogênica. Os adipócitos marrons são menores do que os adipócitos brancos (Ravussin & Galgani, 2011), seu armazenamento é multilocular, apresentam núcleo central, são altamente inervados e vascularizados pelo sistema nervoso simpático e contém grande quantidade de mitocôndrias o que confere a coloração marrom ao tecido (Wu *et al.*, 2013; Betz & Enerneck, 2015; Bargut *et al.*, 2017).

Os adipócitos marrons têm origem a partir de células progenitoras de miócitos que expressam o fator miogênico 5 (Myf5+) (Gustafson & Smith, 2015), cujo desenvolvimento envolve a ação de diversos fatores transcripcionais, entre os quais destacam-se PPAR γ , membros da família das proteínas de ligação ao acentuador CCAAT (C/EBPs), o coativador de 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PCG1- α) e a PRDM16 (Kajumira, Seale & Spiegelman, 2010; Harms & Seale, 2013).

A diferenciação da célula precursora em adipócito marrom é iniciada pela ação do fator de transcrição Ebf2 que interage com o PPAR γ para promover a expressão do fator de transcrição PRDM16, que é considerado um regulador chave do desenvolvimento do adipócito marrom, pois determina sua diferenciação e atividade termogênica. Na cascata de diferenciação da célula precursora em adipócito marrom, o PRDM16 atua como um potente coativador da atividade transcricional do PGC-1 α e β , PPAR γ e C/EBPs (Kajimura, Seale & Spiegelman, 2010; Harms & Seale, 2013). O PGC-1 α está associado à biogênese mitocondrial e a indução da expressão da proteína

desacopladora-1 (UCP-1) e de enzimas envolvidas na respiração mitocondrial (Seale, Kamijura & Spiegelman, 2009). Nas mitocôndrias, a UCP-1 desacopla os prótons da cadeia respiratória evitando a síntese de ATP e dissipando, portanto, a energia na forma de calor (Ricquier, 2017). O TAM também desempenha papéis autócrinos, parácrinos e endócrinos sendo a termogênese, a sua atividade principal (Figura 3).

Figura 3: Regulação transcricional da diferenciação e ativação do adipócito marrom.



Adaptado de Harms & Seale, 2013

Camundongos transgênicos que super expressaram PRDM16 no TA desenvolveram adipócitos beges em TAB, exibiram aumento do gasto energético e resistência à obesidade induzida por dieta rica em gordura (Seale *et al.*, 2015). Por outro lado, camundongos deficientes em expressar PRDM16 não foram capazes de promover a diferenciação em adipócitos beges e desenvolveram obesidade acompanhada de resistência à insulina e esteatose hepática (Cohen *et al.*, 2014).

1.2.2.1. Metabolismo do TAM

Na célula madura, a termogênese adaptativa sem tremores ocorre através de estímulos constantes a receptores adrenérgicos (especialmente dos receptores β -3 e β -1). A partir daí, é iniciada uma cascata de reações que se propaga com o aumento de AMPc, a ativação da PKA e indução da lipólise em TAB. Em um primeiro momento, os AGL provenientes dos TG estocados nos adipócitos marrons, funcionam como combustível para a ativação da UCP-1. Em seguida, essa via é alimentada pela degradação dos TG estocados no TAB (Chouchani, Kazak & Spielman, 2018).

Não somente o conteúdo da gotícula lipídica é usado para gerar calor, mas também AGL e glicose da circulação sistêmica (Nedergaard *et al.*, 2010) o que pode ter relação com efeitos metabólicos benéficos na obesidade (Bartelt *et al.*, 2011), na RI

(Stanford *et al.*, 2013) e nas doenças cardiovasculares (Berbee *et al.*, 2015; Bartelt *et al.*, 2017).

O PPAR α participa da termogênese direcionada os AGL, gerados após o estímulo adrenérgico, para a β -oxidação, ao invés do direcionamento ao efluxo celular. O estímulo crônico ao receptor β -3-adrenérgico (R β 3A) regula positivamente a expressão de PPAR α , resultando em uma capacidade de oxidação expandida no interior dos adipócitos (Li *et al.*, 2005).

1.3. Remodelamento do Tecido Adiposo: *Browning* e *Whitening*

1.3.1. *Browning* e Tecido Adiposo Bege (TABe)

No TAB, ocorrem células que expressam a proteína UCP-1 em resposta à estímulos adrenérgicos ou ao frio. Estas células são classificadas como adipócitos marrons adaptativos recrutáveis ou, mais recentemente, adipócitos beges (Cousin *et al.*, 1992; Guerra *et al.*, 1998; Seale *et al.*, 2008).

O TABe pode surgir de células precursoras do TAB por diferenciação de novo ou conversão direta de adipócitos uniloculares maduros do tipo branco, o que é denominado *browning*. O equilíbrio relativo entre esses mecanismos de indução da gordura bege depende de fatores ambientais (ex: alimentação, atividade física e temperatura) e/ou idade, crianças apresentam maior quantidade de TAM (Wang & Seale, 2016). Existem evidências de que fatores nutricionais e dietéticos podem induzir a transdiferenciação por aumentar a expressão de UCP-1 (Concha *et al.*, 2019; Raposo, 2020). A influência da atividade física é baseada na expressão da adipomiocina irisina que aumenta a expressão de PGC1- α (Boström *et al.*, 2012; Arhire *et al.*, 2019; De Meneck *et al.*, 2021). A exposição ao frio estimula o fluxo simpático, aumentando os estímulos b-adrenérgicos no TA (Cannon & Nedergaard, 2004; Schreiber *et al.*, 2017).

O recrutamento do adipócito bege, apesar de não se originar a partir da linhagem celular Myf5+ (Gustafson & Smith, 2015), depende da expressão de fatores de transcrição envolvidos também na diferenciação do adipócito marrom, como PRDM16, PGC-1 α e β , PPAR γ , entre outros (Harms & Seale, 2013).

O gene PDRM16 atua como um fator de manutenção do fenótipo marrom e, por isso, sem a sua presença, células beges reduzem suas características termogênicas (Seale *et al.*, 2008). O PGC-1 α é um mediador transcricional central da sinalização β -

adrenérgica nos adipócitos (Puigserver *et al.*, 1998; Uldry *et al.*, 2006). Os agonistas β -adrenérgicos aumentam os níveis de expressão e a atividade do PGC-1 α nos adipócitos por meio da ativação da via p38-MAPK. O PGC-1 α co-ativa vários fatores de transcrição, incluindo IRF-4, para promover a biogênese mitocondrial e ativar genes termogênicos. A ausência de PGC-1 α está associada a níveis reduzidos de UCP-1 e menor capacidade termogênica no TAB (Fisher *et al.*, 2012).

Os adipócitos marrons e bege compartilham muitas características morfológicas e bioquímicas, como apresentar gotículas lipídicas multiloculares e mitocôndrias densamente compactadas e expressar genes termogênicos chave (UCP-1; Cidea; PPAR α ; PGC-1 α) em resposta a estímulos adrenérgicos (Shapira & Seale, 2019). Entretanto, apresentam também algumas diferenças importantes. Por exemplo, os adipócitos marrons expressam mais UCP-1 que os adipócitos bege em condições basais. As células bege somente expressam quantidades elevadas de UCP-1 e de outras proteínas relacionadas à termogênese somente quando recebem estímulos β -3 adrenérgicos ou pelo frio. Nestas condições, a expressão de UCP-1 no adipócito bege é comparável à que se observa no adipócito marrom, sugerindo capacidade termogênica semelhante. Desta forma, acredita-se que o adipócito bege apresente a capacidade de alternar seu estado funcional entre armazenamento lipídico e dissipação de energia, de acordo com o estímulo a que é submetido (Wu *et al.*, 2012).

1.3.2. Whitening

O processo de *whitening* pode ocorrer quando há: a) baixa atividade do sistema nervoso central (Cannon & Nedergaard, 2004; Frontini & Cinti, 2010), uma vez que a sinalização noradrenérgica é essencial para a manutenção do fenótipo marrom (Dulloo & Miller, 1984); b) influência da temperatura ambiente (Cannon & Nedergaard, 2004; Frontini & Cinti, 2010), explicação; c) baixa atividade da enzima ATGL, que é fundamental para a morfologia e função normais do TAM e de outras enzimas lipolíticas (Haemmerle *et al.*, 2006; Ahmadian *et al.*, 2011); d) Deficiência do receptor de leptina (Roberts-Toler, O'Neill & Cypess, 2015).

O adipócito marrom é o principal tipo de célula parenquimatosa encontrada no TAM. São células multiloculares que possuem numerosas mitocôndrias e expressam a proteína UCP-1, que viabiliza o uso da energia derivada da oxidação dos AGs para a geração de calor (Cannon & Nedergaard, 2004). Quando ocorre o consumo de dieta

balanceada e a exposição à temperatura ambiente, os adipócitos brancos e marrons são encontrados juntos, em vários depósitos subcutâneos e viscerais (Cannon & Nedergaard, 2004; Vitali *et al.*, 2012). Em contrapartida, quando ocorre a exposição à alimentação obesogênica, os adipócitos marrons típicos são dificilmente detectáveis, pois a maioria deles sofre uma conversão, ainda pouco elucidada, para um fenótipo “branco” (CINTI *et al.*, 1997). Na obesidade genética ou adquirida, a atividade do TAM diminui e este adquire uma aparência branca (*whitening*). Dados sobre roedores e humanos ressaltam que a obesidade e suas complicações apresentam forte relação com a distribuição do TAB e do TAM. Em humanos, o fenótipo adiposo marrom reduzido está associado à RI (Yang, Enerbäck & Smith, 2003) e indivíduos obesos apresentam atrofia de TAM associada ao acúmulo de gordura visceral, envelhecimento e hiperglicemia (Cypess *et al.*, 2009).

A vascularização do TA está associada à homeostase metabólica sistêmica (Rupnick *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013). Em comparação com o TAB, o TAM é mais extensivamente vascularizado, e a angiogênese dependente do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), que tem se mostrado importante para a resposta termogênica (Xue *et al.*, 2009).

O TAM possui função secretora desempenhada através das batocinas, sendo o VEGFA uma delas (Gomez-Hernandez *et al.*, 2016). A expressão de VEGFA, ativada pela sinalização β -adrenérgica, faz aumentar a vascularização no TAM (Fredriksson *et al.*, 2000). Por outro lado, a ablação de VEGFA afeta, predominantemente, o TAM, diminuindo a vascularização nesse tecido, mas tem efeitos mínimos no TAB (Schimizu *et al.*, 2014).

O *whitening* já foi associado à perda da vascularização das mitocôndrias e ao desenvolvimento de microambiente hipóxico que leva à perda acelerada de mitocôndrias e, à medida que a capacidade oxidativa é perdida, ao acúmulo de gotículas lipídicas, gerando o fenótipo branco (Roberts-Toler *et al.*, 2015; Schimizu & Walsh, 2015).

Histologicamente, os adipócitos marrons esbranquiçados apresentam um rearranjo unilocular do seu conteúdo lipídico, contudo, seu citoplasma ainda contém mitocôndrias típicas, semelhantes às do adipócito marrom clássico, com numerosas cristas compactadas (Cinti, 2001). Os adipócitos que sofrem *whitening* apresentam menor imunorreatividade mitocondrial da UCP-1, começam a expressar leptina (Cinti *et al.*, 1997; Canello *et al.*, 1998), hormônio característico do adipócito branco, e reduzem a expressão de inúmeros genes típicos do adipócito marrom (Razzoli *et al.*, 2016). O branqueamento da gordura marrom resulta em infiltração de macrófagos,

morte de adipócitos e formação de estruturas do tipo CLS (Roberts-Toler, O'Neill & Cypess, 2015). Essas estruturas são conglomerados de macrófagos do tipo M1 que circundam grandes gotas lipídicas remanescentes de adipócitos necrosados, formando células espumosas pelo acúmulo lipídico (Prieur *et al.*, 2011).

1.4. Efeito do café sobre o remodelamento do tecido adiposo

1.4.1. Características botânicas, produção e consumo de café

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, que possui, pelo menos, 105 espécies. Dessas, as mais comercializadas são: *C. arábica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta) (Clifford & Michae, 2012). Existem cerca de 130 variedades de café arábica, entre as quais se destacam Catuaí, Mundo Novo e Bourbon. Esse café dá origem à bebidas com sabor suave e aroma agradável em comparação ao café robusta (Rossetti, 2007) que, por sua vez, origina bebida de sabor mais adstringente e amargo, sendo caracterizado de qualidade inferior (Consortio Pesquisa Café, 2020).

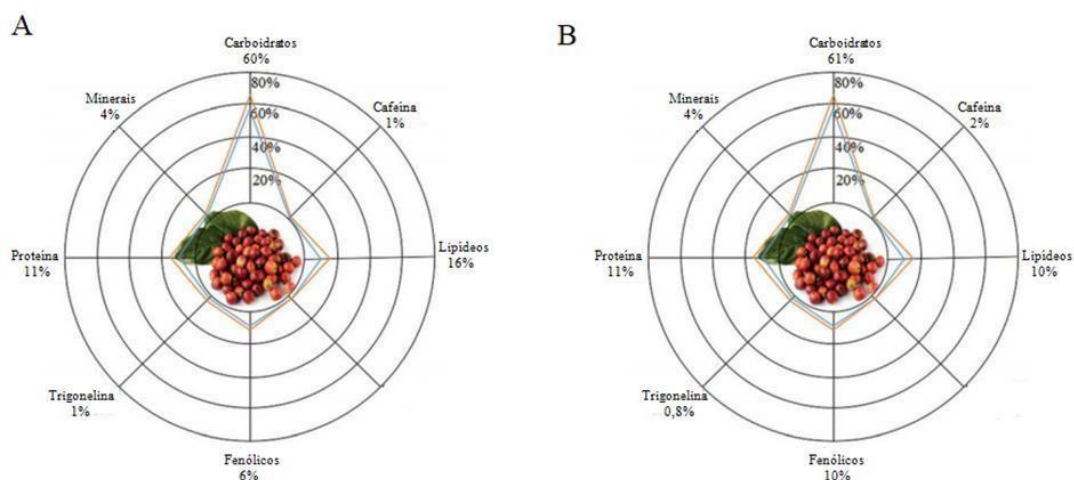
A produção mundial de café no ano de 2018/19 foi de 168,87 milhões de sacas. Nesse período, a produção de café arábica aumentou 1,8% e a de robusta, cresceu 6,7% e o consumo mundial aumentou 2,1%, totalizando 164,82 milhões de sacas (IOC, 2020). O Brasil, maior produtor e exportador mundial de café, e segundo maior consumidor do produto, atualmente, apresenta um parque cafeeiro estimado em 1,97 milhões de hectares (ABIC, 2020). Em suas dimensões continentais, o país possui uma variedade de climas, relevos e altitudes que permitem a produção de diversos tipos de café. A cultura de café no Brasil está concentrada, principalmente, nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. O segmento é representado por cerca de 290 mil produtores que, em sua maioria, são micro e pequenos cafeicultores (ABIC, 2020). O consumo per capita médio de café do brasileiro, em 2018, foi de 839 xícaras, seis vezes maior do que a média global (ABIC, 2020).

1.4.2. Composição química

Os grãos de café contêm todos os macronutrientes, alguns micronutrientes, tais como magnésio e niacina, e compostos não nutrientes com efeitos biofarmacológicos, como compostos fenólicos, cafeína, trigonelina, diterpenos e melanoidinas. A composição química dos grãos de café verde varia, principalmente, de acordo com a espécie (Figura 4),

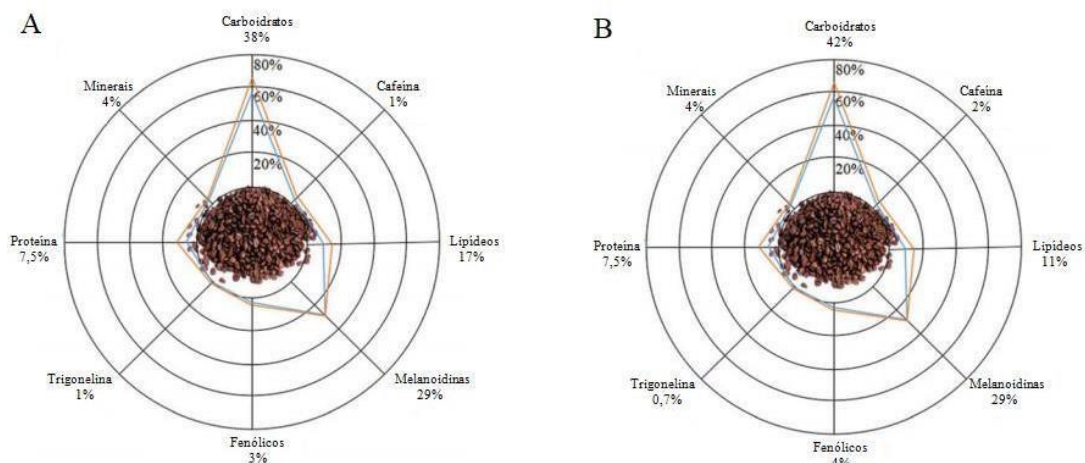
variedade e grau de maturação (Pereira *et al.*, 2008). A composição química dos grãos de café torrado varia, especialmente, de acordo com o tempo e a temperatura da torra (Figura 5) (Pereira *et al.*, 2008).

Figura 4: Composição química de grãos de café verde das espécies



Legenda: C. arabica (A) e C. Canephora (B). Fonte: Adaptado de Hu *et al.*, 2019.

Figura 5: Composição química de grãos de café torrado das espécies



Legenda: C. arabica (A) e C. Canephora (B). Fonte: Adaptado de Hu *et al.*, 2019.

Os grãos torrados apresentam, em comparação aos grãos verdes, a presença de melanoidinas; teores similares de lipídios, minerais e cafeína e; teores diminuídos de trigonelina, carboidratos, proteínas e compostos fenólicos. A trigonelina é degradada, produzindo o ácido nicotínico e compostos voláteis, como as piridinas e o N-metilpirrol (Moreira *et al.*, 2000). Açúcares redutores, proteínas e CGA participam da reação de Maillard, dando origem às melanoidinas. Alguns compostos indesejáveis, como o benzo[a]pireno que apresenta potencial cancerígeno, também podem ser formados durante o processo de torrefação do café (Hu *et al.*, 2019).

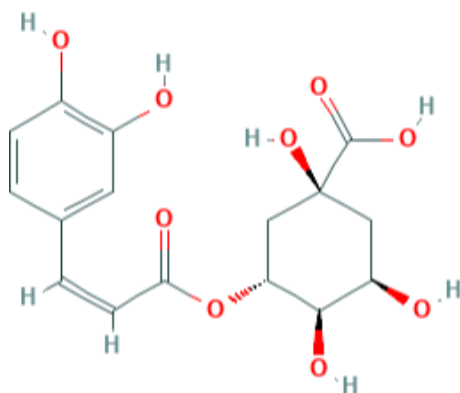
Grande parte dos efeitos do consumo de café na saúde humana são atribuídos à interação sinérgica dos componentes na matriz alimentar. Entretanto, o CGA e a cafeína são os componentes do café que mais se destacam com relação às atividades biológicas descritas (Cho *et al.*, 2010; Murase *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019).

1.4.2.1. Ácidos clorogênicos

Os CGA, são os principais representantes da fração fenólica dos grãos de café. Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas. Desempenham papéis vitais em suas atividades de reprodução, crescimento e metabolismo e agem como mecanismo de defesa contra infecções patológicas por vírus, fungos, parasitas e predadores (Dias *et al.*, 2015). Estão amplamente distribuídos na natureza e representam o maior grupo de compostos bioativos constituintes dos vegetais. O café é um dos principais alimentos que contribuem para o consumo de compostos fenólicos pela população brasileira (Corrêa *et al.*, 2015).

Os CGA são formados pela esterificação do ácido quínico com pelo menos uma molécula de um ácido hidroxicinâmico. Quando essa reação ocorre com os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico, são originadas as principais classes de CGA: ácidos cafeoilquínicos (CQA, do inglês *caffeoylquinic acids*), feruloilquínicos (FQA, do inglês *feruloylquinic acids*) e p-cumaroilquínicos (p-CoQA, do inglês *p-coumaroylquinic acid*), respectivamente. O ácido 5-cafeoilquínico (5CQA, do inglês *5-caffeoylquinic acid*) é o CGA majoritário na bebida de café (Figura 6) (Clifford & Knight 2004; Perrone *et al.*, 2008; Almeida & Benassi, 2011).

Figura 6. Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA).



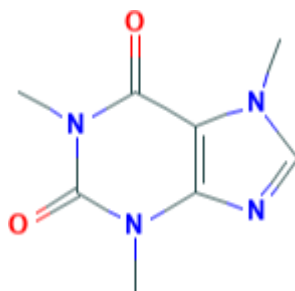
Fonte: Pub Chem, 2020.

Os CGA apresentam diversas propriedades biológicas benéficas à saúde, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e anti-hipertensiva (Hu *et al.*, 2019). Os CGA presentes no café são extensivamente metabolizados em humanos (Monteiro *et al.*, 2007) e já foi demonstrado que os metabólitos gerados também apresentam bioatividade (Clifford *et al.*, 2017).

1.4.2.2. Cafeína

A cafeína é uma dióxipurina metilada, estruturalmente similar ao ácido úrico, denominada quimicamente de 1,3,7-trimetilxantina (Figura 7). Nos grãos de café verde, pode contribuir para a inibição do crescimento de microorganismos. Após a torra do café, permanece estável e, na bebida, é o componente responsável por conferir amargor (Pimenta, 2002).

Figura 7: Estrutura química da cafeína.



Fonte: Pub Chem, 2020.

A cafeína apresenta propriedades fisiológicas e farmacológicas relevantes, tais como estimulante do sistema nervoso central e da diurese, antioxidante e termogênica (Dias *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Trombini *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2020). Seus principais metabólitos (1,7-dimetilxantina ou paraxantina, 1-metilxantina e 1-metilurato) também já foram associados à efeitos biológicos, mais notadamente antioxidante e anti-inflamatório (Kempf *et al.*, 2010; Carlström & Susanna, 2018).

1.4.3. Efeito do café e seus compostos bioativos sobre o remodelamento do TA

Na obesidade, o *whitening* é superior ao *browning*, resultando no remodelamento do TA que favorece o estabelecimento de comorbidades (Yang, Enerbäck & Smith, 2003). A função defeituosa do TAM pode induzir e/ou exacerbar a obesidade e suas complicações bem como a obesidade pode diminuir o TAM (Cypess *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, o consumo moderado de café tem sido relacionado com a redução do risco do desenvolvimento e melhora da progressão da obesidade e suas comorbidades. Essa associação pode ser explicada pelos efeitos biológicos positivos atribuídos aos componentes do café, bem como à bebida, que contempla a ação sinérgica desses componentes (Van Dam, 2006; Bouchard *et al.*, 2010; Grosso *et al.*, 2015; Marventano *et al.*, 2016; Poole *et al.*, 2017, Pimentel *et al.*, 2019).

Os CGA exercem efeitos positivos no metabolismo glicídico e lipídico. Uma das ações no metabolismo glicídico consiste em diminuir a absorção de glicose através da redução da produção das enzimas α -amilase (Narita & Inouye, 2011; Vinson *et al.*, 2012) e α -1,4-glicosidase (Matsui *et al.*, 2001; Akash *et al.*, 2014), bem como através da modulação da produção do peptídeo inibidor gástrico (GIP) e do

peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) (Johnston *et al.*, 2003; Akash *et al.*, 2014), Os CGA também exercem ação nos locais de armazenamento de glicose (músculo esquelético, fígado e TA) pelos seguintes mecanismos: a) estimulação do GLUT-4, aumentando a captação desse monossacarídeo pelos tecidos periféricos (Akash *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2014); b) inibição da atividade da glicose-6-fosfatase, liberando glicose livre na circulação sistêmica (Van Dam, 2006; Akash *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014); c) aumento da fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (Jia *et al.*, 2014) levando à redução nos níveis plasmáticos de glicose (Van Dam, 2006; Akash *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014); d) estímulo à secreção da insulina (Takahashi *et al.*, 2014).

Os efeitos dos CGA no metabolismo lipídico estão relacionados à supressão do acúmulo de gordura corporal através: a) da redução da expressão do fator de transcrição SREBP-1 e moléculas associadas (Fukushima *et al.*, 2009; Murase *et al.*, 2011); b) aumento da expressão de PPAR α , fator de transcrição envolvido na termogênese e na transcrição da carnitina palmitoil transferase (CPT) (Cho *et al.*, 2010); c) aumento da atividade da enzima CPT, estimulando a β - oxidação (Cho *et al.*, 2010); d) inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG redutase), importante para a síntese de colesterol e da enzima ácido graxo sintase, que catalisa a síntese de AG (Cho *et al.*, 2010).

A cafeína apresenta ações fisiológicas e farmacológicas em situações de saúde e doença, principalmente DM2, obesidade e DCVs (Van Dam *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2013; Yarmolinsky *et al.*, 2015). Está associada principalmente com o aumento do gasto energético (termogênese) e da lipólise, bem como com o aumento da oxidação de carboidratos (Carlström & Susanna, 2018; Emami *et al.*, 2019). Os mecanismos de ação pelos quais a cafeína exerce seus efeitos termogênicos compreendem: a) inibição da enzima fosfodiesterase no músculo esquelético e TA, o que resulta no aumento do AMPc; b) aumento da liberação e do tempo de permanência na fenda sináptica da noradrenalina (Yamashita *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2015); c) aumento da expressão da proteína UCP-1 (Riedel *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Além disso, a cafeína também tem efeitos na lipólise via expressão de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e inativação da enzima ACC, pela redução da expressão do fator de transcrição SREBP-1 e das enzimas FAS e SCD1 (Quan *et al.*, 2013). A cafeína também inibe a expressão dos fatores de transcrição C/EBP α e PPAR γ , estando associada ainda com a inibição da adipogênese (Kim *et al.*, 2016).

As evidências observacionais sobre os efeitos do café na saúde estão relacionadas ao consumo moderado da bebida (3 a 4 xícaras) (Kempf *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2012; Carlström & Susanna, 2018; Lee *et al.*, 2019). Os efeitos benéficos do café já foram também demonstrados em estudos experimentais quando administrado via intraperitoneal e intragástrica e quando consumido na forma de bebida ou incorporado à ração (Fukushima *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2014; Maki *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2017).

O consumo de café instantâneo, adicionado à ração (1,1%, *p/p*) de camundongos C57BL/6, ofertada por oito semanas, foi associado à supressão do acúmulo de gordura corporal nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e à diminuição da expressão gênica de citocinas inflamatórias (Fukushima *et al.*, 2009). Resultados semelhantes, tais como redução de gordura corporal, TG hepático, colesterol total, gordura mesentérica e gordura epididimária, além de regulação negativa de PPAR γ , foram observados em outro estudo similar, no qual café liofilizado foi incorporado na ração (2%, *p/p*) de camundongos C57BL/6 por nove semanas (Takahashi *et al.*, 2017). Outros estudos que avaliaram o consumo de café, na forma de bebida, também mostraram resultados positivos para a obesidade e suas complicações. A administração diária intragástrica, à camundongos C57BL/6, de bebida de café instantâneo (0,5%, *p/v*), por duas semanas, após a indução da obesidade pelo consumo de dieta hiperlipídica (tempo de indução de 10 semanas), foi associado à reversão das alterações induzidas pela obesidade, especialmente reversão da RI e melhora na captação da glicose (De Oliveira *et al.*, 2014). O consumo de bebida de café, por via oral, preparada a partir de café torrado e moído (40%, *v/v* e 60%, *v/v*), por seis semanas, impediu a progressão da obesidade em camundongos C57BL/6 obesos (tempo de indução de 6 semanas) (Maki *et al.*, 2017).

Portanto, as evidências apontam para o efeito benéfico do café na prevenção e melhora da progressão da obesidade e suas comorbidades. Estudos que realizaram intervenção com diferentes compostos bioativos concomitantemente ao consumo de dieta hiperlipídica denominam seus efeitos como protetores, sugerindo que a intervenção realizada preveniu o desenvolvimento da obesidade e suas complicações (Yamashita, 2012; Wang, 2015; Li *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Por outro lado, estudos que realizaram intervenção após à indução da obesidade e reportaram efeitos benéficos, sugerem que a intervenção realizada pode ser denominada tratamento por atenuar a obesidade e suas complicações (Glisan *et al.*, 2016; Knuz *et al.*, 2019; André *et al.*, 2020). Sendo assim, torna-se relevante explorar o efeito do consumo de café tanto

na prevenção quando no tratamento da obesidade. Entretanto, ainda são escassos os estudos que exploraram a relação do efeito benéfico do café com o remodelamento do TA frente ao consumo de dieta hiperlipídica.

2- OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do consumo preventivo e terapêutico de café sobre marcadores metabólicos e moleculares do remodelamento do tecido adiposo em modelo murino de obesidade induzido por dieta hiperlipídica.

2.2. Objetivos específicos:

Avaliar o efeito do consumo de café na prevenção e no tratamento da obesidade experimental sobre:

- Os parâmetros de ingestão de ração, evolução ponderal e adiposidade dos animais;
- A modulação de marcadores bioquímicos de inflamação, na glicemia, insulinemia e no metabolismo deglicose e lipídios;
- A modulação de marcadores moleculares envolvidos no processo de *browning* no TAM e *whitening* do TAB;

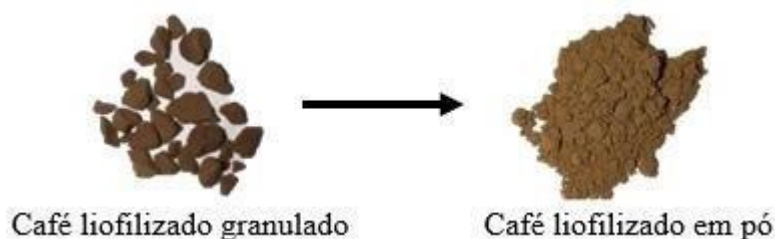
3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Café

O café orgânico instantâneo liofilizado granulado 100% Arábica, da marca Native® (São Paulo), de três lotes diferente, foi utilizado para ser incorporado na ração animal. Optou-se por utilizar o café instantâneo liofilizado em função da preservação da composição química e das características sensoriais.

O café foi incorporado à ração por ser uma via de administração não invasiva que já tem mostrado resultados satisfatórios em estudos anteriores que avaliaram a bioatividade desse alimento (Murase *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014). Para incorporação na ração, o café liofilizado foi triturado manualmente com auxílio de gral e pistilo visando à homogeneização e, logo em seguida, armazenado à temperatura de aproximadamente - 20°C até sua incorporação na ração (Figura 8).

Figura 8: Café incorporado na dieta experimental.



Fonte: A autora, 2020.

3.2. Dieta e modelo experimental

O presente protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob protocolo de número 022/2019 (Anexo 1). Foram utilizados 50 camundongos machos da cepa C57BL/6 com cinco semanas de vida, obtidos no Núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense – UFF. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/ UERJ alocados

em caixas de polipropileno, em temperatura média de 26°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e unidade de 60% ($\pm 10\%$) controladas, com ciclo de luz claro/escuro de 12h, recebendo água e ração ad libitum.

Os animais consumiram ração comercial NUVILAB® até 12 semanas, que representa a idade adulta do animal. Após este período foram ofertadas rações controle, hiperlipídica e hiperlipídica + café, elaboradas pela empresa Prag Soluções Biociências Com. e Serv. Ltda, seguindo as recomendações de elaboração de ração para roedores *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993) (Tabela 2). O café liofilizado foi incorporado na concentração de (1% *p/p*) a dieta HF (FIGURA 12). A escolha da concentração de café utilizada baseou-se em estudos prévios que demonstraram benefícios do consumo de café para a saúde, quando consumido em doses moderadas, que correspondem a 3-4 xícaras, promove benefícios para a saúde (Yamashita *et al.*, 2012; Kempf *et al.*, 2010; Martini *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Nordestgaard *et al.*, 2015; Pimentel *et al.*, 2019).

Sendo assim, foi calculado quantos gramas de café liofilizado corresponderiam a 3-4 xícaras de bebida de café pronto para consumo. Considerando uma xícara igual a 100mL, a recomendação do fabricante para a elaboração dessa quantidade de bebida é de 2,4g de pó de café solúvel. Logo, com o consumo de três xícaras diárias seriam consumidos 7,2g de pó de café solúvel, esse valor foi associado ao peso médio de um indivíduo adulto (70kg) gerando o dado que um adulto consome 102mg de pó de café solúvel/kg/dia e então esse valor foi transportado para a fórmula desenvolvida por Regan *et al.* (2008) (Figura 9) para equiparar esse consumo diário para camundongo.

Figura 9: Fórmula de transição de dose entre humanos e animais baseada na área corporal.

$$\text{HED}(\text{mg}/\text{kg}) = \text{Dose animal}(\text{mg}/\text{kg}) \times (\text{Km animal}/\text{Km humano})$$

Legenda: HED: dose humana; Km: peso corporal dividido pela área corporal (Regan *et al.*, 2008).

Essa equação leva em consideração a área de superfície corporal e não o peso corpóreo, visto que a área de superfície corporal se correlaciona melhor com os parâmetros fisiológicos de mamíferos, o que torna a normalização por ela mais adequada para a escala de doses em espécies. A quantidade de café consumida

diariamente por um camundongo com peso médio de 25g estimada pela fórmula foi de 31,14mg de pó de café solúvel sabendo que o consumo de um camundongo consome diariamente cerca de 3g de ração, o consumo diário equivalente foi de 1% (*p/p*).

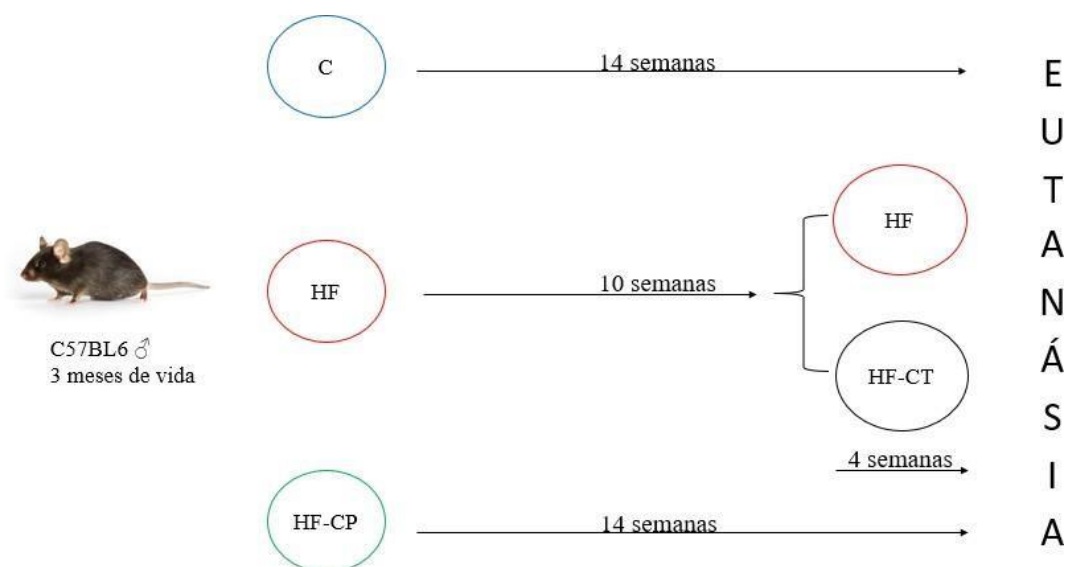
Tabela 1: Composição das rações ofertadas

Ingredients (g/100g)	Experimental diets		
	Standard chow	Highfat	Hiperlipídica + 1% of coffee
Corn starch ¹ (g)	46,57	23,27	23,27
Dextrinized starch ¹ (g)	15,5	11,5	11,5
Casein ¹ (g)	14,0	17,5	17,5
Saccharose ¹ (g)	10,0	10,0	10,0
Soybean oil ¹ (g)	4,0	4,0	4,0
Lard ¹ (g)	0,0	23,8	23,8
Cellulose ¹ (g)	5,0	5,0	5,0
Mineral ¹ (g)	3,5	3,5	3,5
Vitamin ¹ (g)	1,0	1,0	1,0
Cystine ¹ (g)	0,18	0,18	0,18
Choline ¹ (g)	0,25	0,25	0,25
Freeze dried coffee (g)	0	0	1
<i>Carbohydrate (%)</i>	77,7	50,02	50,2
<i>Protein (%)</i>	14,0	17,5	17,5
<i>Lipid (%)</i>	4	27,8	27,8
<i>Carboid (Kcal)</i>	310,8	200,2	200,2
<i>Protein (Kcal)</i>	56,0	70	70,0
<i>Lipid (Kcal)</i>	36	250,2	250,2
<i>Energia (Kcal)</i>	402,8	520,4	520,4

Tabela 1: Rações experimentais ofertadas. A: Dieta controle; B: Dieta hiperlipídica e C: Dieta hiperlipídica adicionada 1% de café.

Aos três meses de vida, os camundongos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: Grupo controle (C, n=10), alimentados com dieta padrão para roedores; Grupo high-fat (HF, n=25), alimentados com dieta rica em lipídeos e grupo café prevenção (HF-CP, n=15), alimentados com dieta rica em lipídeos acrescida com 1% de café (*p/p*). Após 10 semanas, tempo para a indução da obesidade nos animais do grupo HF, esse grupo foi subdividido, aleatoriamente, dando origem ao 4º grupo: Grupo café tratamento (HF-CT, n=15), recebendo dieta rica em lipídeos acrescida com 1% de café (*p/p*) até do 14º semana de experimento (Figura 10).

Figura 10: Delineamento Experimental. Legenda: C = Grupo controle, alimentados com dieta padrão para roedores; HF = Grupo high-fat, alimentados com dieta rica em lipídeos; HF-CP= Grupo café tratamento e HF-CT = Grupo café prevenção, alimentados com dieta rica em lipídeos acrescida de 1% de café (*p/p*).



Legenda: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

3.3. Consumo alimentar e evolução ponderal

A massa corpórea foi avaliada semanalmente em balança analítica (Shimadzu (R) UX 4200H). A ingestão alimentar dos animais foi acompanhada a cada dois dias e o consumo mensurado através da subtração do resto de ingestão da quantidade ofertada. O

consumo calórico foi calculado através da multiplicação da ingestão alimentar pela energia ofertada por cada grama de dieta.

3.4. Teste de tolerância oral á glicose (TOTG)

Uma semana antes do sacrifício, os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas, e o sangue obtido através de punção próxima a extremidade da cauda do animal para obtenção da concentração de glicose no tempo zero utilizando medidor automatizado (Accu-Check Active; Roche, Mannheim, Germany). A partir do tempo zero, os animais foram gavados com solução de glicose (5g de glicose em 20mL de solução salina) na dosagem de 2g/kg de massa corporal. As concentrações de glicose foram realizadas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. Os valores encontrados foram expressos em mg/dL.

3.5. Termografia

Com auxílio da câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA), foi possível aferir a temperatura corporal dos animais. As imagens foram captadas em temperatura ambiente, com animais (sem utilização de sedativos), na 14ª semana de experimento.

3.6. Eutanásia

Na 14ª semana de experimento, os animais foram submetidos ao sacrifício sendo eutanasiados com a utilização do anestésico Tiopental (0,09 mg/mL por 100g de peso) intraperitoneal. Após a certificação do efeito da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para incisão da caixa torácica e exposição do coração. Através da punção cardíaca, as amostras de sangue foram coletadas com a utilização de agulhas heparinizadas e acondicionadas em tubos de 1 mL. Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado à 1300 rpm à 4°C por 15 minutos.

O TAM foi obtido na região interescapular, as gorduras retroperitoneais, epididimárias (classificadas como gordura visceral) e subcutânea foram dissecados e pesados em balança analítica (Shimadzu (R) UX 4200H), e fixados em formalina de

Millonig (1.27 mol/formaldeído em 0.1 M de tampão fosfato pH 7,2) para futuros cortes histológicos ou congelado -80°C para análises moleculares.

3.7. Análises Bioquímicas

A avaliação da concentração de insulina e leptina sérica foram realizadas por método de quantificação não-radioativa através do Kit Rat/mouse ELISA (96-Well Plate Cat. #EZRMI-13-K, #EZML-82K, Millipore, MO, respectivamente) seguindo instruções do fabricante. Colesterol total, triglicerídeos foram determinados por ensaios colorimétricos através de Kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). As análises foram feitas em duplicatas e os resultados expressos em mg/dL

3.8. Perfil inflamatório

A concentração sérica IL-6 foi determinada através de kits de ELISA comerciais (e IL-6, BMS603-2; Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo as especificações do fabricante. As concentrações séricas serão apresentadas em pg/mL.

3.9. Índice HOMA-IR

O índice de resistência à insulina foi obtido através do cálculo do índice HOMA-IR (Homesostasis Model Assessment) calculado de acordo com Matthews *et al.* (1985), onde HOMA-IR é determinado pela multiplicação do valor de insulina (μ UI/mL) pela glicose (mmol/L) e posteriormente dividido por 22,5.

3.10. Análise histológica do tecido adiposo

Para as análises histológicas, o TAM e o TAB visceral e subcutâneo foram previamente fixados em formalina de Millonig (formaldeído a 4% *p/v*, tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e posteriormente incluídos em Paraplastplus® (Sigma-AldrichCo, St. Louis, USA) para a secção de cortes de 5 μ m de espessura. As lâminas serão coradas em Hematoxilina-Eosina e três imagens por lâmina serão realizadas em câmera Olympus DP71 e com microscópio de fluorescência Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan). As análises serão realizadas através do programa Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). As fotomicrografias serão obtidas no formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 \times 1024 pixels, em aumento de 40x e 100x.

3.11. Estereologia

Para quantificar os adipócitos, os fragmentos do tecido foram cortados com 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina, seguindo protocolos previamente estabelecidos para o tecido em questão. Foram realizadas imagens digitais em campos microscópicos aleatórios e não consecutivos, com microscópio Olympus BX51 e câmera acoplada (Infinity 15c, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada), através do software Image-Pro Plus (versão 7.0 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Campos aleatórios foram fotografados para estimar a área da seccional média dos adipócitos: densidade de volume (V_v) de adipócitos dividida pelo dobro da densidade numérica de adipócitos por área (QA) (Mandarim-de-Lacerda 2003). Um sistema teste de 16 pontos, composto pelo software STEPanizer, foi usado para estimar V_v de adipócitos (pontos que atingem os adipócitos divididos pelo número total de pontos dentro do sistema de teste). Inversamente, a estimativa de QA foi realizada considerando o número de adipócitos dentro de uma área de teste (exceto os adipócitos que tocam as linhas proibidas) dividido pela área do sistema de teste, calculado após a calibração do STEPanizer (Tschanz, Burri *et al.* 2011).

3.12. Imunofluorescência

Para realização da imunofluorescência da UCP-1, seções do TAM desparafinizadas e hidratadas de tecido (5µm) foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0, a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e, então, com glicina 2% e PBS/BSA 5% para bloqueio das ligações inespecíficas. Os cortes foram incubados “overnight” à 4°C com o anticorpo para UCP1 e PGC-1α na diluição 1:50 em PBS/BSA 1% e, em seguida, foram incubadas, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo, na diluição 1:50 em PBS/BSA 1%. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Slow Fade Antifade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Imagens foram digitais e obtidas utilizando a técnica de microscopia confocal (Leica TCS SPE, Wetzlar, Alemanha).

3.13. Expressão gênica (quantificação de RNAm)

O RNA total foi extraído do TAM e TAB (alíquotas de 30mg) utilizando 1 ml de Trizol (Invitrogen, CA, USA) adicionado 100µL de clorofórmio, seguido de

centrifugação (11.200 rpm, por dez minutos a 4°C). Em seguida, foi o sobrenadante da fase aquosa correspondente ao RNA, adicionado 250 µL de álcool isopropílico seguido de centrifugação (11.200 rpm, por 10 minutos a 4°C) para precipitação e formação de um pellet de RNA. Em seguida, foi retirado o álcool isopropílico e o pellet será ressuspensionado com 500 µL de etanol (70%) com centrifugação (11.200 rpm, por 5 minutos a 4°C) para purificação do RNA. O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspensionado em 40 µL de água deionizada (Milli-Q). A concentração de RNA foi determinada através de espectrometria utilizando o BioDropµLITE (BioDrop, Reino Unido). A conversão do RNA em cDNA (DNA complementar), foi realizada através da ação da enzima Transcriptase Reversa (Applied Biosystems High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Life Technologies, EUA). Serão utilizados Primers iniciadores do processo de replicação do cDNA, específicos para cada gene a ser analisado (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, EUA). A análise de PCR quantitativa foi realizada em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Serão avaliados os seguintes genes: Ppar γ (Mm00440940_m1), Prdm16 (Mm00712556_m1), Pgc-1 α (Mm01208835_m1), Ucp-1 (Mm01244861_m1), Opa-1 (Mm01349707_g1) e o receptor β 3-adrenérgico (Mm02601819_g1). PPAR γ : Principal regulador da adipogênese. Promove a expressão de PRDM16 que é um fator de transcrição determinante para a diferenciação do adipócito marrom e atividade termogênica, além disso, é co-ativador de PGC-1 α ; PPAR γ e C/EBPs. PGC-1 α : Associado à biogênese mitocondrial, expressão de UCP-1 e de enzimas envolvidas na respiração mitocondrial. A UCP-1 é uma proteína determinante para a termogênese adaptativa sem tremores, pois desacopla os prótons da cadeia respiratória evitando a produção de ATP e dissipando a energia na forma de calor. OPA-1 relacionado com a regulação dos processos de fusão de mitocôndrias e fosforilação oxidativa e o receptor β 3-adrenérgico estimulado para a promoção da termogênese adaptativa sem tremores.

3.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade da distribuição e analisados por teste T de Student, quando comparados apenas dois grupos, mas 10 primeiras semanas. E por One-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey's, quando comparado todos os 4 grupos.

Todas as análises foram realizadas no software GraphPadPrism. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Comportamento alimentar e massa corporal

A média do consumo de ração foi semelhante entre os grupos durante todo o período experimental. Entretanto, os grupos HF, HF-CP e HF-CT apresentaram maior ingestão de energia quando comparados ao grupo C (+30%, +36%, +36%, respectivamente, $p=0,0009$), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Comportamento alimentar dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas do período experimental.

Dados	C	HF	HF-CP	HF-CT
Ingestão de ração (g/dia/animal)	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,3
Ingestão de energia (kJ/dia/animal)	43,8 ± 2,9 ^a	57,3 ± 4,6 ^b	59,9 ± 4,2 ^b	59,9 ± 6,0 ^b

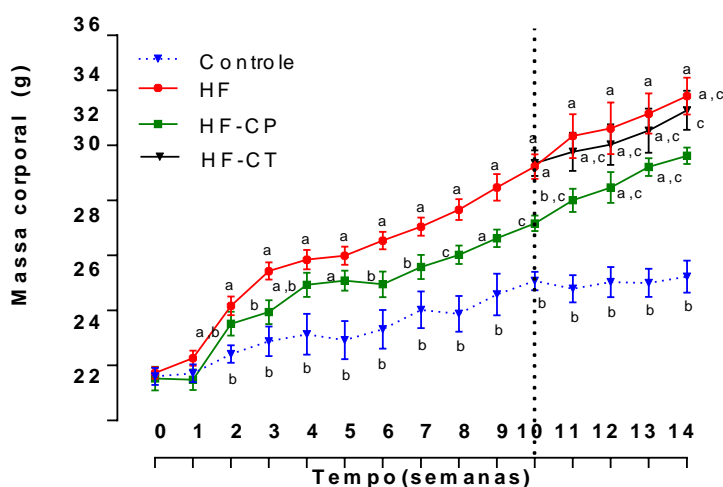
Legenda: Valores representados como média ± DP, n=10 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras em uma mesma linha ($p<0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

A evolução da massa corporal dos animais durante o período experimental está apresentada na Figura 11. A massa corporal dos animais foi semelhante entre os grupos até a segunda semana de experimento. Após esse período, o grupo HF apresentou um aumento na massa corporal em comparação com o grupo C (+6%, $p<0,05$). Na décima semana, o grupo HF apresentou maior massa corporal quando comparado aos grupos C e HF-CP (+15% e +7%, $p<0,05$ respectivamente). Nesse mesmo momento, o grupo HF-CT é iniciado no desenho experimental com massa corporal semelhante ao grupo HF, o que se mantém por todo o experimento. Ao final do estudo, na décima quarta semana, o grupo HF-CP apresentou massa corporal menor quando comparado ao grupo HF (-8%, $p<0,05$).

Ao final do período de indução da obesidade (10^a semana), o consumo de café de forma concomitante com a dieta hiperlipídica foi capaz de retardar o ganho de massa nesse período. Após o término do período experimental (14^a semana), foi possível observar que o consumo de café associado à dieta hiperlipídica após a indução da

obesidade promoveu o mesmo ganho de massa corporal dos animais que receberam somente a dieta hiperlipídica, enquanto o consumo de café durante todo o período de indução da obesidade promoveu ganho de massa corporal menor.

Figura 11 – Evolução da massa corporal dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas do período experimental.



Legenda: Valores representados como média \pm DP, $n=10$ por grupo. Diferenças significativas entre os grupos, a cada semana, estão indicadas por diferentes letras ($p<0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento (HF-CT).

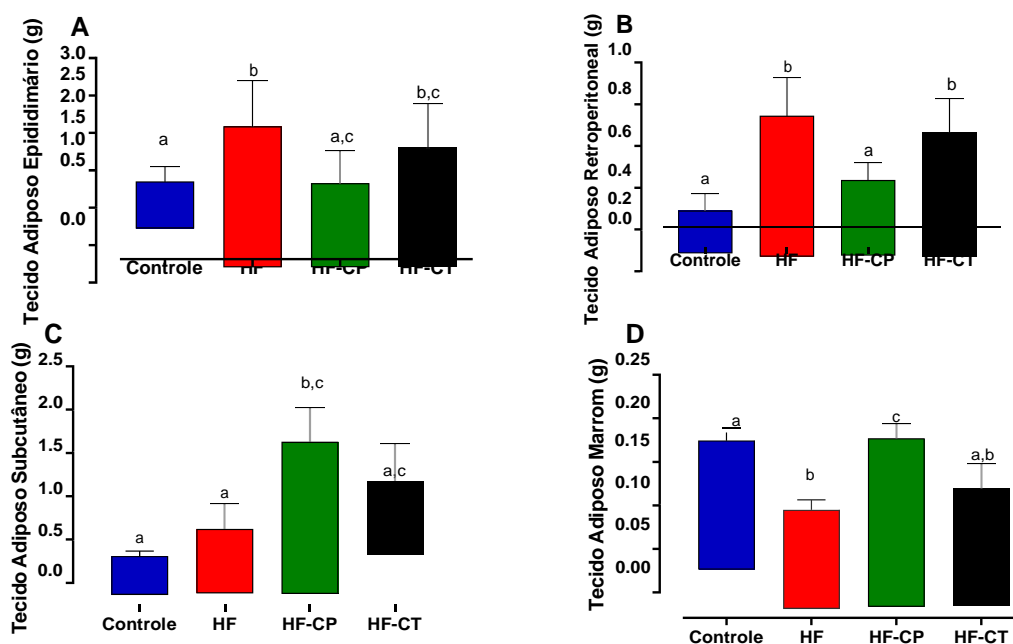
4.2. Distribuição de gordura corporal

A distribuição do tecido adiposo dos animais está apresentada na Figura 12. O grupo HF acumulou mais gordura que o grupo C em todos os compartimentos avaliados. Os grupos HF-CP e HF-CT apresentaram acúmulo de gordura epididimária (Figura 12A) e subcutânea (Figura 12C) semelhante, entretanto quando comparados ao grupo HF, o grupo HF-CP mostrou menor acúmulo de gordura epididimária (-40% , $p=0,0001$) e maior acúmulo de gordura subcutânea ($+135\%$, $p=0,0001$). Os grupos HF e HF-CT apresentaram acúmulo de gordura retroperitoneal semelhante e superior ao observado para o grupo HF-CP ($+86\%$ e $+64\%$, respectivamente) que apresentou

comportamento igual ao do grupo C (Figura 15B). O grupo HF-CP apresentou o maior acúmulo de TAM (Figura 12D).

O consumo de café ao longo de todo o experimento, comparado ao consumo após a indução da obesidade, proporcionou melhor distribuição da gordura corporal, diminuindo o acúmulo de tecido adiposo visceral e aumentando o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo e marrom, o que pode indicar um metabolismo mais saudável nesses animais mesmo com o consumo de dieta hiperlipídica.

Figura 12 – Distribuição do tecido adiposo branco e marrom dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas do período experimental.



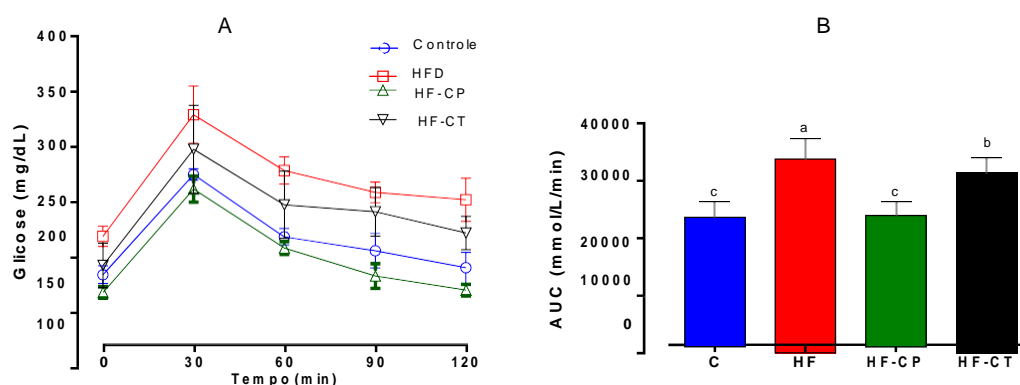
Legenda: Valores apresentados como média \pm DP, n=10 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

4.3. Teste de tolerância oral à glicose

O metabolismo da glicose dos animais foi avaliado (Figura 13). No TOTG (Figura 13A), o grupo HF apresentou glicemia de jejum superior ao grupo C (+20%, $p < 0,05$) e ao grupo HF-CP (+32%, $p < 0,05$). Ao avaliar a resposta glicêmica global, considerando os 120 min de teste (Figura 16B), observa-se que o grupo HF apresentou maior AUC quando comparado aos grupos C, HF-CP e HF-CT (+25%, +36%, +11%, respectivamente, $p < 0,05$). A AUC do grupo HF-CP foi semelhante à do grupo C ao passo que a AUC do grupo HF-CT, embora não tenha atingido o mesmo valor do grupo C, foi inferior ao grupo HF (-8%, $p < 0,05$).

Sendo assim, observamos que a dieta hiperlipídica promoveu intolerância à glicose e que o consumo de café foi capaz de melhorar esse quadro. Entretanto, a tolerância à glicose foi melhor quando o café foi consumido de forma concomitante à dieta hiperlipídica por 14 semanas do que quando foi consumido por apenas 4 semanas, após a indução da obesidade.

Figura 13 – Teste de tolerância oral a glicose (A) e área sob a curva dos níveis plasmáticos de glicose (B) dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.



Legenda: Valores representados como média \pm DP, n=6 por grupo. Figura B: Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

4.4. Análises Bioquímicas

A concentração plasmática de insulina, leptina, triglicerídeos, colesterol total e interleucina 6 (IL-6) dos animais foram avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise bioquímica do plasma dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas do período experimental.

Data	C	HF	HF-CP	HF-CT
Food intake (g/d/animal)	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,3
Energy intake (Kj/d/animal)	43,8 ± 2,9 ^a	57,3 ± 4,6 ^b	59,9 ± 4,2 ^b	59,9 ± 6,0 ^b
Fasting Glucose (mg/dL)	143,5 ^b ±31,8	187,7 ^a ±30,1	163,5 ^{a,b,c} ±2,9	180,7 ^{a,c} ±21,0
Insulina (μUI/L)	42,5 ^b ±5,033	75,9 ^a ±7,179	47,7 ^{b,c} ±7,1	58,9 ^c ±4,6
Leptina (ng/ml)	6,1 ^b ±0,8	15,7 ^a ±4,0	7,4 ^c ±3,0	10,9 ^{a,c} ±3,0
HOMA-IR	1,8 ^b ±0,2	3,0 ^a ±0,4	1,8 ^b ±0,1	2,5 ^a ±0,2
Triacylglycerol (mg/dL)	72,0±11,5	97,6±26,8	69,8±9,3	84,8±15,1
Cholesterol (mg/dL)	69,1 ^b ±20,1	180,0 ^a ±22,6	112,5 ^c ±27,7	186,6 ^a ±26,5
IL-6 (pg/mL)	16,1 ^b ±4,2	70,2 ^a ±8,4	16,0 ^b ±2,1	44,5 ^c ±13,2

Legenda: Valores apresentados como média ± DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras em uma mesma linha ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

A concentração plasmática de insulina está de acordo com a intolerância oral à glicose encontrada no grupo HF quando comparada ao grupo C. Ambos os grupos que consumiram café apresentaram concentração de insulina menor do que aquela observada no grupo HF (HF-CP -58%; HF-CT -30%, $p=0,0001$). A concentração sérica de leptina foi maior no grupo HF quando comparada a do grupo C (+2.484%). O grupo HF-CP apresentou valor menor quando comparado ao grupo HF (-111%) e o grupo HF-CT apresentou valores similares aos grupos HF e HF-CP. A concentração de insulina plasmática teve sua maior redução no grupo HF-CP. O consumo de café atenuou a

hiperinsulinemia no grupo HF-CP. A RI, avaliada por HOMA-IR, foi revertida no grupo HF-CT que apresentou valor similar ao do grupo controle. Os grupos experimentais não apresentaram valores diferentes na concentração de triglicérides plasmático. Na análise do colesterol, o grupo HF apresentou valor maior quando comparado ao C (+260%) e foi semelhante ao grupo HF-CT. O grupo HF-CP apresentou valor menor quando comparado ao grupo HF (-60%). A concentração de IL-6 foi superior no grupo HF quando comparado ao grupo C (+437%). O grupo HF-CP apresentou valores semelhantes ao grupo C. Embora, as concentrações apresentadas pelo grupo HF-CT não tenham sido semelhantes às do grupo C, foram inferiores às do grupo HF (-57%).

4.5. Estereologia do tecido adiposo branco

As imagens histológicas do TAB dos animais são demonstradas na Figura 14. As fotomicrografias mostram adipócitos menores no grupo C em contraste com os adipócitos hipertrofiados do grupo HF. O grupo HF-CP apresentou adipócitos com características semelhantes às do grupo C. A área seccional média de adipócitos do grupo HF foi maior do que a apresentada pelo grupo C (+61%, $p < 0,0001$) (Figura 15), indicando hipertrofia dessas células. Os animais do grupo HF-CP apresentaram área seccional média de adipócitos menor do a grupo HF (-32%, $p < 0,0001$).

Figura 14: Morfologia do tecido adiposo branco dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.

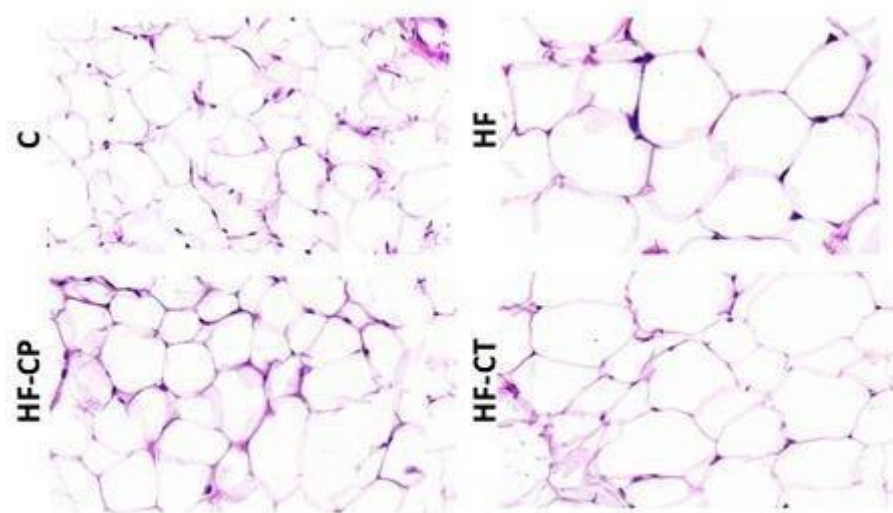
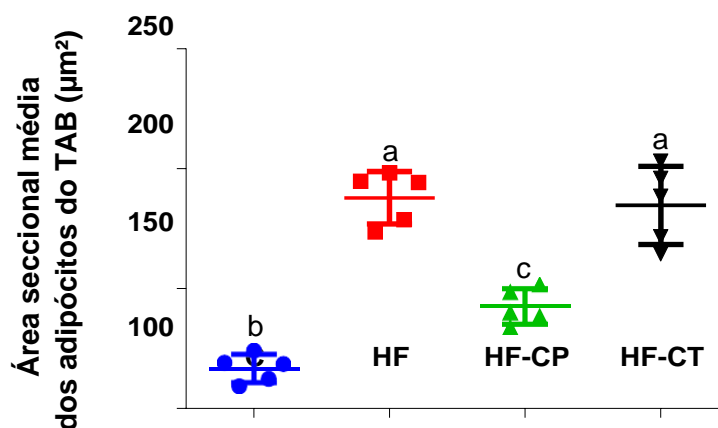


Figura 15: Estereologia do tecido adiposo branco dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.



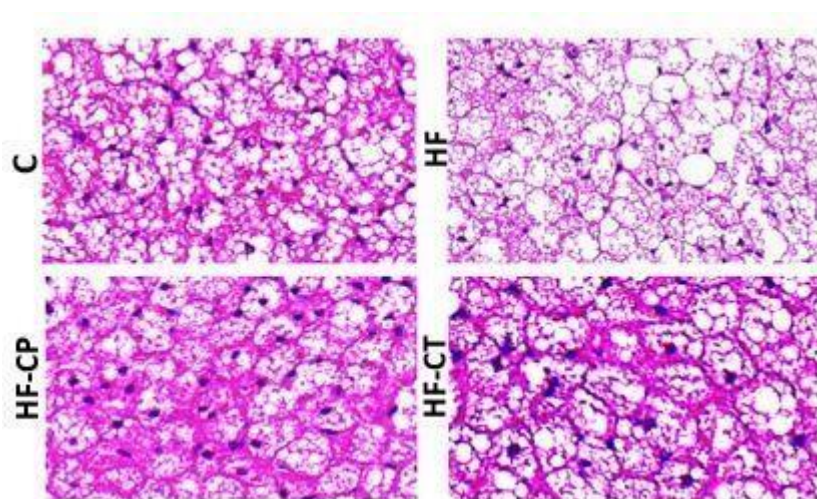
Legenda: Valores apresentados como média \pm DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras em uma mesma linha ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

4.6. Morfologia do tecido adiposo marrom

O TAM difere do TAB por apresentar armazenamento lipídico multilocular e maior quantidade de mitocôndrias, apresentando maior capacidade termogênica. O

grupo HF parece ter apresentado aumento no acúmulo de gotículas de gordura quando comparado ao grupo C (Figura 16), se assemelhando ao padrão de reserva lipídica de adipócitos brancos (unilocular), fenômeno denominado *whitening*. A morfologia do TAM do grupo HF-CP foi semelhante à do grupo C, com presença de núcleos e armazenamento multilocular. O grupo HF-CT apresentou uma possível redução do acúmulo de lipídios no interior dos seus adipócitos, com melhor preservação da citoarquitetura do tecido quando comparado ao grupo HF.

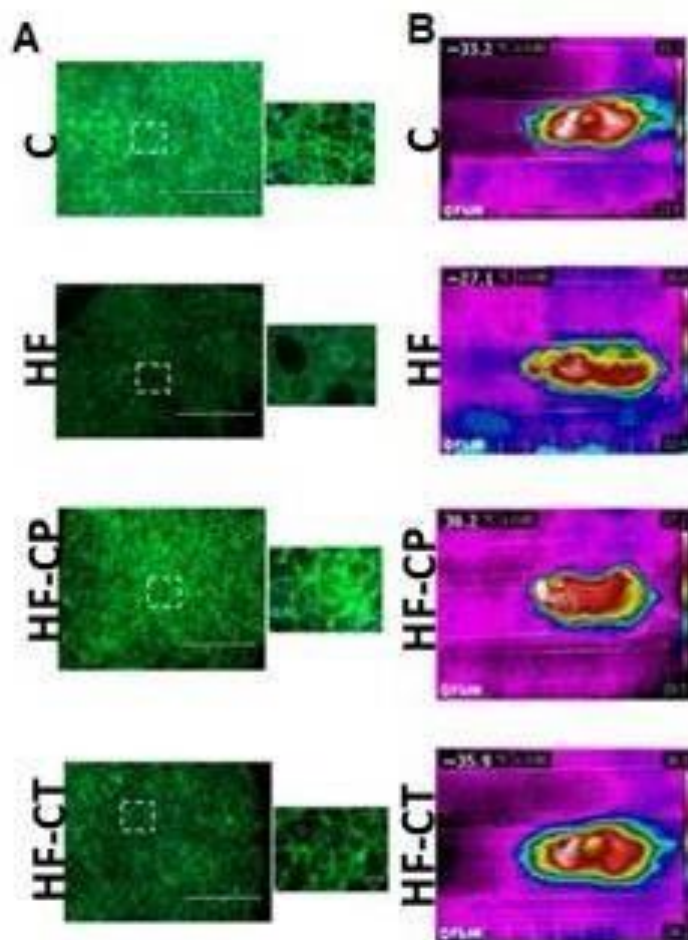
Figura 16: Morfologia do TAM dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.



4.7. Expressão de UCP-1 no tecido adiposo marrom e fotos termografias.

A análise qualitativa da expressão de UCP-1 está apresentada na Figura 17A. O grupo HF apresentou menor expressão de UCP-1, indicando uma possível perda da função termogênica do TAM. A expressão de UCP-1 no grupo HF-CP foi superior aos demais grupos e no grupo HF-CT foi maior do que à do grupo HF, indicando maior atividade termogênica do TAM nos grupos que consumiram café. A temperatura corporal também foi avaliada (Figura 17B). O grupo HF-CP apresentou maior temperatura corporal média (37,1°C) quando comparado aos demais grupos (C: 32,5°C; HF: 30,1°C e HF-CT: 35,1°C). Sugerindo maior termogênese o que foi confirmado pela maior expressão de UCP-1.

Figura 17 – Expressão de UCP1 no tecido adiposo marrom através de imunofluorescência (A) e imagens termográficas (B) dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.



4.8. Expressão de genes envolvidos na termogênese no tecido adiposo

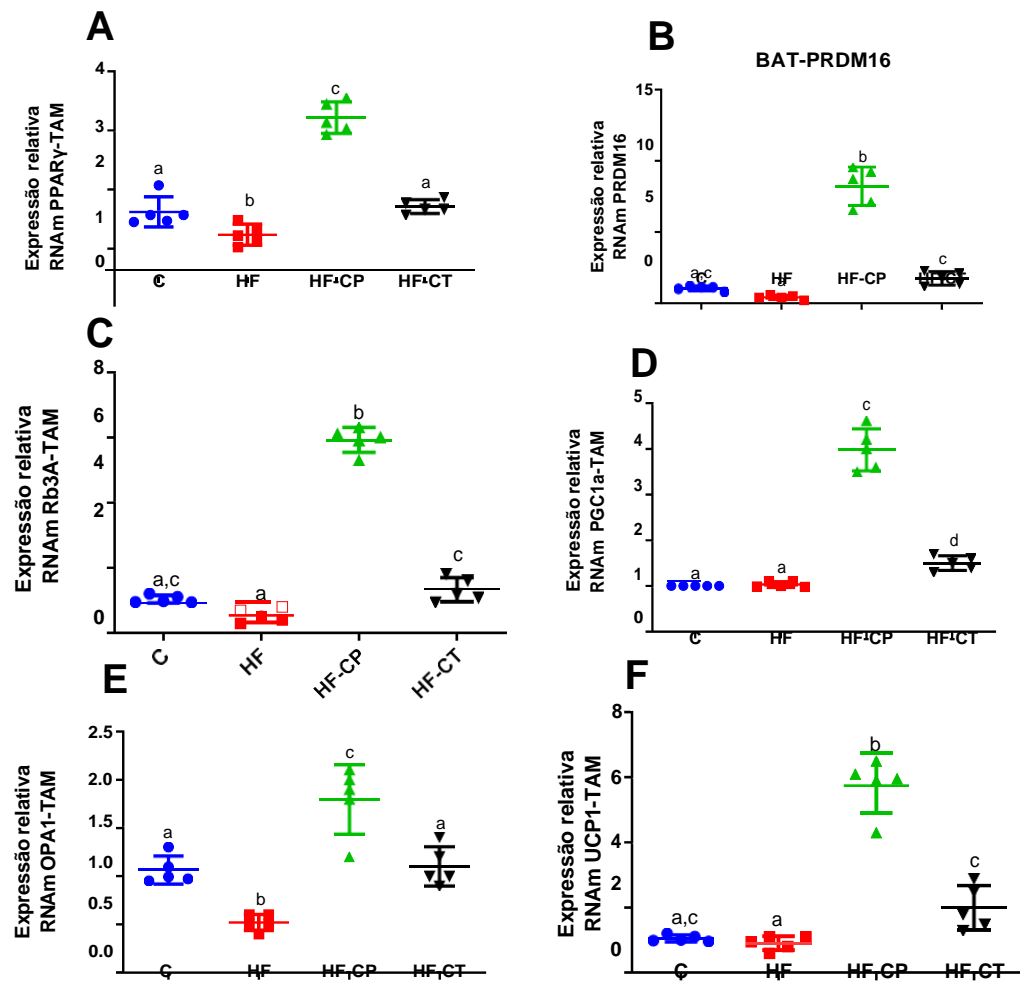
4.8.1 Expressão de genes envolvidos na termogênese no tecido adiposo marrom

A expressão gênica de PPAR γ (Figura 18A) do grupo HF-CP foi superior à de todos os outros grupos (C +175%, HF +347%, HF-CT +156%, $p=0,0001$) e a do grupo HF-CT foi semelhante à do grupo C. O mesmo ocorreu para a expressão de PRDM16 (Figura 18B), que foi maior no grupo HF-CP quando este foi comparado a todos os outros grupos (C +175%, HF +347%, HF-CT +156%, $p=0,0001$). A expressão do

receptor β_3 adrenérgico foi muito maior no grupo HF-CP quando comparado ao HF (+996%, $p=0,0001$) (Figura 18C).

O gene $PGC1\alpha$ está associado à biogênese mitocondrial e indução da expressão da proteína UCP-1 e de enzimas da respiração mitocondrial. A expressão desse gene foi semelhante entre os grupos C e HF. Os grupos adicionados de café atingiram valores superiores ao grupo HF, HF-CP +284,9% e HF-CT +45,1% ($p=0,0001$) (Figura 18D). A expressão de OPA-1 (Figura 18E), foi menor no grupo HF, o grupo HF-CP apresentou valor superior ao HF (+246%, $p=0,0001$) e o grupo HF-CT foi semelhante ao grupo C e superior ao HF em (+111,5%, $p=0,0001$). A expressão de UCP-1 foi maior no grupo HF-CP quando comparado ao grupo HF (+532,1%, $p=0,0001$) (Figura 18F). Corroborando com o resultado da imunofluorescência, com maior atividade da UCP-1 no grupo HF-CP e que associado com a expressão dos outros genes e maior temperatura corporal sugere maior atividade termogênica nesse tecido, com manutenção do fenótipo marrom mesmo com o consumo de dieta hiperlipídica. A expressão de UCP-1 do grupo HF-CT (+284,9%, $p=0,0001$) foi superior quando comparada ao grupo HF, o que também sugere melhora da atividade e manutenção do TAM ativo nesses animais.

Figura 18 – Expressão gênica por RT-qPCR no tecido adiposo marrom dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.

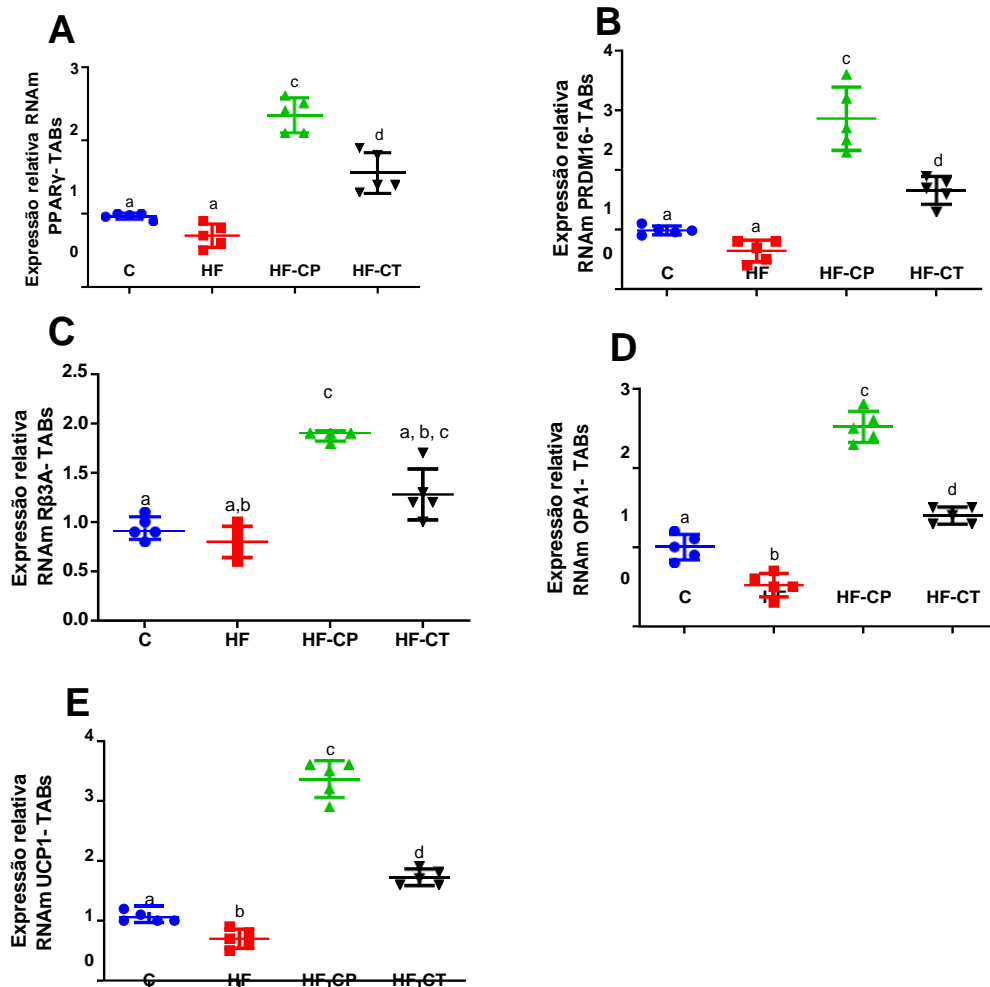


Legenda: Valores apresentados como média \pm DP, $n=6$ por grupo. Figura B: Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

4.8.2. Expressão de genes envolvidos na termogênese no tecido adiposo branco subcutâneo

A expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) para PPAR γ (Figura 19A), um importante fator transcricional envolvido na adipogênese e na diferenciação do adipócito marrom, foi similar entre os grupos C e HF (Figura 20). A expressão desse gene no grupo HF-CP foi superior à observada no grupo HF (+342,8%, $p=0,0001$) e no grupo HF-CT (+58,3%, $p=0,0001$). A expressão do gene PDRM16 (Figura 19B), cofator dos genes PPAR γ , PGC1 α e C/EBPs que está relacionado com a manutenção do fenótipo marrom e sua atividade termogênica, foi similar nos grupos HF e C. A expressão desse gene foi maior no grupo HF-CP quando comparada à do grupo HF (+285,7%, $p=0,0001$) e à do grupo HF-CT (+58,8% $p=0,0001$). A expressão gênica do receptor β 3-adrenérgico (Figura 19C), que recebe estímulos constantes para promover a termogênese adaptativa sem tremores, também foi similar entre os grupos C e HF. A expressão desse gene no grupo HF-CP foi superior à observada no grupo HF (+234,3%, $p=0,0001$). A expressão do OPA-1 (Figura 19D), relacionado com a regulação dos processos de fusão de mitocôndrias e fosforilação oxidativa, foi maior no grupo C quando comparado ao grupo HF (+192,3%, $p=0,0001$). A expressão desse gene nos grupos com adição de café foi superior à apresentada pelo grupo HF (HF-CP: +385%, HF-CT: +169%, $p=0,0001$), sendo a expressão do grupo HF-CP superior à do HF-CT (+80%, $p=0,0001$). O mesmo ocorreu com a expressão gênica da proteína UCP-1 (Figura 20E), responsável por desacoplar os prótons da cadeia respiratória evitando a síntese de ATP e dissipando, portanto, a energia na forma de calor. O grupo HF-CP apresentou maior expressão quando comparado ao grupo HF (+480%, $p=0,0001$) e HF-CT (+195%, $p=0,0001$).

Figura 19 – Expressão de genes envolvidos na termogênese do tecido adiposo subcutâneo, subcutâneo dos animais submetidos à intervenção com café concomitante ao consumo de dieta hiperlipídica por 14 semanas ou após a indução da obesidade nas últimas 4 semanas.



Legenda: Valores apresentados como média ± DP, n=6 por grupo. Figura B: Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por diferentes letras ($p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey). Abreviações: Controle (C), High-fat (HF), High-fat com 1% de café durante as 14 semanas de tratamento (HF-CP), High-fat com 1% de café nas últimas 4 semanas de tratamento, após a indução da obesidade (HF-CT).

5- DISCUSSÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água e o chá (Reyes & Cornelis, 2018; Romualdo *et al.*, 2019). Trabalhos recentes demonstram possíveis benefícios do consumo do café à saúde, em especial nos marcadores associados à obesidade (Baspinar *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de café, incorporado a ração (1% *p/p*), utilizando o seguinte desenho experimental: a) consumo de café associado à dieta hiperlipídica desde o tempo zero de experimento por 14 semanas (HF-CP); b) consumo de café associado à dieta hiperlipídica desde a 10^a semana, após a indução da obesidade, até a 14^a semana (HF-CT). Observamos que no grupo HF-CP, o consumo de café amenizou o ganho de massa e gordura corporal, impediu o quadro de hipersinsulinemia e hiperleptinemia, aumentou a termogênese e a expressão de marcadores da biogênese mitocondrial, foi efetivo na promoção do *browning* e ainda foi capaz de manter a tolerância oral à glicose e o fenótipo marrom dos adipócitos do TAM, prevenindo o processo de *whitening*. Já no grupo HF-CT, os efeitos do consumo de café nos agravos causados pela indução da obesidade foram menos expressivos, entretanto houve diminuição da intolerância oral à glicose, reversão da hiperinsulinemia, e aumento na expressão de genes envolvidos na termogênese adaptativa. O tratamento agudo com café já apresenta bons resultados.

A alta densidade energética da dieta hiperlipídica implicou no aumento da massa corporal do grupo HF. Entretanto, o grupo HF-CP apresentou menor ganho de massa corporal sem apresentar diferença na ingestão de ração e de energia quando comparado ao grupo HF. Este resultado demonstra que quando o café foi consumido antes que os animais ficassem obesos (HF-CP) o ganho de massa corporal foi menor do que quando consumido após a indução da obesidade (HF-CT). Estudos já relataram o efeito protetor da ingestão de café no ganho de massa corporal quando consumido concomitantemente com a dieta hiperlipídica, incorporado à ração, na proporção de 1,1% (*p/p*) por 8 semanas (Fukushina *et al.*, 2009) e na proporção de 2% (*p/p*) no período de 9 semanas (Jia *et al.*, 2014). Quando o café foi consumido na forma de bebida (0,5%, *p/v*) por animais obesos, no período de 2 semanas não foi capaz de retardar o ganho de massa corporal (De Oliveira *et al.*, 2014). Porém, quando consumido (40% - 60%, *v/v*) no período de 6 semanas os animais apresentaram menor ganho de massa corporal (Chiriro *et al.*, 2017).

Sendo assim, o café, seja incorporado à ração ou na forma de bebida, parece exercer seus efeitos benéficos quando consumido por períodos mais longos e em concentrações mais elevadas. No presente trabalho, o café foi consumido de forma oral, incorporado à ração, via de administração não invasiva, segura, não promovendo estresse nos animais e que promoveu efeitos benéficos.

O excesso de massa corporal do grupo HF foi relacionado ao aumento dos depósitos de TAB (epididimário, retroperitoneal e subcutâneo), como relatado por estudos anteriores (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; De Oliveira Correia *et al.*, 2019). Sabe-se que a maior disponibilidade de ácidos graxos livres na circulação derivada da dieta é direcionada ao TAB, que funciona como depósito para o excesso de lipídeos por sua capacidade de hiperplasia e hipertrofia (Gustafon e Smith, 2015). Entretanto, a exposição a uma dieta hiperlipídica, a longo prazo, resulta na hipertrofia do TA com o desenvolvimento de inflamação. Esses efeitos são relacionados com a diminuição da fosforilação da IRS-1, prejudicando a translocação para a membrana e síntese do GLUT-4 favorecendo o desenvolvimento da RI bem como DM2 (Ouch *et al.*, 2011; Petersen & Shulman, 2018), o acúmulo de gordura ectópica e a lipotoxicidade em outros órgãos (Gustafon *et al.*, 2015; Yazici *et al.*, 2017). O consumo de 1% (*p/p*) de café ao longo de 14 semanas incorporado a dieta hiperlipídica (HF-CP) diminuiu o acúmulo de TAB visceral e aumentou o TAB subcutâneo caracterizando um perfil de distribuição do TA mais saudável (Maldonado-Ruiz *et al.*, 2017; Vishvanath, Lavanya, & Rana, 2019). Em contrapartida, o grupo HF-CT apresentou distribuição da massa de TAB de forma similar ao grupo HF, indicando que o consumo de café por 4 semanas, por animais obesos, não foi efetivo em uma melhor composição de gordura nos depósitos de TAB.

A expressão de PPAR γ , um importante fator transcricional envolvido na adipogênese (Hou *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2017) teve maior expressão no grupo HF-CP. Esse grupo apresentou também adipócitos de menor tamanho e maior número. A capacidade de recrutar novos adipócitos por meio da adipogênese é um determinante da melhor distribuição e remodelação do TAB. A expansão saudável do TAB está associada à presença de adipócitos menores e mais numerosos (Unamuno *et al.*, 2018; Vishvanath & Gusta, 2019). Sendo assim, o consumo de café parece exercer seus efeitos benéficos na composição corporal quando consumido por período mais longo, através da indução da adipogênese.

A leptina é um hormônio anorexígeno produzido pelo TAB (Rehman *et al.*, 2018). A concentração plasmática de leptina foi superior no grupo HF caracterizando o fenômeno de hiperleptinemia que é associado ao aumento da massa corporal de TAB (Peng *et al.*, 2021).

Apesar da hiperleptinemia, a dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir a resistência a leptina, caracterizado pela hiperfagia, visto que a ingestão alimentar entre os grupos foi semelhante, logo, a dieta hiperlipídica promoveu resistência a leptina no pâncreas e não hipotalâmica. O consumo de 1% (*p/p*) de café na dieta hiperlipídica por 14 semanas foi capaz de prevenir o quadro de hiperleptinemia, potencialmente em função de uma melhor distribuição do TAB e redução da massa de gordura total (Peng *et al.*, 2021). O aumento da massa de gordura corporal está relacionado ao desenvolvimento dos agravos causados pela obesidade, com modificação do eixo adipoinular, levando aos quadros de intolerância à glicose, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (D' Souza *et al.*, 2017). O grupo HF-CP apresentou tolerância à glicose similar à do grupo C. No grupo HF-CT, essa melhora foi discreta, entretanto melhor que a do grupo HF. A RI, analisada por HOMA-IR, foi revertida pelo consumo preventivo de café. De forma semelhante ao nosso estudo, o consumo de café incorporado a ração hiperlipídica (2% *p/p*), durante a indução da obesidade por 9 semanas, proporcionou melhora na intolerância à glicose (Jia *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014). O mesmo efeito na melhora da tolerância à glicose foi descrito quando o consumo de café foi realizado com animais já obesos. Quando o café foi consumido na forma de bebida (0,5%, *p/v*) no período de 2 semanas (De Oliveira *et al.*, 2014) e quando consumido (40% - 60%, *v/v*) no período de 6 semanas (Chiriro *et al.*, 2017). Em contrapartida, outro trabalho indica que o consumo de café incorporado a dieta hiperlipídica (1,1% *p/p*), durante a indução da obesidade por 8 semanas, não influenciou na homeostase da glicose (Fukushina *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual o consumo de café melhora a tolerância à glicose e RI ainda não está totalmente elucidado. O consumo de café concomitante a uma dieta hiperlipídica reduz a expressão de Socs3, proteína que diminui a fosforilação em tirosina de IRS-1 e sua subsequente associação à subunidade p85. Com a inibição da proteína ocorre a maior fosforilação da tirosina de IRS-1 e do complexo p85/IRS-1. Além disso, a expressão de AKT/PKB com Ser473 fosforilados são aumentados pelo consumo de café. Melhorando a sinalização da insulina com seu transportador e toda a cascata subjacente para a translocação do receptor de glicose. (Jia *et al.*, 2014). Adicionalmente, o tratamento de células 3T3-L1 com extrato de café a 5% (*v/v*) sugeriu melhora na sinalização da insulina através da via ERK1/2 (Chihiro *et al.*, 2017).

No presente estudo, foi observado ainda que a hiperinsulinemia foi revertida nos grupos que consumiram café (HF-CP e HF-CT), fato que provavelmente apresenta relação com a melhora do quadro de tolerância à glicose observada em ambos os grupos. Estudos observacionais relatam que o consumo de café integral ou descafeinado

é associado ao menor risco do desenvolvimento de DM2, bem como sua progressão (Van Dam, 2006; Ding *et al.*, 2014; Pimental *et al.*, 2019), sugerindo que outro fitoquímico, mas não a cafeína, pode ser responsável por esse efeito benéfico do café (Van Dam, 2006; Ong *et al.*, 2012; Bhupathiraju *et al.*, 2013; Stefanello *et al.*, 2018). Os efeitos hipoglicemiantes do café estão associados aos efeitos biológicos dos CGA (Tajik *et al.*, 2017; Stefanello *et al.*, 2018)

No presente trabalho, a concentração plasmática de IL-6 foi menor nos grupos tratados com café quando comparados ao grupo HF, sendo o grupo HF-CP o de concentração mais baixa. A expressão de IL-6 é associada a inflamação. À medida que os adipócitos são hipertrofiados tornam-se cada vez mais infiltrado por macrófagos, pelo ambiente hipotóxico e com isso, a própria célula imune libera IL-6, exacerbando a circulação plasmática da citocina (Morooka *et al.*, 2016; Oliboni *et al.*, 2016; DelGiudice & Gangestad, 2018).

As imagens histológicas do TAB dos animais, refletem o efeito preventivo e terapêutico do café. Pela redução na concentração plasmática da citocina indicando menor hipertrofia do TAB epididimário com uma menor infiltração de macrófagos, redução do quadro de inflamação crônica de baixo grau e com isso, a possível atenuação da RI.

O TAM é especializado na geração de energia, expressa sob a forma de calor, o que contribui para o aumento do gasto energético, conferindo atividade termogênica a esse tecido (Wu *et al.*, 2013; Betz & Enernack, 2015; Bargut *et al.*, 2017). O grupo HF-CP apresentou maior expressão de PPAR γ , PRDM16 e PGC-1 α no TAM quando comparado ao grupo HF indicando manutenção do fenótipo marrom, biogênese mitocondrial, ativação desse tecido e possível atenuação do *whitening* causado pela ingestão de uma dieta hiperlipídica. No grupo HF-CT a expressão desses genes também foi maior quando comparado ao grupo HF, apresentou valores semelhantes ao grupo C mas não suficientes para ser similar ao grupo HF-CP.

O PPAR γ é considerado o principal regulador da adipogênese (Hou *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2017), além disso promove a expressão de PRDM16 fator de transcrição determinante para a diferenciação do adipócito marrom e atividade termogênica, além disso, é co-ativador de PGC-1 α (Kajumira, Seale & Spiegelman, 2010; Harms & Seale, 2013). Visto que o consumo de café aumentou a expressão desses genes, seu consumo pode ativar a via da termogênese adaptativa sem tremores. O que também é sugerido pela maior temperatura corporal dos animais tratados com café. Outra evidência da manutenção do fenótipo marrom e atividade termogênica é a expressão do receptor β 3- adrenérgico. A expressão do receptor foi maior no TAM do grupo HF-CP, e o grupo

HF-CT apresentou valores semelhantes ao grupo C. Sugerindo maior estímulos adrenérgicos (Uldry *et al.*, 2006; Seale, Kamijura & Spiegelman, 2009; Chouchani, Kazak & Spielman, 2018) causados pela ingestão de café. A expressão de UCP-1 também foi superior no TAM do grupo HF-CP comparado aos outros grupos, fato que associado aos resultados da expressão de outros genes termogênicos, pode explicar a maior termogênese e menor ganho de massa corporal. A expressão de UCP1, dentro do TAB, é denominada de *browning*, devido a uma transdiferenciação dos adipócitos brancos, assumindo características fenotípicas de TAM. Essas células são denominadas adipócitos bege e funcionam fisiologicamente como adipócitos marrons promovendo termogênese adaptativa sem tremores (Bargut *et al.*, 2017). Acredita-se que os adipócitos bege tenham um papel distinto na regulação metabólica, além da termogênese, e exibam diferentes propósitos fisiológicos em comparação com os adipócitos marrons clássicos (Lloyd & Obici, 2014). O recrutamento de adipócitos beiges demonstrara desempenhar um papel na homeostase da glicose, sensibilidade à insulina, e metabolismo lipídico (Kaisanlahti & Glumoff, 2018).

A expressão de genes envolvidos no *browning* PPAR γ e PRDM16 no TAB subcutâneo foi superior nos grupos tratados com café. A expressão nos níveis de mRNA de OPA-1 e UCP-1 também corroboraram com o fenômeno de transdiferenciação observado, apenas a expressão do receptor β 3- adrenérgico foi superior apenas no grupo HF-CP. Sendo assim, houve aumento da expressão de genes relacionados ao fenótipo marrom no TAB, indicando maior atividade termogênica no tecido, sugerindo a transdiferenciação para o fenótipo bege (*browning*).

Esses achados podem ser relacionados a atividade termogênica da cafeína a qual ativa a termogênese e lipólise (Yamashita *et al.*, 2012; Quan *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2015; Wang & Seale., 2016; Carlström & Susanna, 2018; Emami *et al.*, 2019). Este fenômeno está relacionado com a capacidade da cafeína em inibir a enzima fosfodiesterase no músculo esquelético e no TA, aumentando a concentração de AMPc e pelo aumento do tempo de permanência da noradrenalina na fenda sináptica (Yamashita *et al.*, 2012; Quan *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2015; Wang & Seale., 2016; Bonet *et al.*, 2017), além de regular positivamente a expressão da UCP-1 (Riedel *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Bonet *et al.*, 2017).

Estudos com extrato de chá mate, bebida que contém cafeína, indicam que sua ingestão oral em camundongos induz a expressão do gene da UCP-1 em TAM (Arcari *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2018). Além disso, o consumo de erva mate aumentou a biogênese mitocondrial através da via AMPK/SIRT1/PGC1 α no TA (Dos Santos *et al.*, 2018). A canela também exerce efeito termogênico (Jiang *et al.*, 2017; Dos Santos *et al.*, 2021; Li *et al.*,

2021). O efeito do extrato de canela, in vivo e in vitro, indica que seu efeito termogênico ocorre através de uma via dependente de PKA/p38 MAPK. Além disso, alguns dos efeitos crônicos do CA são mediados por FGF21, uma adipocina que é conhecido por ativar a termogênese em adipócitos (Jiang *et al.*, 2017). Outro estudo, in vivo, sugere que o mecanismo de termogênese pelo extrato de canela foi associado com a ativação de AMPK/Via SIRT1 (Li *et al.*, 2021). O que também justifica o menor peso e adiposidade dos animais do grupo HF-CP. Como a maior expressão dos genes foi nesse grupo entende-se que o processo de lipólise e termogênese estiveram mais ativos, utilizando mais os substratos, aumentando o gasto calórico e com isso menor massa corporal e adiposidade. Com melhor resultado no TOTG, pela redução do quadro da inflamação crônica e melhora no transporte da glicose.

Diante do exposto, a maior expressão dos genes termogênicos nos grupos tratados com café indica manutenção do fenótipo no grupo HF-CP e reversão do *whitening* no grupo HF-CT. Como o grupo HF-CP apresenta maior expressão e morfologia característica do TAM, entende-se que o processo de lipólise e termogênese foram mais ativos, utilizando mais substratos, aumentando o gasto calórico e com isso o grupo apresentou menor massa corporal e adiposidade. Com melhor resultado no TOTG e HOMA0IR, pela redução do quadro da inflamação crônica devido a menor massa de gordura corporal e por apresentar TAB sem hipertrofia. O consumo de café pelo grupo HF-CT não foi efetivo para diminuir o ganho de massa corporal e reverter as alterações na distribuição do TA, entretanto, melhorou a homeostase de glicose, manteve o fenótipo marrom e sua atividade nos animais tratados.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi observado que o consumo de café exerceu efeitos benéficos na prevenção e no tratamento da obesidade e suas comorbidades, sendo mais efetivo na prevenção. O remodelamento do TA pode ser apontado como um dos principais mecanismos para o efeito anti-obesidade observado, uma vez que o consumo preventivo de café foi associado com redução do TA visceral e da inflamação, aumento do TAM, manutenção do fenótipo marrom com maior expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e termogênese adaptativa indicando browning. Além disso, o consumo de café, de forma preventiva ou terapêutica, diminuiu a hipertrofia do TAB epididimário, o que pode ter levado a um menor grau de inflamação e preservando a homeostase do metabolismo da glicose.

REFERÊNCIAS

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(8):327-332. doi:10.1016/s1043-2760(00)00301-5

Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, *et al.* Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab.* 2011;13(6):739-748. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.002.

Akash MS, Rehman K, Chen S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition.* 2014;30(7-8):755-763. doi:10.1016/j.nut.2013.11.020.

Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084(1):89- 117. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1372.039>. PMID:17151295.

Algire, C.; Medrikova, D.; Herzig, S. White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1831, p. 896 – 904, 2013.

Alves MG, Bernardino RL, *et al.* Dose-dependent effects of caffeine in human Sertoli cells metabolism and oxidative profile: relevance for male fertility. *Toxicology.* 2015;328:12-20. doi:10.1016/j.tox.2014.12.003.

Antonucci, L.; Porcu, C.; Iannucci, G.; Balsano, C.; Barbaro, B. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Nutritional Implications: Special Focus on Copper. *Nutrients* 2017, 9, 1137.

Armani, A. *et al.* Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 572, n. April, p. 564– 572, 2010.

Arhire, Lidia I., Laura Mihalache e Mihai Covasa. "Irisin: uma esperança na compreensão e controle da obesidade e da síndrome metabólica." *Frontiers in endocrinology* 10 (2019): 524. Associação Brasileira Da Indústria De Café. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso: em 05 maio. 2020.

Baek JH, Park JH, Im SS, Song DK. Coffee and health. *Integr Med Res.* 2014;3(4):189-191. doi:10.1016/j.imr.2014.08.002.

Baek JH, Kim NJ, Song JK, Chun KH. Kahweol inhibits lipid accumulation and induces Glucose-uptake through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *BMB Rep.* 2017;50(11):566-571. doi:10.5483/bmbrep.2017.50.11.031.

Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011;17(2):200-205. doi:10.1038/nm.2297.

Bartelt A, John C, Schaltenberg N, *et al.* Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun.* 2017;8:15010. Published 2017 Apr 19. doi:10.1038/ncomms15010

Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation.* 2017 Jan;31(1). DOI: 10.1515/hmbci-2016-005.

Berbée JF, Boon MR, Khedoe PP, *et al.* Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun.* 2015;6:6356. Published 2015 Mar 10. doi:10.1038/ncomms7356.

Betz MJ, Enerback S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes* 2015; 64: 2352-2360 (doi: 10.2337/db15-0146).

Bonet, ML, Mercader, J., & Palou, A. (2017). *Uma perspectiva nutricional da termogênese dependente de UCP1. Biochimie, 134, 99-117.* doi: 10.1016 / j.biochi.2016.12.014.

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, *et al.* A PGC1- α dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463–8.

Bouchard DR, Ross R, Janssen I. Coffee, tea and their additives: association with BMI and waist circumference. *Obes Facts.* 2010;3(6):345-352. doi:10.1159/000322915. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 05 maio de 2020.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. *Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018* In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019 p.132.

Buzelle, Samyra Lopes. *Metabolismo de Ácidos graxos e glicerol no tecido adiposo branco de camundongos com resistência a insulina induzida pela dieta hiperlipídica.* Ribeirão Preto, 2016. 125 p. il.; 30cm. Tese de Doutorado, apresentada á Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Canello, R. *et al.* Leptin and UCP1 Genes are Reciprocally Regulated in Brown Adipose Tissue. *Endocrinology*, v. 139, n. 11, p. 4747–4747, nov. 1998.

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

Cárdenas, Casimiro, Ana R. Quesada, and Miguel A. Medina. "Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene." *PloS one* 6.8 (2011).

Cho, Ae-Sim, *et al.* "Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice." *Food and chemical toxicology* 48.3 (2010): 937-943.

Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019;29(1):27-37. doi:10.1016/j.cmet.2018.11.00

Cildir G, Akıncılar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med.* 2013;19(8):487-500. doi:10.1016/j.molmed.2013.05.001

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(2):797-804. doi:10.1210/endo.138.2.4908

Cinti, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues.

Proceedings of the Nutrition Society, v. 60, n. 3, p. 319–328, ago. 2001a.

Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat Prod Rep.* 2017;34(12):1391-1421. doi:10.1039/c7np00030h

Clifford, Michael N., and Susan Knight. "The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans." *Food chemistry* 87.3 (2004): 457-463.

Clifford, Michael N., ed. *Café: botânica, bioquímica e produção de grãos e bebidas*. Springer Science & Business Media, 2012.

Cohen P, Levy JD, Zhang Y, *et al.* Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell.* 2014;156(1- 2):304-316. doi:10.1016/j.cell.2013.12.021.

Consórcio Pesquisa Café. Disponível em: <<http://www.consorcioquesquisacafe.com.br>>. Acesso em: 05 maio 2020

Corrêa, Vanesa Gesser, *et al.* "Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population." *Revista de Nutrição* 28.2 (2015): 185-196.

Cousin B, Cinti S, Morrioni M, *et al.* Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992;103 (Pt 4):931-942.

Criscuoli, A.; Drioli, E. Vacuum membrane distillation for the treatment of coffee products. *Separation and Purification Technology*, v. 209, n. September, p. 990–996, 2018.

Cypess, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 9 abr. 2009.

D'Souza, Anna M. *et al.* As ações glicorregulatórias da leptina. **Metabolismo molecular**, v. 6, n. 9, pág. 1052-1065, 2017.

De Meneck, Franciele, *et al.* "Evidências emergentes para o papel oposto dos níveis circulantes de irisin e da atividade do tecido adiposo marrom medido por termografia infravermelha no perfil antropométrico e metabólico durante a infância." *Journal of Thermal Biology* (2021): 103010.

De Oliveira, Caroline Candida, *et al.* "Caffeinated and decaffeinated instant coffee consumption partially reverses high-fat diet-induced metabolic alterations in mice." *Food research international* 61 (2014):120-126.

Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

Del Giudice, M., & Gangestad, SW (2018). *Repensando IL-6 e CRP: por que eles são mais do que biomarcadores inflamatórios e por que isso é importante. Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 61-75. doi: 10.1016 / j.bbi.2018.02.013

Dias, R.; *et al.* Roasting process affects the profile of diterpenes in coffee. *European Food Research and Technology*, V. 239, n. 6, p. 961-970, 2014.

Dias, Tiago, *et al.* "Phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of photomorphogenic mutant tomato." *Ciência Rural* 45.5 (2015): 782-787.

Ding M, Bhupathiraju SN, Chen M, van Dam RM, Hu FB. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care*. 2014;37(2):569-586. doi:10.2337/dc13-1203.

Dos Santos Lima, Eduarda, *et al.* "Alimentos termogênicos no controle da obesidade: revisão integrativa da literatura." *Brazilian Journal of Health Review* 4.3 (2021): 9610-9625.

Dos Santos, TW, Miranda, J., Teixeira, L., Aiastui, A., Matheu, A., Gambero, A. Ribeiro, ML (2018). *Yerba Mate estimula a biogênese e termogênese mitocondrial em camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura. Molecular Nutrition & Food Research*, 62 (15), 1800142. doi: 10.1002 / mnfr.201800142

Dulloo AG, Miller DS. Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol*. 1984;62(2):235-240. doi:10.1139/y84-035.

Elias, A, M. T. Perfil físico-químico de blends de variedades de café em diferentes condições do processo de torrefação. 77p. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns, 2019.

Elias I, Franckhauser S, Ferré T, *et al.* Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012;61(7):1801-1813.doi:10.2337/db11-0832.

Emami, Mohammad Reza, *et al.* "Acute effects of caffeine ingestion on glycemic indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials." *Complementary therapies in medicine* (2019).

Farah, A. Chlorogenic acids: from coffee plant to human body. Em *Proceedings of the Vingt-deuxième Colloque Scientifique International sur le Café*; Paris, França, 2009.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, *et al.* FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. 2012;26(3):271-281. doi:10.1101/gad.177857.111.

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(5 Suppl):S192- S203. doi:10.2223/JPED.1709.

Fonseca Raposo, H. Tecido Adiposo: Suas Cores E Versatilidade. *hu rev* 2020, 46, 1-12.

Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, Nedergaard J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta -adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13802-13811. doi:10.1074/jbc.275.18.13802.

Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. 2010;11(4):253-256. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004.

Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?. *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000. doi:10.1210/en.2013-1403.

Gluchowski, N., Becuwe, M., Walther, T. *et al.* Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 2017, 343–355. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.32>

Gonzalez, Laura L., Karin Garrie e Mark D. Turner. "Diabetes tipo 2 - uma doença autoinflamatória impulsionada pelo estresse metabólico." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease* 1864.11 (2018): 3805-3823

Guarino, Daniela, *et al.* "The role of the autonomic nervous system in the pathophysiology of obesity." *Frontiers in physiology* 8 (2017): 665.

Guerra, Carmen, *et al.* "Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity." *The Journal of clinical investigation* 102.2 (1998): 412-420.

Gross B., Pawlak M., Lefebvre P., Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 13 (2017), pp. 36-49.

Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(4):193-200. doi:10.1016/j.tem.2015.01.006.

Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, *et al.* Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science.* 2006;312(5774):734-737. doi:10.1126/science.1123965.

Hammarstedt, A.; Gogg, S.; Hedjazifar, S.; Nerstedt, A.; Smith, U. Adipogênese prejudicada e tecido adiposo disfuncional na obesidade hipertrófica humana. *Physiol. Rev.* 2018 ,98 ,1911–1941.

Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252-1263 (doi: 10.1038/nm.3361).

Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des.* 2008;14(12):1225-1230. doi:10.2174/138161208784246153.

Hou Y., XueP. , *et al.* Factor erythroid-derived factor 2-related factor 2 regulates transcription of CCAAT/enhancer-binding protein beta during adipogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 52 (2012), pp.462-472.

Hu, G. L., *et al.* "The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee." *Food & function* 10.6 (2019): 3113-3126.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. v. 1. Rio de Janeiro.

Indulekha K, Surendar J, Mohan V. High sensitivity C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and vascular cell adhesion molecule-1 levels in Asian Indians with metabolic syndrome and insulin resistance (CURES-105). *J Diabetes Sci Technol.* 2011;5(4):982-8. <http://dx.doi.org/10.1177/193229681100500421>. PMID:21880241

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014. IOC – International Coffee Organization. What's New. Disponível em: <http://ioc.org>. Acesso em: 19/06/2020.

Ishwarya, S. P.; Anandharamakrishnan, C. Spray-Freezing-Drying approach for soluble coffee processing and its effect on quality characteristics. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 149.

Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):61-68. doi:10.1002/jcp.25450.

Jia H, Aw W, Egashira K, *et al.* Coffee intake mitigated inflammation and obesity- induced insulin resistance in skeletal muscle of high-fat diet-induced obese mice. *Genes Nutr.* 2014;9(3):389. doi:10.1007/s12263-014-0389-3.

Jiang, J., Emont, MP, Jun, H., Qiao, X., Liao, J., Kim, D., & Wu, J. (2017). Cinamaldeído induz termogênese autônoma de células de gordura e reprogramação metabólica. *Metabolism*, 77, 58-64. doi: 10.1016 / j.metabol.2017.08.006.

Kajimura, Shingo, Patrick Seale, and Bruce M. Spiegelman. "Transcriptional control of brown fat development." *Cell metabolism* 11.4 (2010): 257-262.

Kelly L Johnston, Michael N Clifford, Linda M Morgan, Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 78, Issue 4, October 2003, Pages 728–733, <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.728>.

Kempf, Kerstin, *et al.* "Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial." *The American journal of clinical nutrition* 91.4 (2010): 950-957.

Kerstin Kempf, Christian Herder, Iris Erlund *et al.*, Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 91, Issue 4, April 2010, Pages 950– 957, <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28548>

Kim SH, Plutzky J. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J.* 2016 Feb;40(1):12-21. <https://doi.org/10.4093/dmj.2016.40.1.12>

Kurzrock, Torsten, and Karl Speer. "Identification of kahweol fatty acid esters in Arabica coffee by means of LC/MS." *Journal of separation science* 24.10-11 (2001): 843-848.

Kwan, Hiu Yee, *et al.* "Cinnamon induces browning in subcutaneous adipocytes." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-12.

Lee A, Lim W, Kim S, *et al.* Coffee Intake and Obesity: A Meta-Analysis. *Nutrients.* 2019;11(6):1274. Published 2019 Jun 5. doi:10.3390/nu11061274.

Lee, Jeonghee, Hye Young Kim, and Jeongseon Kim. "Coffee consumption and the risk of obesity in Korean women." *Nutrients* 9.12 (2017): 1340.

Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(3):107-114.doi:10.1016/j.tem.2008.11.005.

Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E617-626 (doi: 10.1152/ajpendo.00010.2005).

Li, Xiang, *et al.* "Cinnamomum cassia extract promotes thermogenesis during exposure to cold via activation of brown adipose tissue." *Journal of ethnopharmacology* 266 (2021): 113413.

Liu, Lu, *et al.* "Trigonelline inhibits caspase 3 to protect β cells apoptosis in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice." *European journal of pharmacology* 836 (2018): 115-121.

Ludwig, Iziar A., *et al.* "Coffee: biochemistry and potential impact on health." *Food & function* 5.8 (2014): 1695-1717.

Maki, Chihiro, *et al.* "Coffee extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by interrupting insulin signaling through the downregulation of IRS1." *PloS one* 12.3 (2017).

Martini, Daniela, *et al.* "Coffee consumption and oxidative stress: a review of human intervention studies." *Molecules* 21.8 (2016): 979.

Marventano, Stefano, *et al.* "Coffee and tea consumption in relation with non- alcoholic fatty liver and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies." *Clinical nutrition* 35.6 (2016): 1269-1281.

Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. α - Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. α -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 2001;49(4):1952- 1956. doi:10.1021/jf0012502

Mattias Carlström, Susanna C Larsson, Coffee consumption and reduced risk of developing type 2 diabetes: a systematic review with meta-analysis, *Nutrition Reviews*, Volume 76, Issue 6, June 2018, Pages 395–417, <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy014>.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201.

Mellbye, Fredrik Brustad, *et al.* "Cafestol, a bioactive substance in coffee, has antidiabetic properties in KKAY mice." *Journal of natural products* 80.8 (2017): 2353- 2359.

Montanari, T., N. Pošćić, and M. Colitti. "Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review." *Obesity Reviews* 18.5 (2017): 495- 513.

Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr.* 2007;137(10):2196-2201.doi:10.1093/jn/137.10.2196

Moreira, Ricardo Felipe Alves, Luiz Carlos Trugo, and Carlos Alberto Bastos De Maria. "Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos." *Química nova* 23.2 (2000): 195-203.

Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017;7(2):635-674. Published 2017 Mar 16. doi:10.1002/cphy.c160022.

Murase T, Misawa K, Minegishi Y, *et al.* Coffee polyphenols suppress diet- induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(1):E122-E133.doi:10.1152/ajpendo.00441.2010

Natella, F., Nardini, Giannetti, I., Dattilo, C., Scaccini, C..Coffee Drinking Influences Plasma Antioxidant Capacity in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n. 21, p. 6211-6216, 2002.

Nedergaard, Jan, Tore Bengtsson, and Barbara Cannon. "Three years with adult human brown adipose tissue." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212.1 (2010): E20-E36.

Nordestgaard, Ask Tybjærg, Mette Thomsen, and BørgeGrønneNordestgaard. "Coffee intake and risk of obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study." *International journal of epidemiology* 44.2 (2015): 551-565.

Oliveira, Ana Raquel Soares, *et al.* "Hipomagnesemia e sua relação com ainflamação crônica de baixo grau na obesidade." *Revista da Associação Médica Brasileira* 63.2 (2017):156-163.

Peng, Jin, Lijun Yin e Xiaohui Wang. "Resistência à leptina central e periférica na obesidade e melhorias do exercício." *Hormones and Behavior* 133 (2021): 105006

Pereira, M.C. Características químicas, física-químicas e sensorial de genótipos de grãos (*Coffea arábica* L.). 2008. 101p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras,2008.

Perez-Cornago, A., de la Iglesia, R., Lopez-Legarrea, P. *et al.* A decline in inflammation is associated with less depressive symptoms after a dietary intervention in metabolic syndrome patients: a longitudinal study. *Nutr J* 13, 36 (2014). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-36>

Pimentel, Gustavo D., *et al.* "Coffee Intake and obesity." *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. Academic Press, 2019.329-351.

Pimentel, Gustavo D., *et al.* "Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk?." *Diabetology & metabolic syndrome* 1.1 (2009): 6.

Poole, Robin, *et al.* "Coffee consumption and health: umbrella review of meta- analyses of multiple health outcomes." *bmj*359 (2017).

Prieur, X. *et al.* Differential Lipid Partitioning Between Adipocytes and Tissue Macrophages Modulates Macrophage Lipotoxicity and M2/M1 Polarization in Obese Mice. *Diabetes*, v. 60, n. 3, p. 797–809, mar. 2011.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold- inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-839. doi:10.1016/s0092-8674(00)81410-5

Quan H., Kim D., Kim S. *et al.* Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*. v.85(9), p.1330-1340, 2013.

Queiroz, J.C.F.; Alonso-Vale, M.I.C.; Curi, R.; Lima, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, p. 582 - 594, 2009.

Rasoamanana R, Darcel N, Fromentin G, Tomé D. Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(4):446-455.doi:10.1017/S0029665112000110

Ravussin E, Galgani JE. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr*. 2011;31:33-47. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145209

Razzoli, M. *et al.* Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. *Molecular Metabolism*, v. 5, n. 1, p.19–33, jan. 2016.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF

Reeves, Philip G., Forrest H. Nielsen, and George C. Fahey Jr. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." (1993): 1939- 1951.

Rehman, K., Akash, MSH, & Alina, Z. (2018). Leptina: Um novo alvo terapêutico para o tratamento do diabetes mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119 (7), 5016–5027. doi: 10.1002 / jcb.26580.

Richter, Erik A., and Mark Hargreaves. "Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake." *Physiological reviews* 93.3 (2013): 993-1017.

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)

Riedel, Annett, *et al.* "Caffeine dose-dependently induces thermogenesis but restores ATP in HepG2 cells in culture." *Food & function* 3.9 (2012): 955-964.

Roberts-Toler, C.; O'Neill, B. T.; Cypess, A. M. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue: DIO Causes BAT Insulin Resistance. *Obesity*, v. 23, n. 9, p. 1765–1770, set.2015.

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(8):E691-E714. doi:10.1152/ajpendo.00297.2015.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-896.doi:10.1038/nrm2066

Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156 (1-2):20-44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.01.

Rossetti, R.P. Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007

Ruf W, Samad F. Tissue factor pathways linking obesity and inflammation. *Hamostaseologie.* 2015;35(3):279-283.doi:10.5482/HAMO-14-11-0068

Rupnick, Maria A., *et al.* "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.16 (2002): 10730- 10735.

Schipper HS, Rakhshandehroo M, van de Graaf SF, *et al.* Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3343-3354. doi:10.1172/JCI62739.

Schreiber, Renate, *et al.* "A termogênese induzida pelo frio depende da lipólise mediada pelo ATGL no músculo cardíaco, mas não no tecido adiposo marrom." *Cell metabolism* 26.5 (2017): 753-763.

Seale P, Bjork B, Yang W, *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-967.doi:10.1038/nature07182.

Seale, Patrick. "Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation." *Diabetes* 64.7 (2015): 2369-2375.

Shapira, Suzanne N., and Patrick Seale. "Transcriptional control of brown and beige fat development and function." *Obesity* 27.1 (2019): 13-21

Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. 88;118(9):2992-3002. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI34260>.PMid:18769626.

Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *CurrObes Rep.* 2015;4(2):224-229. doi:10.1007/s13679-015-0157-8

Speer, Karl and Kolling-Speer, Isabelle. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.* [online]. 2006, vol.18, n.1 [cited 2020-05-31], pp.201-216. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202006000100014&lng=en&nrm=iso>.

Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 2013; 62: 1774-1782 (doi: 10.2337/db12-1665).

Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, *et al.* Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(15):5874-5879. doi:10.1073/pnas.1200447109

Sung HK, Doh KO, Son JE, *et al.* Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* 2013;17(1):61-72. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.010.

Takahashi K, Yanai S, Shimokado K, Ishigami A. Coffee consumption in aged mice increases energy production and decreases hepatic mTOR levels. *Nutrition.* 2017;38:1-8. doi:10.1016/j.nut.2016.12.021

Takahashi, Shoko, *et al.* "An integrated multi-omics study revealed metabolic alterations underlying the effects of coffee consumption." *PloS one* 9.3(2014).

Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718.

Terroni, H. C. *et al.* Liofilização. *Revista Científica UNILAGO*, p. 271–284, 2011.

Toci, A.; Farah, A.; Trugo, L. C. Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 965–971, 2006.

Trombini, Carolina Balera; Oliveira, Gabriela Gonçalves de. Atualização terapêutica sobre a cafeína. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, [S.l.], v. 29, n. 57, p. 11-22, jul. 2018. ISSN 2596-2809. Disponível em: <<http://periodicos.unifil.br/index.php/Revistateste/article/view/170>>. Acesso em: 05 maio 2020.

Trugo, L. C.; Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* 15: 219–227.

Trugo, L. C., Macrae, R., Dick, J. (1983). Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34: 300-306.

Tsukui, Anna, Sílvia S. Oigman, and Claudia M. Rezende. "Óleo de grãos de café cru: diterpenos cafestol e cafeol." *Revista Virtual de Química* 6.1 (2014): 16-33.

Uldry, Marc, *et al.* "Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation." *Cell metabolism* 3.5 (2006): 333-341.

Van Dam, R. M. "Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells." *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases* 16.1 (2006): 69-77.

Vieira, Abel JSC, Elvira M. Gaspar, and Pedro MP Santos. "Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine." *Radiation Physics and Chemistry* (2020): 108968.

Vignoli, Josiane Alessandra, *et al.* "Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees." *Food Research International* 61 (2014): 279-285.

Vinson, Joe A., Bryan R. Burnham, and Mysore V. Nagendran. "Randomized, double-blind, placebo-controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of a green coffee bean extract in overweight subjects." *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 5 (2012):21.

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(4):619-629.doi:10.1194/jlr.M018846.

Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):691-702. doi:10.1038/nrm.2016.96

Wu J, Boström P, Sparks LM, *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-376. doi: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.

Xue Y, Petrovic N, Cao R, *et al.* Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab.* 2009;9(1):99-109. doi:10.1016/j.cmet.2008.11.009.

Yamashita, K., *et al.* "Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study." *Nutrition & diabetes* 2.4 (2012): e33-e33.

Yang, X.; Enerbäck, S.; Smith, U. Reduced Expression of FOXC2 and Brown Adipogenic Genes in Human Subjects with Insulin Resistance. *Obesity Research*, v.11, n. 10, p. 1182–1191, out. 2003.

Yarmolinsky J, Mueller NT, Duncan BB, Bisi Molina Mdel C, Goulart AC, Schmidt MI. Coffee Consumption, Newly Diagnosed Diabetes, and Other Alterations in Glucose Homeostasis: A Cross-Sectional Analysis of the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *PLoS One*. 2015;10(5):e0126469. Published 2015 May 15. doi:10.1371/journal.pone.0126469.

Yazıcı D, Sezer H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:277-304. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_12. PMID: 28585204.

Zhang LF, Zhou ZW, Wang ZH, *et al*. Coffee and caffeine potentiate the antiamyloidogenic activity of melatonin via inhibition of A β oligomerization and modulation of the Tau-mediated pathway in N2a/APP cells. *Drug Des Devel Ther*. 2014;9:241-272. Published 2014 Dec 24. doi:10.2147/DDDT.S71106.

ANEXOS

Anexo 1



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do café e seus componentes em parâmetros metabólicos e moleculares na obesidade experimental", registrada com o nº 022/2019, sob a responsabilidade de **Julio Beltrame Daleprane** - 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 26/11/2019:

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino / <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/11/2023
Especie/inagem/raca	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	40
Resolvidade	18 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Novembro de 2019.



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



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

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