



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

Dafne Lopes Beserra Silva

Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro

2022

Dafne Lopes Beserra Silva

Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2022

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

S586 Silva, Dafne Lopes Beserra.
Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica / Dafne Lopes Beserra Silva. - 2022.
92 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Açaí – Uso terapêutico – Teses. 2. Tecido adiposo marrom – Teses. 3. Termogênese - Teses. 4. Lipídios - Metabolismo - Teses. I. Resende, Angela de Castro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.89: 613.262

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Dafne Lopes Beserra Silva

Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza-Mello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Eliete Dalla Corte Frantz

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre fizeram de tudo por mim e me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende por aceitar a me orientar durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por confiar no meu trabalho e por todo o aprendizado e incentivo desde a Iniciação Científica até a conclusão deste trabalho.

Aos professores do LFCPM, Prof.^a Dra. Grazielle Freitas de Bem, Prof.^a Dra. Cristiane Aguiar da Costa, Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene e Prof. Dr. Roberto Soares de Moura, por todo o aprendizado.

Aos meus pais, Wagner e Jânuia, por abrirem mão de muitas coisas para me proporcionar a melhor educação que eu pude ter. Obrigada por todos os ensinamentos, por toda a conversa e por tudo que sempre fizeram por mim. Vocês são parte do que eu me tornei.

Às minhas avós, Édima (*in memoriam*) e Maria do Socorro (*in memoriam*), à minha irmã, Dara, aos meus padrinhos, Elaine e Jefferson, e aos meus tios, Ana Luíza, César, Denilza, Márcia e Sandra, por todo o suporte e consideração que sempre tiveram por mim.

Ao meu namorado, Matheus Pontes, por me ajudar a passar por esse momento de ansiedade, por me ajudar a estudar e por sempre me incentivar. Obrigada por todos os momentos que passamos. Obrigada por ser incrível!

À Isabelle Barcellos, por todo o suporte acadêmico e emocional. Obrigada pela amizade e pela parceria incrível mesmo de longe.

Às minhas amigas Gabriela e Lorena, obrigada por todos os desabafos, todas as risadas, todos os abraços e todos os conselhos. Muito obrigada tanto e muito obrigada por serem os melhores presentes que a vida me deu. Aos meus amigos Agatha, Bárbara, Letícia, Marília, Sthefany e Victor por todo o suporte.

À Anna Julia, Marcelle e Nathália. Obrigada por serem amigas sempre presentes, apesar da distância, sempre me incentivando e apoiando.

A todos os meus companheiros de laboratório. Às técnicas e aos alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, que fazem parte da minha vida e deste trabalho. Obrigada por tantos experimentos e experiências compartilhados, e por todos os momentos.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora pela disponibilidade e interesse na participação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. E também com o suporte financeiro da FAPERJ através da concessão da Bolsa de Mestrado Nota 10.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Dafne Lopes Beserra. **Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** 2022. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O aumento das taxas de obesidade e sobrepeso representa uma preocupação urgente de saúde pública e é o principal fator de risco para a síndrome metabólica. O excesso de lipídios favorece o desequilíbrio energético, levando a um remodelamento do tecido adiposo, o que sugere uma associação direta com a indução da obesidade. O tecido adiposo marrom (TAM) está relacionado com a dissipação de energia na forma de calor durante a termogênese adaptativa, contribuindo para o gasto energético. O extrato do caroço do açaí (ASE) promove um efeito anti-obesidade, cujos mecanismos ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do tratamento com ASE sobre o remodelamento do TAM e o seu papel na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no TAM, assim como na diferenciação e proliferação, e utilização de ácidos graxos. Camundongos machos C57BL/6 foram separados em três grupos: controle (dieta 10% lipídeos); HF (dieta 60% lipídeos) e HF+ASE (dieta 60% lipídeos + 300 mg/kg/dia por gavagem intragástrica). A dieta foi administrada concomitantemente ao tratamento durante 12 semanas. A massa corporal foi avaliada semanalmente e a glicemia quinzenalmente durante o período de tratamento. Foram avaliados o perfil lipídico, expressão dos marcadores relacionados à diferenciação e proliferação, à termogênese, à biogênese mitocondrial e à utilização de ácidos graxos, bem como a atividade das enzimas antioxidantes e o dano oxidativo em homogenato de TAM. As alterações morfológicas do TAM e tecido adiposo branco (TAB) foram analisadas histologicamente. O ASE se mostrou eficaz na prevenção do ganho de massa corporal, glicemia e nas alterações morfológicas dos tecidos adiposos branco e marrom dos animais tratados com o extrato quando comparados ao grupo HF. Em TAM, o tratamento com o ASE promoveu o aumento da expressão dos marcadores de diferenciação PRDM16 e PPAR α , da indução da termogênese pAMPK, pLKB1, SIRT-1, UCP-1 e β 3-AR, utilização de ácidos graxos PLIN1, ATGL, HSL e CPT-1 e biogênese mitocondrial PGC-1 α e NRF1 em relação ao grupo HF. O aumento da expressão proteica de UCP-1 no grupo tratado com ASE foi corroborado pela imunomarcagem dessa proteína em TAM. Além disso, o tratamento com ASE também mostrou uma redução do dano oxidativo através da redução dos níveis de MDA em relação ao grupo HF e redução na imunomarcagem de 8-isoprostanos em lâminas de TAM, bem como aumento da atividade da enzima antioxidante SOD, sem alteração da GPx e da catalase do grupo tratado em relação ao grupo HF. O extrato preveniu ainda o aumento dos marcadores inflamatórios MCP-1 e TNF- α em TAM. Esses achados demonstram que o tratamento com o ASE preveniu as alterações estruturais do TAM de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e aumentou a expressão de proteínas chaves relacionadas à termogênese e biogênese mitocondrial, além de reduzir o estresse oxidativo TAM, sugerindo que o extrato pode ser utilizado como uma abordagem importante na prevenção da obesidade.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea* Mart. Termogênese. Tecido Adiposo Marrom.

ABSTRACT

SILVA, Dafne Lopes Beserra. **Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extract in brown adipose tissue thermogenesis induction and mitochondrial biogenesis in high-fat diet-fed mice.** 2022. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The rising rates of obesity and overweight represents an urgent public health concern and are a major risk factor for metabolic syndrome. Excess lipids favor energy imbalance, leading to remodeling of adipose tissue and suggesting a directly association with the induction of obesity. Brown adipose tissue (BAT) is related to the dissipation of energy in the form of heat during adaptative thermogenesis, contributing to energy expenditure. The açai seed extract (ASE) promotes an anti-obesity effect, whose mechanisms are still poorly understood. Therefore, the objective of this work is to evaluate the effects of treatment with ASE on BAT remodeling and its role in thermogenesis induction and mitochondrial biogenesis in BAT, as well as adipocytes proliferation and differentiation, and fatty acid utilization. Male C57BL/6 mice were divided into three groups: control (10% lipid diet); HF (60% lipid diet) and HF+ASE (60% lipid diet + 300 mg/kg/day by intragastric gavage). The diet was administered concurrently with the treatment for 12 weeks. Body mass were measured weekly and blood glucose every fifteen days during the treatment period. The lipid profile, expression of markers related to differentiation and proliferation, thermogenesis, mitochondrial biogenesis and fatty acids utilization, as well as the activity of antioxidant enzymes and oxidative damage in BAT homogenate were evaluated. The morphological alterations of BAT and white adipose tissue (WAT) were analyzed histologically. ASE proved to be effective in preventing body mass gain, blood glucose and morphological changes in white and brown adipose tissue in mice treated with the extract when compared to the HF group. In BAT, ASE treatment prevented the increased expression differentiation markers PRDM16 and PPAR α , thermogenesis induction pAMPK, pLKB1, SIRT-1, UCP-1 and β 3-AR, fatty acid utilization PLIN1, ATGL, HSL and CPT-1, and mitochondrial biogenesis PGC-1 α and NRF1 in relation to the HF group. The increase in UCP-1 protein expression in the group treated with ASE was corroborated by immunostaining of this protein. In addition, ASE treatment also showed a reduction in oxidative damage through a reduction in MDA levels compared to the HF group and a reduction in 8-isoprostane immunostaining, as well as increased activity of the antioxidant enzyme SOD, without changing the enzymatic activity of GPx and catalase in the treated group in relation to the HF group. The extract also prevented the increase of inflammatory markers MCP-1 and TNF- α in BAT. These findings demonstrate that treatment with ASE prevented structural changes in the BAT of high-fat fed mice and increased the expression of key proteins related to thermogenesis and mitochondrial biogenesis, in addition to reducing oxidative stress in BAT, suggesting that extract can be used as an important approach in preventing obesity.

Keywords: *Euterpe oleracea* Mart. Thermogenesis. Brown adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Depósitos de Gordura em Camundongos	18
Figura 2 - Origem do Desenvolvimento de Adipócitos Marrons	21
Figura 3 - Ativação do Tecido Adiposo Marrom	24
Figura 4 - Via da Biogênese Mitocondrial	27
Figura 5 - Camundongo C57Bl/6	31
Figura 6 - Euterpe oleracea Mart.	32
Figura 7 - Análise por HPLC do ASE	33
Figura 8 - Preparo do ASE	38
Figura 9 - Efeitos do tratamento com ASE sobre o peso e ganho de massa corporal	49
Figura 10 - Efeito do tratamento com ASE sobre a ingestão de ração e energia	50
Figura 11 - Efeito do tratamento com ASE sobre os índices glicêmicos	51
Figura 12 - Efeito do tratamento com ASE sobre o peso do tecido adiposo e o índice de adiposidade	52
Figura 13 - Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico plasmático	54
Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE sobre as alterações morfológicas no Tecido Adiposo Branco	55
Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE sobre as alterações morfológicas do Tecido Adiposo Marrom.....	56
Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das proteínas envolvidas na diferenciação e diferenciação de adipócitos marrons	58
Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de UCP-1	59
Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão do Receptor β 3-adrenérgico ..	60
Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas envolvidas na ativação do Tecido Adiposo Marrom.....	62
Figura 20 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de proteínas da utilização de ácidos graxos	64
Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da biogênese mitocondrial	65
Figura 22 - Efeito tratamento com ASE sobre imunomarcção de 8-isoprostano	66
Figura 23 - Efeito do tratamento com ASE sobre os marcadores de dano oxidativo.....	67
Figura 24 - Efeito do ASE sobre a atividade das enzimas antioxidantes	68

Figura 25 - Efeito do ASE sobre a imunomarcção de IL-6	69
Figura 26 - Efeito do ASE sobre a imunomarcção de MCP-1	70
Figura 27 - Efeito do ASE sobre a imunomarcção de TNF- α	71
Figura 28 - Resumo Gráfico dos Resultados	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das dietas	37
Quadro 2 - Cálculo de VLDL e HDL	40
Quadro 3 - Anticorpos Primários para Western Blotting	41
Quadro 4 - Anticorpos Primários para Imunohistoquímica	46
Quadro 5 - Resumo Gráfico dos Resultados	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP (do inglês <i>AMP-activated protein kinase</i>)
ASE	Extrato hidroalcolico do caroço do açaí (do inglês <i>Açaí Seed Extract</i>)
ATGL	Lipase Triglicerídeo Adiposa (do inglês <i>Adipose Triglyceride Lipase</i>)
BMP7	Proteína Óssea Morfogenética 7 (do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein 7</i>)
CPT-I	Carnitina Palmitoiltransferase I
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HSL	Lipase hormônio-sensível (do inglês <i>Hormone-Sensitive Lipase</i>)
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LKB1	Quinase B1 do fígado (do inglês <i>Liver kinase B1</i>)
LPL	Lipoproteína Lipase
LRT	Lipoproteínas ricas em triglicerídeos
MCP-1	Proteína Quimiotática do Monócito 1 (do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>)
NRF1	Fator Respiratório Nuclear 1 (do inglês <i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP fosforilada (do inglês <i>phosphorylated AMP-activated protein kinase</i>)
PCG1- α	Coativador do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma γ (do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator</i>)
PLIN1	Perilipina 1
PPAR α	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma α (do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor α</i>)

PPAR γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma γ (do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
PRDM16	Domínio contendo PR16 (do inglês <i>PR domain containing 16</i>)
RI	Resistência à insulina
SIRT-1	Sirtuína 1
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SOD	Superóxido Dismutase
TAB	Tecido Adiposo Branco
TABI	Tecido Adiposo Branco Intra-abdominal
TABS	Tecido Adiposo Branco Subcutâneo
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
UCP-1	Proteína Desacopladora 1 (do inglês <i>Uncoupling Protein 1</i>)
β 1-AR	Receptor β 1 adrenérgico (do inglês <i>β1 Adrenergic Receptor</i>)
β 3-AR	Receptor β 3 adrenérgico (do inglês <i>β3 Adrenergic Receptor</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1.1 Tecido Adiposo	17
1.2 Tecido Adiposo Marrom	19
1.3 Diferenciação e Proliferação do Tecido Adiposo Marrom	20
1.4 Ativação do Tecido Adiposo Marrom e Termogênese	23
1.5 Biogênese Mitocondrial	26
1.6 Inflamação e Estresse Oxidativo no Tecido adiposo Marrom	28
1.7 Modelo Experimental de Obesidade Induzida por Dieta	30
1.8 Extrato Hidroalcoólico do Caroço do Açaí (ASE)	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos Gerais	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais e modelo experimental	36
3.2 Preparo ASE	37
3.3 Ingestão alimentar, ingestão de energia, massa corporal e ganho de peso corporal	38
3.4 Glicemia	39
3.5 Eutanásia	39
3.6 Perfil Lipídico	39
3.7 Expressão de Proteínas por Western Blotting	40
3.8 Determinação do Estresse Oxidativo	42
3.8.1 <u>Homogenato e Dosagem de Proteínas</u>	42
3.8.2 <u>Determinação do Dano Oxidativo</u>	43
3.8.2.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	43
3.8.2.2 Carbonilação de Proteínas	43
3.8.3 <u>Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes</u>	44
3.8.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	44
3.8.3.2 Atividade da Catalase	44
3.8.3.3 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)	45
3.9 Análise Morfológica	45
3.10 Imunohistoquímica	45

3.11	Análise Estatística.....	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Efeito do tratamento com ASE no peso corporal e ganho de massa corporal....	48
4.2	Efeito do tratamento com ASE sobre a ingestão de ração e energia	50
4.3	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis glicêmicos	51
4.4	Efeito do tratamento com ASE sobre o peso do tecido adiposo e o índice de adiposidade.....	52
4.5	Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico	53
4.6	Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia do Tecido Adiposo Branco Visceral.....	55
4.7	Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia do Tecido Adiposo Marrom.....	56
4.8	Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão dos principais marcadores da diferenciação e proliferação de adipócitos marrons	57
4.9	Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas relacionadas à termogênese no Tecido Adiposo Marrom.....	59
4.10	Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das proteínas envolvidas na ativação e regulação da termogênese do Tecido Adiposo Marrom	60
4.11	Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas da utilização de ácidos graxos no Tecido Adiposo Marrom.....	63
4.12	Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas da biogênese mitocondrial.....	65
4.13	Efeito do tratamento com ASE sobre o dano oxidativo no Tecido Adiposo Marrom	66
4.14	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade enzimática antioxidante no Tecido Adiposo Marrom.....	68
4.15	Efeito do tratamento com ASE sobre a imunomarcagem de citocinas pró-inflamatórias no Tecido Adiposo Marrom.....	69
5	DISCUSSÃO	72
	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO – Declaração do Comitê de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais.....	93

INTRODUÇÃO

O aumento global nas taxas de sobrepeso e obesidade representa uma preocupação urgente de saúde pública e está associado a comorbidades graves na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Rosendahl *et al.*, 2018). A obesidade constitui o principal fator de risco para a síndrome metabólica (SM), uma vez que favorece o aparecimento de outras patologias, como hipertensão arterial sistólica (HAS), diabetes mellitus 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e dislipidemia (Gao, 2014; Weisinger *et al.*, 2009). Além de distúrbios músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer (WHO, 2019).

Sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde (WHO, 2019). O diagnóstico da obesidade é realizado a partir do índice de massa corporal (IMC), obtido pela relação entre peso corpóreo (kg) e a estatura (m)² dos indivíduos, parâmetro estipulado pela OMS (WHO, 1998). Através deste parâmetro, são considerados com sobrepeso os indivíduos cujo IMC está entre 25 e 29,9 kg/m² e obesos aqueles que possuem IMC igual ou superior a 30 kg/m² (WHO, 2019).

A prevalência global de obesidade quase triplicou desde 1975, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estima-se que 39% dos adultos acima dos 18 anos possuem sobrepeso e 13% são obesos (WHO, 2021). No Brasil, dados recentes do Sistema de vigilância de doenças por inquérito telefônico (VIGITEL, 2020) demonstram que 21,5% da população brasileira é obesa e algumas estimativas da OMS indicam que em 2025 o Brasil estará entre os cinco principais países com elevados índices de obesidade (Romero & Zanesco, 2006).

A obesidade é uma condição crônica de origem multifatorial, ou seja, diversos fatores complexos estão envolvidos em sua gênese, com destaque para a mudança nos padrões de dieta e estilo de vida nas últimas décadas (Rosendahl *et al.*, 2018). Os fatores ambientais associados à obesidade incluem status socioeconômico, etnia, região de residência e vida urbana (Jiang *et al.*, 2016). No entanto, a obesidade resulta de um balanço energético positivo, ou seja, um desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia (Ye *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2016). A predisposição genética pode ser um fator determinante para o ganho de peso, entretanto, existe um consenso crescente de que os hábitos alimentares e os padrões de

atividade física podem desempenhar maior relevância no desenvolvimento dessa patologia (Jiang *et al.*, 2016).

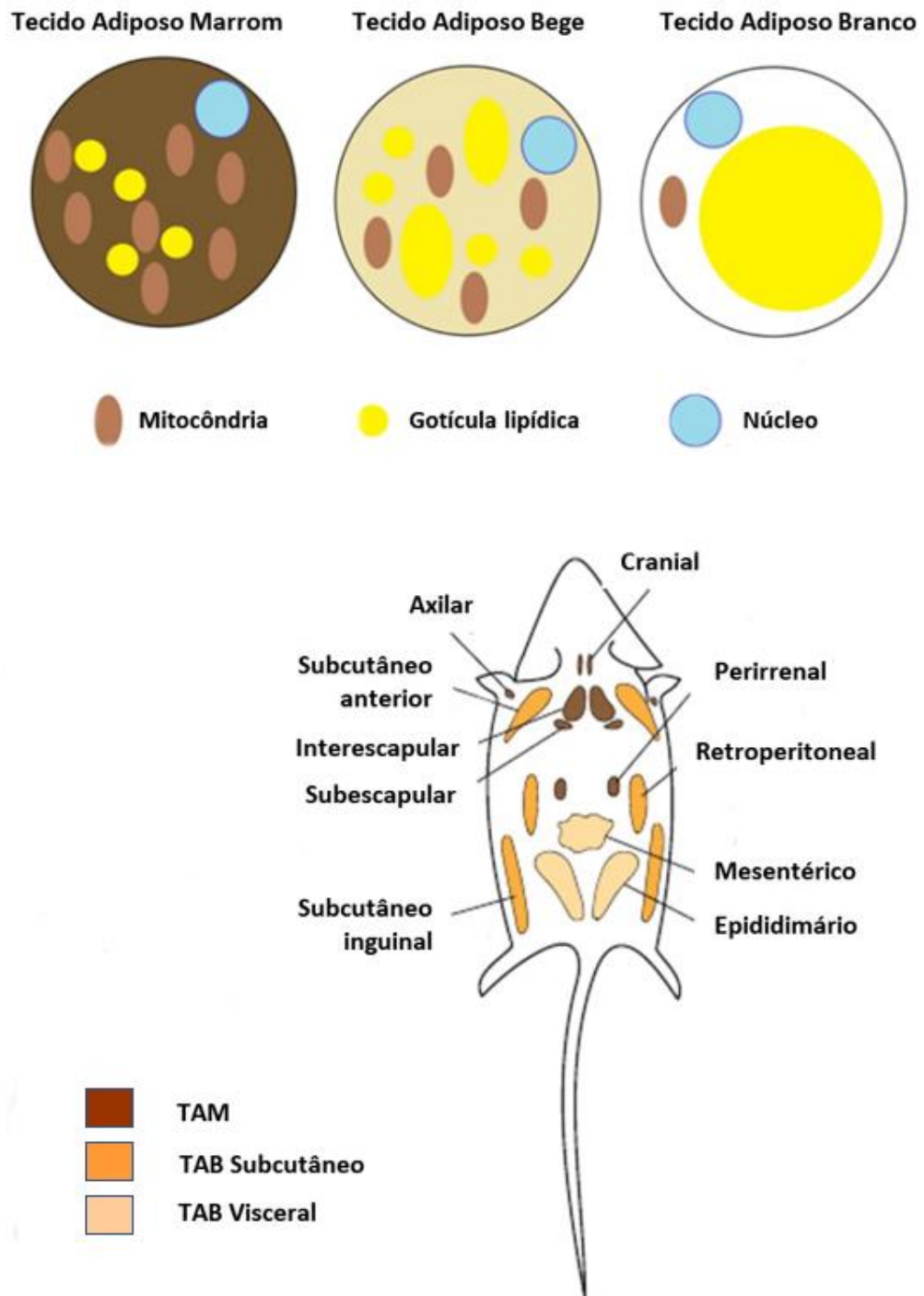
1.1 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é histologicamente dividido em dois principais tipos, que apresentam propriedades morfológicas e funcionais bem distintas (Figura 1). O tecido adiposo marrom (TAM) apresenta adipócitos multiloculares com abundância de mitocôndrias, o que proporciona a cor característica ao tecido, e está relacionado com a dissipação de energia na forma de calor durante a termogênese induzida pelo frio e pela dieta através da elevada expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1), além de desempenhar um papel importante na adiposidade. O tecido adiposo branco (TAB) é formado por adipócitos uniloculares e é responsável pelo armazenamento de lipídeos na forma de triglicerídeos (TG), sendo o principal reservatório energético do organismo. Além disso, o TAB atua como um órgão endócrino através da secreção de adipocinas. (Ye *et al.*, 2019, Das *et al.*, 2018; McArdle *et al.*, 2013; Queiróz *et al.*, 2009).

O tecido adiposo do obeso apresenta mudanças morfológicas e funcionais (Itoh *et al.*, 2011). O aumento do TAB em tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) de adipócitos está diretamente envolvido no aparecimento da obesidade, uma vez que está associado ao aumento do peso corporal e mudanças no padrão de secreção de citocinas e quimiocinas, além de estar relacionado com a hipóxia, morte celular, infiltração de células imunes e desregulação no metabolismo de ácidos graxos. O balanço entre adipogênese e adiposidade determina o grau de obesidade do indivíduo (McArdle *et al.*, 2013; Queiróz *et al.*, 2009).

O TAB está distribuído pelo corpo dividido em dois principais subtipos, que apresentam diferentes localizações e efeitos metabólicos (Figura 1): tecido adiposo branco subcutâneo (TABS) e tecido adiposo branco intra-abdominal (TABI). O TABI é encontrado na região intra-abdominal e inclui o TAB retroperitoneal, mesentérico e epididimário, que estão adjacentes aos órgãos e estão diretamente relacionados à obesidade central. Desta forma, seu aumento está associado aos efeitos maléficos observados nesta patologia. O TABS, por sua vez, é dividido em TABS anterior e inguinal. Esse tecido é encontrado embaixo da pele e está relacionado com a obesidade periférica, e seu aumento está relacionado ao aumento da sensibilidade à insulina e um menor risco de desenvolver DM2 (Chait & Hartigh, 2020; Pollard & Carling, 2020; Tran & Kahn, 2010). O TAM, por sua vez, nos roedores e pequenos mamíferos, está localizado no espaço interescapular e na região supraclavicular (Figura 2) (Chait & Hartigh, 2020).

Figura 1 - Depósitos de Gordura em Camundongos



Legenda: Representação gráfica dos principais tipos de adipócitos e suas principais diferenças, e localização anatômica dos depósitos de gordura em camundongos.

Fonte: Adaptado de Pollard & Carling, 2020; Santacruz-Hidalgo & Viscarra-Sanchez, 2019.

Além disso, existem evidências recentes da formação de um tecido adiposo intermediário dentro do TAB. Esse tecido é chamado de tecido adiposo bege e é formado através de um processo conhecido como *browning* (Das *et al.*, 2018; Bonfante *et al.*, 2015). Essas células adiposas intermediárias apresentam elevados níveis de UCP-1 e mostram atividade termogênica semelhante ao TAM quando estimuladas (Das *et al.*, 2018). Esses estímulos estão relacionados ao exercício, exposição crônica ao frio e ativação de PPAR γ . Além disso, a indução do *browning* tem sido utilizada como uma estratégia alternativa para aumentar o gasto energético e para o tratamento da obesidade (Fan *et al.*, 2019).

1.2 Tecido Adiposo Marrom

Estudos recentes indicam a presença de TAM em humanos adultos, ao contrário do que se acreditava na comunidade científica (Alacalá *et al.*, 2019) e esse tecido representa cerca de 1 a 2% do depósito total de gordura nos humanos (Chait & Hartigh, 2020). A ativação do TAM melhora a homeostase metabólica através da dissipação do excesso de energia e da produção de fatores conhecidos como adipocinas marrons ou batocinas, como o Fator de crescimento de fibroblasto (FGF-21), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Interleucina-6 (IL-6). Essas batocinas exercem efeitos parácrinos e autócrinos. Contudo, devido à pequena quantidade de TAM presente no organismo, os efeitos endócrinos das adipocinas marrons ainda não são bem conhecidos (Chait & Hartigh, 2020; Das *et al.*, 2018, Rui, 2018). Além disso, a indução da termogênese é capaz de controlar a temperatura corporal e a ingestão de energia (Yoneshiro *et al.*, 2018).

O TAM é composto por 20 – 30% de adipócitos marrons maduros e metabolicamente ativos. Esse tecido possui uma rica vascularização e inervação, principalmente ligada à divisão simpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), tendo a noradrenalina como um neurotransmissor importante para deflagrar o estímulo da termogênese (Scheele & Wolfrum, 2020).

Os adipócitos marrons podem proliferar e iniciar a adipogênese quando o TAM é recrutado, em um processo sob controle adrenérgico que envolve dois mediadores-chave: o co-ativador gama de receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PGC) 1-alfa e o domínio contendo PR 16 (PRDM16). Os adipócitos marrons diferenciados aumentam a

expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico e função mitocondrial, e da UCP-1. Assim, diferentes fatores podem induzir e ativar o TAM, incluindo o frio, a ativação simpática, medicamentos e compostos nutricionais (Karise *et al.*, 2019; Cannon & Nedergaard, 2004).

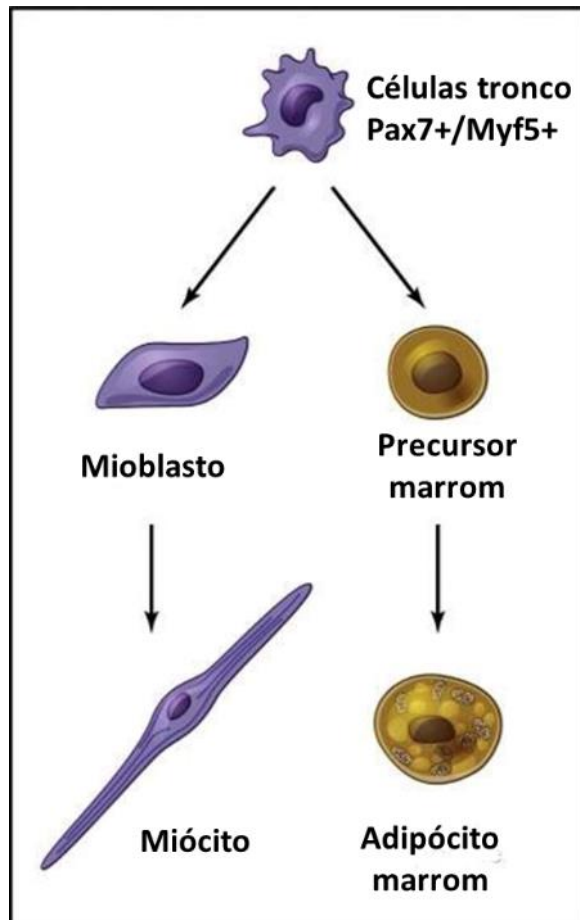
Alguns estudos demonstraram que o TAM exibe uma taxa surpreendentemente elevada de captação da glicose durante estimulação com baixa temperatura, sugerindo que o TAM exerce um importante papel na regulação da homeostase metabólica da glicose (Ouellet *et al.*, 2012). Portanto, a investigação de possíveis estratégias farmacológicas para aumentar as quantidades de TAM ou sua atividade de termogênese pode ser terapeuticamente benéfica para os tratamentos relacionados à SM (Zhang *et al.*, 2019). Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos que promovem a disfunção do TAM na obesidade, mas estudos recentes sugerem um aumento local da inflamação, estresse do retículo endoplasmático e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), com redução da atividade antioxidante (Alcalá *et al.*, 2017).

A disfunção do adipócito marrom na obesidade é conhecida como *whitening*, que é a transdiferenciação do adipócito marrom em adipócito com fenótipo semelhante ao branco, o que compromete a termogênese e contribui para a disfunção do metabolismo da glicose. Esse processo é caracterizado pela disfunção mitocondrial e aumento da inclusão lipídica neste tecido, além de uma insuficiente resposta angiogênica e hipóxia (Miranda *et al.*, 2020; Shimizu *et al.*, 2014).

1.3 Diferenciação e Proliferação do Tecido Adiposo Marrom

Os adipócitos marrons se desenvolvem a partir de uma população de células tronco mesenquimais caracterizadas pela expressão de marcadores de linhagem muscular Myf5 e Pax7. Desta forma, a mesma linhagem celular pode dar origem aos miócitos e aos adipócitos marrons, e essa diferenciação vai depender do estímulo recebido pela célula: Na presença de PRDM16 a célula se compromete com a diferenciação em adipócitos marrons e na ausência de PRDM16 essas células dão origem aos miócitos (Figura 2) (Alcalá *et al.*, 2019; Sampath *et al.*, 2016; Rosen & Spiegelman, 2014).

Figura 2 - Origem do Desenvolvimento de Adipócitos Marrons



Legenda: Origem do desenvolvimento de adipócitos marrons. As células da linhagem miogênica e de adipócitos marrons são derivadas de células-tronco Pax7+/Myf5+.

Fonte: Adaptado de Sampath *et al.*, 2016.

A principal batocina envolvida na adipogênese marrom é a Proteína Morfogenética do Osso 7 (BMP7), que é um fator chave para o comprometimento da célula mesenquimal pluripotente em pré-adipócito marrom e determina a linhagem marrom durante o desenvolvimento (Tabuchi & Sul, 2021; Rosen & Spiegelman, 2014). Ela é expressa durante a fase inicial da adipogênese e induz a expressão de reguladores da diferenciação de adipócitos marrons, como o Coativador do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PGC-1 α) e PRDM16. Além disso, também induz a expressão de genes específicos do TAM relacionados à termogênese, como a Proteína Desacopladora 1 (UCP-1) e à biogênese mitocondrial, Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) e Fator Respiratório Nuclear (NRF1) (Alcalá *et al.*, 2019; Rui, 2018).

A transcrição de diversos fatores tem sido descrita como reguladores da diferenciação e função desses adipócitos marrons, dentre eles pode-se destacar o Receptor Ativado por

Proliferadores de Peroxissomas γ (PPAR γ), Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomas α (PPAR α), PGC-1 α e o PRDM16.

Os PPARs fazem parte de um grupo de proteínas nucleares que funcionam como fatores de transcrição. O PPAR γ , bem como o PPAR α , desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação dos adipócitos marrons (Gharanei *et al.*, 2020).

O PPAR γ é descrito na literatura como sendo um fator importante para a diferenciação dos adipócitos marrons, com papel fundamental no desenvolvimento, função e sobrevivência destes adipócitos, além de induzir a expressão de UCP-1 durante a adipogênese. Alguns estudos demonstram que agonistas de PPAR γ podem aumentar a lipogênese *de novo* e aumentar a transdiferenciação do tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom (Gharanei *et al.*, 2020; Sampath *et al.*, 2016). O PPAR α , por sua vez, induz a expressão de PGC-1 α e PRDM16.

O PRDM16 promove o comprometimento de células progenitoras da linhagem marrom, Myf5. Ele estimula a adipogênese pela sua ligação com PPAR γ e também atua como um co-fator da transcrição de diversos reguladores, como PGC-1 α e C/EBP β , promovendo a indução de genes específicos do adipócito marrom, estimulando a expressão de UCP-1 e a termogênese no TAM. Além disso, ele pode ser desacetilado por ação da Sirtuína (SIRT-1) e se ligar ao PPAR γ , suprimindo a expressão de reguladores negativos do TAM e de genes relacionados à adipogênese do TAB. Fatores como o PPAR α e o PPAR γ podem atuar estimulando a expressão de PRDM16. Estudos recentes têm demonstrado que a adipogênese marrom acontece na ausência de PRDM16 devido à ativação independente de PPAR γ e C/EBP α/β (Gharanei *et al.*, 2020; Sampath *et al.*, 2016).

Já o PGC-1 α é caracterizado como um cofator de PPAR γ induzido pelo frio, sendo apontado como um regulador chave da biogênese mitocondrial, da termogênese adaptativa e também do metabolismo oxidativo (Alcalá *et al.*, 2019; Rui, 2018).

A proliferação dos adipócitos marrons é mediada pelo receptor β 1-adrenérgico (β 1-AR), único adrenorreceptor que é expresso nos pré-adipócitos marrons, e com a participação do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e VEGF. Já a proliferação do adipócito maduro expressa o receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR) (Alcalá *et al.*, 2019; Karise *et al.*, 2019; Bronnikov *et al.*, 1999).

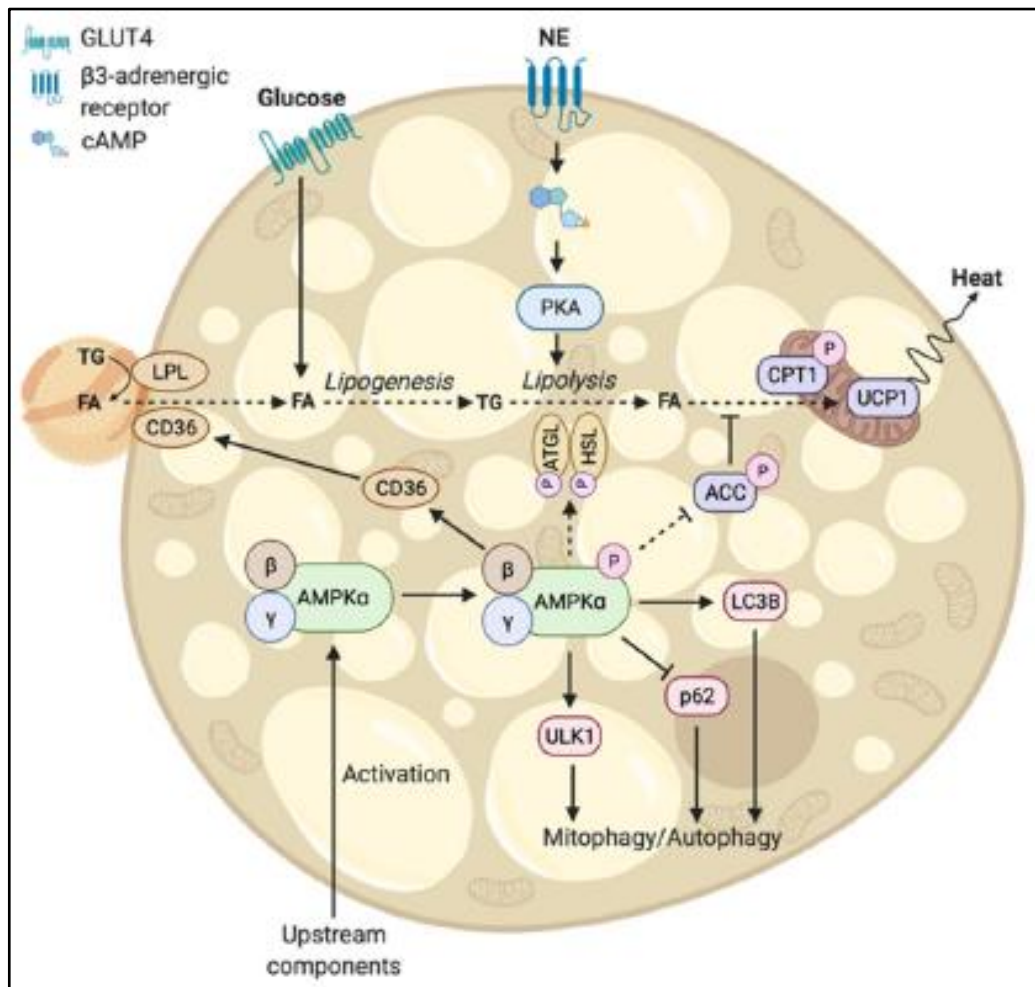
1.4 Ativação do Tecido Adiposo Marrom e Termogênese

O TAM é o maior sítio de termogênese não ligada ao tremor no corpo humano. Neste tipo de termogênese a energia química é desacoplada e ao invés de resultar na síntese de ATP, é liberada sob a forma de calor (Fenzel & Kiefer, 2014). A termogênese não ligada ao tremor, também conhecida por termogênese adaptativa, pode ser induzida de duas formas: pelo frio ou pela dieta e é regulada por múltiplas vias de sinalização (Zhang *et al.*, 2021).

O mecanismo primário pelo qual o TAM promove a termogênese adaptativa é através do desacoplamento da cadeia respiratória mediado por UCP-1, que resulta no aumento da oxidação dos substratos e dissipa a energia na forma de calor. Durante a exposição ao frio, a ativação de adrenorreceptores pela noradrenalina leva ao catabolismo de lipídeos, liberando ácidos graxos livres (AGL) e induzindo a expressão de UCP-1 e genes pró-termogênicos. A ativação da UCP-1 induz o movimento de elétrons pela matriz mitocondrial, reduzindo os níveis de hidrogênio, ativando as vias respiratórias e oxidando os ácidos graxos (Shinde *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Sendo assim, o TAM é especializado na produção de calor através da termogênese adaptativa pela queima de combustíveis como ácidos graxos (AG) e glicose (Tabuchi & Sul, 2021).

A exposição ao frio, dietas gordurosas e alguns tipos de medicamentos e compostos naturais recrutam e ativam o TAM em um processo sob o controle adrenérgico. Esses estímulos levam à liberação de noradrenalina pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) e esse neurotransmissor irá promover seus efeitos ao se ligar em receptores β -adrenérgicos, especialmente o receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR), um receptor acoplado à proteína Gs, que resulta na inserção de UCP-1 na membrana mitocondrial interna, de forma que permite além da ATP sintase, outra via de entrada dos prótons da cadeia respiratória na matriz mitocondrial. Portanto, quando estes prótons passam pela UCP-1 o ADP não é convertido em ATP e a energia é liberada como calor. Este gasto de energia tem potencial terapêutico com a capacidade de inclinar a balança energética a favor da produção de energia (Karise *et al.*, 2019; Unser *et al.*, 2015).

Figura 3 - Ativação do Tecido Adiposo Marrom



Legenda: Ativação do tecido adiposo marrom a partir da secreção de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático e via AMPK. Abreviaturas: Acetil-CoA Carboxilase, ACC; Proteína Quinase Ativada por AMP (AMPK); Lipase triglicérido adiposa (ATGL); AMP cíclico (cAMP); cluster de diferenciação 36 (CD36); carnitina palmitoiltransferase (CPT1), ácido graxo (FA); lipase hormônio-sensível (HSL); proteína quinase A (PKA); triglicerídeos, TG; proteína desacopladora 1 (UCP-1).

Fonte: Van der Vaart *et al.*, 2021.

A AMPK é uma quinase de extrema importância para a ativação do TAM e a indução da termogênese neste tecido (Figura 3). Esta proteína é considerada um importante relógio metabólico que regula diversos processos no metabolismo de lipídeos. Sua inativação leva à inativação de processos catabólicos que geram ATP, enquanto sua ativação vai levar à inibição de processos anabólicos que consomem o ATP e à ativação de processos catabólicos. Em virtude dessa capacidade de sensor energético, a AMPK pode atuar como um importante sensor para distúrbios do balanço energético causados por estresse metabólico a nível celular e corporal (Van Der Vaart *et al.*, 2021).

Uma vez ativada, a AMPK é fosforilada no resíduo de Treonina 172, o que permite que ela atue em outros alvos, ativando vias anabólicas que vão resultar em maior geração e menor consumo de ATP. Além disso, a fosforilação da AMPK regula positivamente PGC1- α e SIRT-1 para aumentar a biogênese mitocondrial (Tang *et al.*, 2020). No TAM, a AMPK é diretamente ativada pela exposição ao frio, alguns compostos, *downregulation* da AMPK hipotalâmica e algumas quinases, como a quinase B1 do fígado (LKB1) (Van Der Vaart *et al.*, 2021).

A termogênese requer, dentre outros substratos, a utilização de lipídeos para acontecer. Neste caso, a β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria se faz de extrema importância (Lee *et al.*, 2015). Os AG liberados pela hidrólise de TG são o substrato primário para a termogênese adaptativa, além disso, as Lipoproteínas Ricas em TG (LRT) circulantes são as principais fontes de AG para esse processo (McNeill *et al.*, 2020).

Com a indução da termogênese, o processo de lipólise é desencadeado no TAM, aumentando a disponibilidade de AG. A captação dos AGL pelo TAM é mediada por diversos transportadores, e a captação dos AG provenientes das LRT acontece por ação da Lipoproteína Lipase (LPL) (McNeill *et al.*, 2020).

A Perilipina-1 (PLIN1) é uma proteína de revestimento de gotícula de lipídeos e é necessária para a homeostase lipídica. No estado basal, a PLIN1 envolve as gotículas de gordura e inibe a lipólise nos adipócitos. Por outro lado, a presença de catecolaminas promove a lipólise, induzindo a translocação da lipase hormônio-sensível (HSL) (Sohn *et al.*, 2018).

Alguns estudos utilizando mitocôndrias isoladas de TAM sugerem um papel importante dos AG como reguladores da respiração mitocondrial do adipócito marrom (Shinde *et al.*, 2021). Os AG são liberados a partir de um processo conhecido como lipólise. A lipólise nos estoques intracelulares de lipídeos pode ser ativada pelo frio ou pela ativação simpática via receptores β 3-AR e se inicia com a ação da enzima Lipase Triglicerídeo Adiposa (ATGL), que responde à noradrenalina e catalisa a hidrólise de triglicerídeos em diacilgliceróis. Após a ação da ATGL, a HSL irá atuar hidrolisando os diacilgliceróis em AGL e glicerol. Além disso, a AMPK promove a translocação do cluster de diferenciação 36 (CD36) e a ativação da lipoproteína lipase (LPL), que desempenham um papel importante na lipólise extracelular e captação de AG derivados dos triglicerídeos das lipoproteínas (Van der Vaart *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2019; Vásquez-Vela & Tovar, 2008).

Em adipócitos termogênicos, os AG liberados não servem apenas como combustível para a oxidação, mas também ativam a UCP-1 alostericamente. Além disso, os AG derivados

da lipólise têm efeitos de longo prazo na capacidade termogênica das células, ativando fatores de transcrição, como os PPARs, que aumentam a expressão de UCP-1 e de outros genes que promovem a fosforilação oxidativa para a geração de calor (Heeren & Scheja, 2018).

Os AGL são transportados através da carnitina plamitoiltransferase 1B (CPT-1) para dentro das mitocôndrias, onde serão oxidados e dissipados na forma de calor. Esse transportador é uma enzima limitante para a regulação da captação de AGL e oxidação mitocondrial no TAM, sendo considerada também como um marcador chave da biogênese mitocondrial, uma vez que a inibição desta enzima prejudica a atividade mitocondrial nos adipócitos marrons (Karise *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017).

1.5 Biogênese Mitocondrial

As mitocôndrias são conhecidas como os geradores de energia das células eucarióticas e desempenham um papel central no metabolismo energético. Sua função primária é produzir energia na forma de ATP através de substratos como carboidratos, lipídeos e proteínas (De Mello *et al.*, 2017). Sendo assim, as vantagens da mitocôndria não estão relacionadas somente à sua contribuição no metabolismo celular, mas também para a regulação das vias de produção de energia (Chodari *et al.*, 2021).

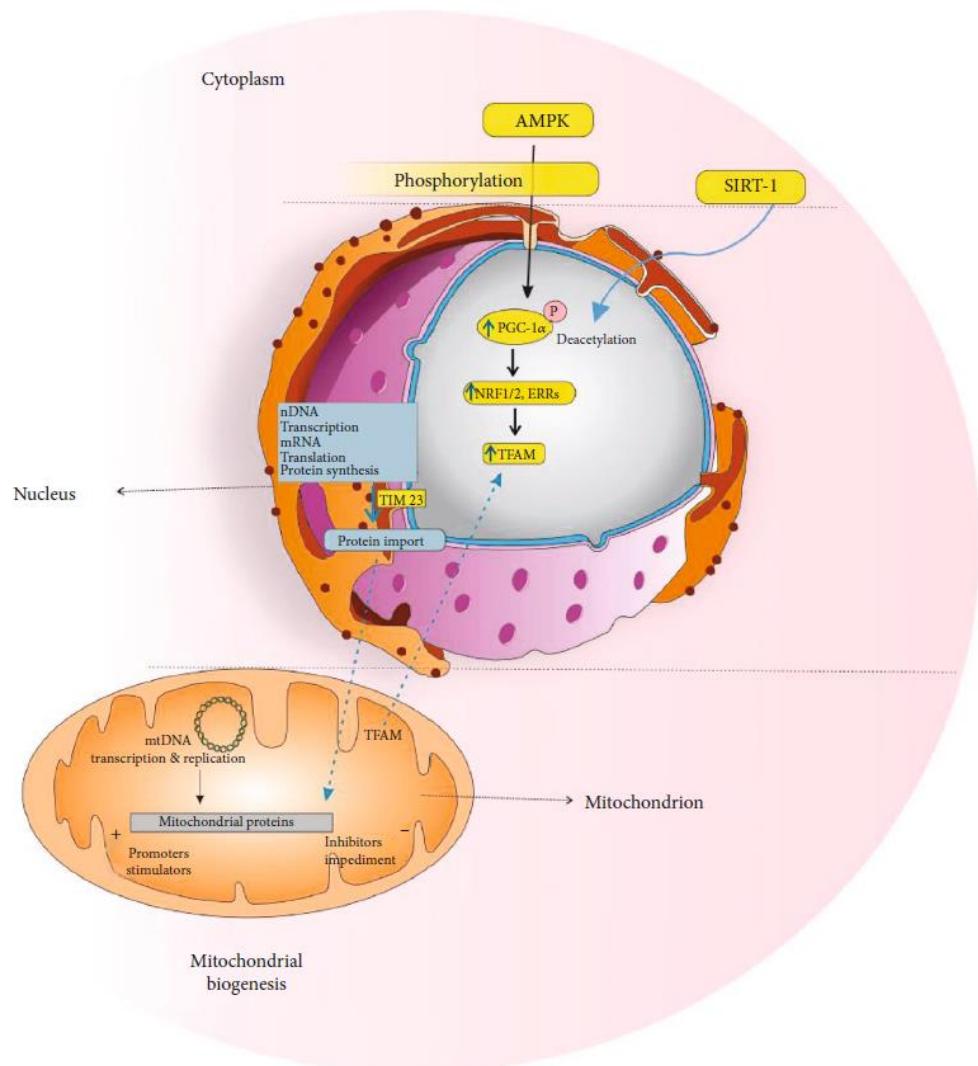
Evidências recentes apontam que as mitocôndrias formam um sistema altamente dinâmico que executa o controle de qualidade da organela e, assim, regula a operação de cascatas de sinalização intracelular, geram espécies reativas de oxigênio (ERO), executam a β -oxidação de ácidos graxos, participam do metabolismo de aminoácidos, regulação do cálcio e sobrevivência celular (Popov, 2020; Wood dos Santos *et al.*, 2018). A homeostase de células saudáveis depende da homeostase de massa e função mitocondrial, a fim de atender às demandas de energia. A homeostase mitocondrial é preservada pela coordenação de dois processos opostos: geração de novas mitocôndrias (biogênese mitocondrial) e remoção de mitocôndrias danificadas (mitofagia) (Popov, 2020).

A biogênese mitocondrial implica uma rota específica que consiste no recrutamento das novas proteínas pelas mitocôndrias pré-existentes, seguido de sua fragmentação via fissão. Associados ao rápido crescimento e proliferação celular, esses eventos garantem a renovação constante da população mitocondrial (Popov, 2020).

De forma geral, a biogênese mitocondrial está ligada à proliferação e divisão de organelas, num processo que é coordenado por cascatas do ciclo celular. Contudo, diferentes

estímulos, como o exercício físico, estresse oxidativo, aumento da demanda energética, alguns hormônios, desenvolvimento fisiológico e certas doenças podem desencadear a biogênese mitocondrial (Chodari *et al.*, 2021).

Figura 4 - Via da Biogênese Mitocondrial



Legenda: Via da biogênese mitocondrial. Abreviaturas: Proteína quinase dependente de AMP, AMPK; Sirtuína 1, SIRT-1; Coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ , PGC-1 α ; Fator respiratório nuclear 1, NRF1; Fator respiratório nuclear 2, NRF2; receptor α relacionado ao estrogênio, ERRs; Fator de transcrição mitocondrial A, TFAM; translocase de pré-sequência da membrana interna, TIM 23; DNA mitocondrial, mtDNA.

Fonte: Van der Vaart, 2021.

Dessa forma, dentre os processos necessários para a biogênese mitocondrial, pode-se destacar a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (mtDNA). Essa via é iniciada pela ativação de PGC-1 α (por fosforilação ou desacetilação), seguida pela estimulação de uma série de fatores de transcrição nuclear: NRF1, NRF2 e do receptor α relacionado ao estrogênio

(ERR- α), que levam à ativação do Fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), o efetor final da transcrição e replicação do mtDNA (Chodari *et al.*, 2021; Popov, 2020).

Conforme observado na Figura 4, o aumento de AMPK no citoplasma leva ao aumento da fosforilação de PGC-1 α e o aumento de SIRT-1 leva à desacetilação do PGC-1 α . Uma vez fosforilado e/ou desacetilado, o PGC-1 α no núcleo vai levar ao aumento da expressão de NRF1 e NRF2, bem como de ERR- α . O aumento de NRF1 vai levar à expressão de TFAM, que irá levar à transcrição e replicação do mtDNA. Além disso, a ação da SIRT-1 inicia a transcrição de genes nucleares e mitocondriais que codificam proteínas mediadas por PGC-1 α , que ocorre durante a proliferação da mitocôndria (Chodari *et al.*, 2021; Popov, 2020).

Em condições fisiológicas a resposta celular à demanda de energia leva à *up* ou *downregulation* dos fatores de transcrição que estimulam ou inibem a biogênese mitocondrial. Dentre os estimuladores, estão apontados na literatura o resveratrol, a acetilcolina e a adiponectina, além de diversos extratos naturais, cujos mecanismos de ação estão relacionados à *upregulation* de PGC-1 α (Popov, 2020).

Em contrapartida, a atividade da via AMPK/PGC-1 α /NRF1 é reduzida por diversos fatores, dentre eles um ambiente com alta concentração de glicose e alta gordura. Desta forma, o comprometimento da biogênese e função mitocondrial têm sido relacionadas a doenças metabólicas, como DM2 e obesidade (Popov, 2020).

1.6 Inflamação e Estresse Oxidativo no Tecido adiposo Marrom

A obesidade é geralmente associada à uma inflamação sistêmica de baixo grau com adipócitos capazes de induzir a sinalização de proteínas que contribuem para esta condição. Os adipócitos e pré-adipócitos marrons contêm uma variedade de células imunes, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Estudos recentes têm demonstrado que o infiltrado de células imunes no TAM e processos inflamatórios estão relacionados à disfunção deste tecido na obesidade e ao desenvolvimento de desordens metabólicas (Omran & Christian, 2020).

A expressão de marcadores inflamatórios é menor no TAM do que no TAB, sugerindo que o TAM é um tecido mais resistente à inflamação quando comparado ao TAB. Entretanto, alterações inflamatórias importantes são evidentes neste tecido após insultos obesogênicos,

como aumento da ingestão calórica. Desta forma, o aumento da inflamação no TAM é apontado com um papel chave no *whitening* que ocorre após o consumo de uma dieta hiperlipídica (Chait & Hartigh, 2020; Omran & Christian, 2020).

Pouco é conhecido sobre as citocinas envolvidas na inflamação do TAM e como isso afeta a sua função e a indução da termogênese. Contudo, existe um aumento de evidências que demonstram que a inflamação altera diretamente a atividade termogênica da gordura marrom, bem como a função mitocondrial (Omran & Christian, 2020).

É demonstrado por Roberts-Toler *et al.* (2016) que a obesidade induzida pela dieta causa resistência à insulina em modelo experimental em camundongos, devido ao aumento na expressão de genes pró-inflamatórios, como MCP-1, TNF- α e IL-6 no TAM.

Em condições fisiológicas, a produção de ERO no TAM não está necessariamente relacionada a consequências negativas, uma vez que o aumento da termogênese está associado a um aumento substancial da atividade mitocondrial e consequente aumento da produção de ERO (Omran & Christian, 2020). Alguns estudos identificam a indução mitocondrial e aumento da produção de ERO no TAM como um mecanismo que conduz a termogênese dependente de UCP-1 e o gasto energético corporal, o que abre o caminho para desenvolver estratégias terapêuticas aprimoradas para combater distúrbios metabólicos (Couchani, 2016).

No entanto, evidências sugerem que a inflamação de baixo grau no TAM contribui para a produção excessiva de ERO e está associada ao estresse oxidativo (Omran & Christian, 2020). Ademais, recentemente tem sido demonstrado que o TAM de camundongos obesos e hiperglicêmicos apresentam elevados níveis de inflamação (por infiltração de macrófagos e de células T do sistema imune), estresse de retículo endoplasmático, dano oxidativo e aumento da atividade de respiração mitocondrial (Alcalá *et al.*, 2019).

As reações inflamatórias induzem a produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, que é caracterizado por um desequilíbrio entre a formação de ERO e os sistemas de defesa antioxidantes (Abbasian *et al.*, 2018; Frigolet *et al.*, 2013; Ferreira & Matsubara, 1997).

As ERO são geradas durante o metabolismo aeróbico do oxigênio. Em condições fisiológicas, pequenas quantidades de ERO, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e peroxinitrito ($ONOO^-$), são neutralizadas pelos sistemas de defesa antioxidantes. Contudo, em condições patológicas, a produção de ERO excede os sistemas de defesas antioxidantes, levando ao estado de estresse oxidativo (Zhou *et al.*, 2021).

A produção exacerbada de ERO pode levar a danos de macromoléculas celulares, assim como também pode levar a uma desregulação da secreção de adipocinas, contribuindo

para a produção de citocinas pró-inflamatórias e redução de moléculas anti-inflamatórias na obesidade (Zhou *et al.*, 2021; Hatia *et al.*, 2014). Portanto, as reações inflamatórias e o aumento da produção de ERO estão positivamente relacionados e, desta forma, o aumento da inflamação, assim como o aumento da produção de ERO contribui para o desenvolvimento da RI e hipertensão, aumentando as disfunções metabólicas associadas à obesidade através da regulação positiva da inflamação (Frigolet *et al.*, 2013).

A exposição ao frio tem demonstrado aumento da atividade de enzimas antioxidantes importantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase em TAM de ratos, sugerindo aumento do estresse oxidativo durante a termogênese. Por outro lado, outros estudos demonstram que elevados níveis de ROS aumentam o gasto energético e protegem o corpo contra a obesidade induzida pela dieta junto ao aumento da respiração mitocondrial no TAM. Esses dados sugerem um papel importante dos altos níveis de ROS na regulação da termogênese no adipócito marrom (Shinde *et al.*, 2021).

1.7 Modelo Experimental de Obesidade Induzida por Dieta

Para o estudo da obesidade, diferentes modelos experimentais têm sido amplamente utilizados. Dentre esses, se destacam os modelos que utilizam uma variedade de dietas comerciais com variação de 30% a 78% de gordura na ingestão total de energia para a indução da obesidade (Bastías-Pérez *et al.*, 2020).

Muitos dos aspectos da obesidade podem ser induzidos em modelos experimentais em que os animais apresentam elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de alterações metabólicas e, embora a maioria dos roedores tendam a se tornar obesos com a ingestão de dieta hiperlipídica, pode haver variabilidade no ganho de peso corporal, tolerância à glicose, resistência à insulina, conteúdo de lipídios no sangue e outros parâmetros dependentes da cepa escolhida (Bastías-Pérez *et al.*, 2020).

Os animais da linhagem C57Bl/6 (Figura 6) são camundongos isogênicos ou *inbred strain*, ou seja, são produtos de mais de 20 gerações de cruzamento entre irmãos ou pais e filhos, a partir de casais monogâmicos permanentes, resultando num índice de 99% de homozigose e permitindo a criação de populações estáveis e geneticamente homogêneas (Andrade *et al.*, 2002).

Figura 5 - Camundongo C57Bl/6



Legenda: Foto ilustrativa do camundongo da linhagem C57Bl/6.

Fonte: <https://www.jax.org/~media/JaxWeb/images/jax-mice-and-services/mice/datasheets/003548>.

Segundo a página do Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz, C57BL/6 é a linhagem *inbred* mais utilizada, pois apresenta um *background* genético permissivo para a expressão de diversas mutações. Essa linhagem é bastante utilizada no desenvolvimento de estudos de biologia cardiovascular, obesidade e diabetes, além de outras condições patológicas. Os animais C57Bl/6 apresentam uma alta susceptibilidade ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta, bem como tolerância à glicose, hiperglicemia moderada, hiperinsulinemia e desordens no metabolismo de lipídeos, sendo a linhagem de escolha para maioria dos estudos relacionados à Síndrome Metabólica (ICTB, 2020; Fontane & Davis, 2016). Desta forma, a oferta de uma dieta rica em lipídeos a estes animais é feita para acelerar o desenvolvimento das alterações metabólicas associadas à obesidade. (Gallou-Kabani *et al.*, 2007).

Estudos apontam que características fenotípicas e metabólicas desses animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam uma importância fundamental desse modelo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na obesidade (Gallou-Kabani & Junien, 2005).

1.8 Extrato Hidroalcoólico do Caroço do Açaí (ASE)

A planta *Euterpe oleracea* Mart., também conhecida popularmente por açaizeiro (Figura 6), é uma palmácea da família Aracaceae, amplamente encontrada na região

amazônica, em estados como o Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá (Rocha *et al.*, 2007).

Figura 6 - *Euterpe oleracea* Mart.



Legenda: Foto da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro) e o fruto açáí.

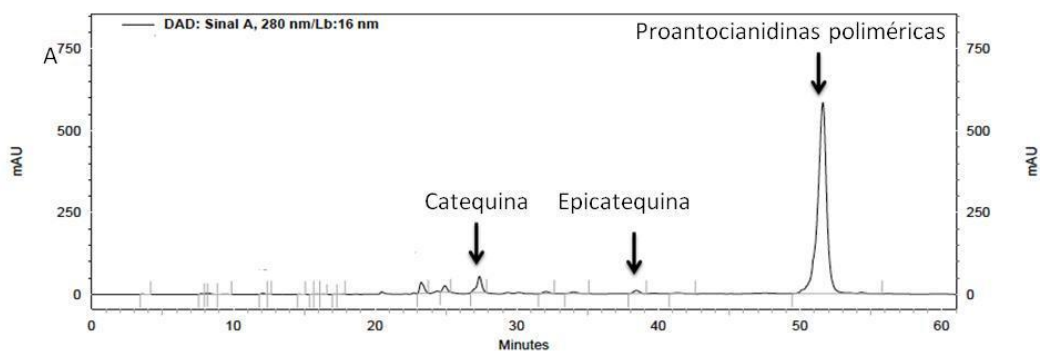
Fonte: <http://www.acaiforte.com.br/curiosidades-sobre-o-acai>.

O açáí é um fruto bacáceo com grande importância cultural, social e econômica. O fruto de cor roxa pesa cerca de 2 g e é composto por aproximadamente 17% de polpa e casca, e 83% de caroço (de Souza *et al.*, 2012). A polpa e a casca são aproveitadas para a fabricação dos mais diversos tipos de bebidas e alimentos, além de ter aplicação nas indústrias farmacêuticas e na produção de cosméticos, que são amplamente consumidos, não só no Brasil, como também nos Estados Unidos, na Europa, no Japão e na China. O caroço, por sua vez, é comumente descartado. (Yamaguchi *et al.*, 2015). Relatos populares, principalmente entre pessoas da região norte e nordeste, indicam os efeitos benéficos do suco de açáí, sendo utilizado em casos de febre, dor e gripe (Matheus *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, devido ao alto consumo e seu significativo conteúdo de polifenóis, o açáí passou a ser objeto de estudo de diversas pesquisas científicas voltadas principalmente para sua composição química e efeito antioxidante (de Moura & Resende, 2016). O expressivo conteúdo polifenólico faz com que o açáí seja associado a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-proliferativas e cardioprotetoras, especialmente em estudos *in vitro* (Heinrich *et al.*, 2011).

Análises químicas da polpa do açaí mostram uma composição rica em flavonóides, como epicatequina, catequina e proantocianidinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo) (Gallori *et al.*, 2004). Estudos pioneiros do nosso grupo mostram que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) é composto majoritariamente por proantocianidinas poliméricas e oligoméricas, catequinas e epicatequinas (Figura 7) (de Oliveira *et al.*, 2015), totalizando um conteúdo de polifenóis mais expressivo do que a polpa (Rocha *et al.*, 2007).

Figura 7 - Análise por HPLC do ASE



Legenda: Os picos marcados a 27, 38 e 51 minutos correspondem a catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas, respectivamente, como confirmado por injeção de padrões e por comparação do espectro de absorção no ultravioleta. Mais evidências sobre a estrutura dos compostos presentes no ASE foram fornecidos por espectrofotometria de massa positivo modo de electropray.

Fonte: De Oliveira *et al.*, 2015.

Anteriormente, nosso grupo comparou o efeito vasodilatador do extrato aquoso da polpa e dos extratos hidroalcoólicos da polpa e do caroço do açaí em leito vascular mesentérico de ratos, onde foi possível observar uma resposta vasodilatadora mais potente com o ASE (Rocha *et al.*, 2007).

Previamente, estudos do nosso grupo demonstraram que o ASE promove um importante efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha *et al.*, 2007), que deve contribuir para seu efeito anti-hipertensivo, observado em modelos experimentais de hipertensão espontânea e renovascular (Cordeiro *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2008). O ASE apresenta ainda, efeito antioxidante e promove uma significativa melhora da RI em animais diabéticos (de Bem *et al.*, 2018), da estrutura e função renal em animais hipertensos diabéticos (Cordeiro *et al.*, 2018), e ação anti-inflamatória em modelo experimental de enfisema pulmonar (de Moura *et al.*, 2011). Uma prevenção do ganho de peso, do excesso de gordura abdominal, dos níveis glicêmicos elevados, da RI e da esteatose

hepática foi também observada em camundongos C57BL/6 que consumiram dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) (de Oliveira *et al.*, 2015 e 2010). Os polifenóis presentes no extrato devem contribuir para este efeito benéfico, aos quais tem sido atribuído um importante efeito redutor de triglicerídios, colesterol e glicose (Santos *et al.*, 2020; Romão *et al.*, 2019; de Oliveira *et al.*, 2015 e 2010).

Além dos efeitos já descritos, recentemente foi demonstrado o efeito anti-adipogênico do tratamento com ASE em modelo experimental *in vitro* com pré-adipócitos murinos 3T3-L1. O ASE é, ainda, capaz de prevenir a hipertrofia de adipócitos de TAB em animais submetidos à dieta hiperlipídica (Santos *et al.*, 2020; Trindade *et al.*, 2019). Todos esses achados propõem um potencial uso terapêutico do ASE na obesidade.

A ativação da termogênese no TAM pode contribuir para o gasto energético (Zhang *et al.*, 2019), o que é crítico para o tratamento da obesidade e DM2. Considerando que as propriedades metabólicas benéficas do TAM podem representar um importante alvo para o tratamento da obesidade e suas doenças metabólicas relacionadas (Zhang *et al.*, 2019), e as evidências recentes de que compostos naturais podem estimular a termogênese no TAM, foi desenvolvida a hipótese de que o ASE possa ativar a termogênese no TAM de animais submetidos à dieta hiperlipídica, constituindo um possível alvo de sua ação metabólica benéfica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar os efeitos do tratamento com ASE sobre o remodelamento do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57Bl/6 submetidos à dieta hiperlipídica e o papel deste extrato na indução da termogênese e na biogênese mitocondrial no TAM.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o tratamento preventivo com ASE em animais submetidos à dieta hiperlipídica modifica:

- a) O peso corporal, ingestão de ração, ganho de peso corporal e massa adiposa do TAM;
- b) Os perfis glicídico e lipídico;
- c) Morfologia do TAB e TAM;
- d) Expressão de marcadores relacionados à proliferação e diferenciação de adipócitos marrons;
- e) Expressão de marcadores relacionados à termogênese, biogênese mitocondrial e à utilização de ácidos graxos no TAM;
- f) O estado inflamatório e o estresse oxidativo no TAM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e modelo experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – IBRAG/UERJ (nº 004/2021).

Foram utilizados 60 camundongos machos C57BL/6 com cerca 30 dias de vida. Os animais foram obtidos do Biotério central da UNICAMP e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia (DFP/IBRAG/UERJ), em temperatura média de 21° C, umidade controlada e com ciclo de claro-escuro de 12 horas, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=20), recebendo os seguintes tratamentos:

- a) Controle: animais com livre acesso a água e alimentados com dieta padrão AIN-93M (14% de proteínas, 10% da energia proveniente de lipídeos e 76% de carboidratos: energia total 15,9 Kj/g);
- b) HF: animais com livre acesso a água e alimentados durante 12 semanas com dieta hiperlipídica (14% de proteínas, 60% da energia proveniente de lipídeos e 26% de carboidratos: energia total 22,6 Kj/g);
- c) HF + ASE: animais com livre acesso a água, alimentados durante 12 semanas com dieta hiperlipídica (14% de proteínas, 60% da energia proveniente de lipídeos e 26% de carboidratos: energia total 22,6 Kj/g) e tratados com ASE (300 mg/ kg/dia).

O tratamento com o ASE foi concomitante à ingestão da dieta hiperlipídica (12 semanas) e foi administrado por gavagem intragástrica na quantidade descrita acima. Os animais dos grupos controle e HF foram gavados com água para submeter ao mesmo estresse induzido pela gavagem com o tratamento. As dietas foram balanceadas pela Rosther (São Paulo, SP) (Quadro 1). Durante todo o período experimental os camundongos tiveram ração e água *ad libitum*.

Quadro 1 - Composição das dietas

Nutrientes (U/Kg dieta)	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Caseína (g)	148	190
Amido de milho (g)	620,7	250,7
Sacarose (g)	100	100
Óleo de soja (g)	40	40
Banha (g)	-	320
Fibras (g)	50	50
Mistura de minerais (g)	35	35
Mistura de vitaminas (g)	10	10
L-cisteína (g)	1,8	1,8
Colina (g)	2,5	2,5
Energia (kcal)	3.800	5.400
Carboidratos (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídeos (%)	10	60

Legenda: Composição das dietas padrão e Hiperlipídica ofertadas aos animais durante o protocolo experimental.

Nota: Vitaminas e minerais seguem o padrão AIN-93M recomendado para roedores.

Fonte: A autora, 2022 (com informações fornecidas pela Rhoster).

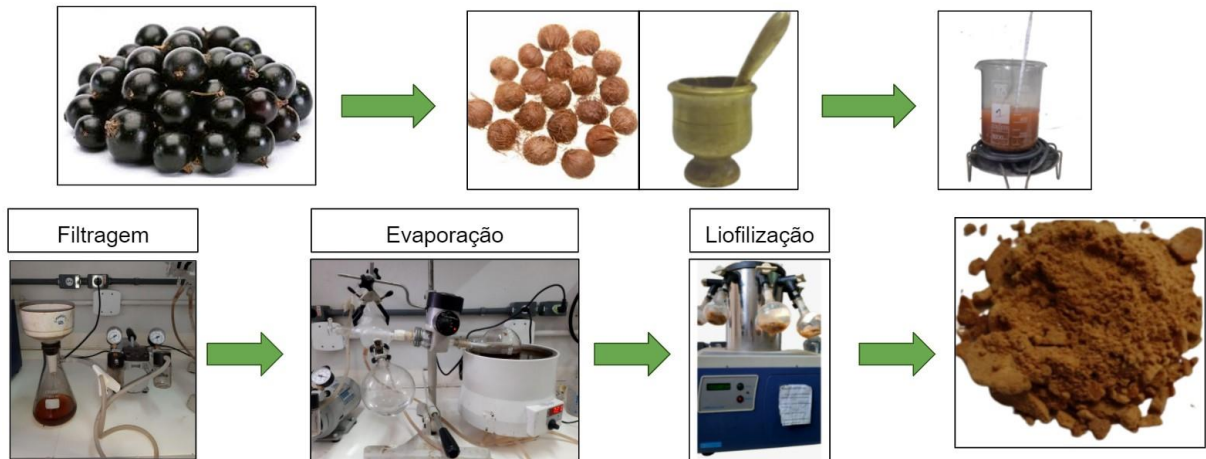
3.2 Preparo ASE

Foram utilizados frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açai), oriundos de Belém, fornecidos pelo Professor Dr. Pergentino José Cunha da Silva, colaborador do nosso grupo e docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para a obtenção do extrato, aproximadamente 200 g do fruto foram pesados, lavados e os caroços foram separados, triturados com grau e pistilo, imersos em 400 mL de água destilada e fervidos por cinco minutos. Após a fervura foi realizado o resfriamento natural e foram adicionados 400 mL de etanol. O extrato foi, então, guardado em vidro âmbar na geladeira e agitado diariamente por cerca de 2 a 4 horas durante 10 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado com kitassato, funil de büchner e papel filtro a baixa pressão, posteriormente foi submetido à evaporação do etanol em baixa pressão na temperatura de

70°C. O resíduo foi liofilizado a baixa pressão e temperatura (Figura 8) e mantido a -20°C até o uso (Rocha *et al.*, 2007).

Figura 8 - Preparo do ASE



Legenda: Ilustração de resumo do preparo do ASE.
Fonte: A autora, 2022.

A concentração total de polifenóis no ASE foi medida através do Método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) e o extrato utilizado apresentou aproximadamente 400 mg/g de polifenóis.

Para o tratamento, o extrato foi pesado de acordo com o peso corporal dos animais e diluído em água destilada na concentração de 30 mg/ mL para administração de volume adequado para a dose de 300 mg/kg de peso do animal.

3.3 Ingestão alimentar, ingestão de energia, massa corporal e ganho de peso corporal

O controle da ingestão alimentar foi realizado através da relação entre a oferta e a sobra de ração, dividida pelo número de animais na caixa, sendo esse remanescente descartado devido ao alto conteúdo de gordura da dieta HF, suscetível à rancificação. A dieta padrão foi ofertada uma vez por semana e a dieta hiperlipídica foi ofertada diariamente.

O controle da ingestão de energia foi obtido através da multiplicação da quantidade de ração consumida (em gramas) pela quantidade de energia oferecida por grama (controle = 15,9 Kj/g; HF e HF+ASE = 22,6 Kj/g).

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital. A média da massa corporal de todos os grupos foi calculada e traçado o gráfico de evolução durante todo o período de protocolo experimental.

O ganho de peso corporal foi determinado a partir do seguinte cálculo: massa corporal final subtraída da massa corporal inicial.

3.4 **Glicemia**

O nível de glicose sérica foi mensurado quinzenalmente após um período de 6 horas de jejum, com amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do camundongo e a leitura sendo realizada com o auxílio de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche®), baseado na reação glicose-glicose oxidase. Os valores foram expressos em mg/dL.

3.5 **Eutanásia**

Ao término do período de tratamento (12 semanas), os camundongos foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) por via intraperitoneal, para a coleta de sangue arterial através da punção cardíaca, e em seguida submetidos a laparotomia para a coleta dos tecidos adiposos.

Os depósitos de tecido adiposo branco (subcutâneo inguinal, epididimário e retroperitoneal) foram dissecados para o cálculo do índice de adiposidade (razão entre a soma de todos os depósitos de gordura pela massa corporal total dos animais).

O tecido adiposo branco retroperitoneal (TAB) foi armazenado em formalina para análise histológica. O TAM foi retirado da região interescapular dos camundongos e armazenado para futuras análises (uma parte foi fixada em formalina para as análises histológicas e de imuno-histoquímica, e outra parte foi congelada a -80 °C para os demais ensaios).

3.6 **Perfil Lipídico**

Os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinados através de kits comerciais (Analisa®, Brasil), que se baseiam em

métodos não-enzimáticos colorimétricos. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

A análise dos níveis da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), bem como a análise dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram realizadas conforme os cálculos no Quadro 2:

Quadro 2 - Cálculo de VLDL e HDL

VLDL	$\text{VLDL} = \frac{\text{Triglicerídeo sérico}}{5}$
LDL	$\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$

Legenda: Fórmulas para cálculo de VLDL e LDL.

Fonte: V Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose, 2013.

3.7 Expressão de Proteínas por Western Blotting

Para a determinação da expressão de proteínas, 240 mg do TAM foram pesados e homogeneizados no ultra-turrax (IKA® T25 digital) por cerca de 1 minuto e em seguida sonicados por 1 minuto (10 segundos on e 15 segundos off) em 2 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados três vezes (13000 rpm, 4°C por 25 min). Ao final, o sobrenadante foi armazenado em um novo eppendorf, e mantido a -80°C até a sua utilização.

A concentração protéica foi quantificada através do ensaio colorimétrico do kit BCA Protein Assay (ThermoScientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão da amostra 5x concentrado (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromoferol) e aquecidas a 95°C por cinco minutos em banho seco.

Em seguida, as amostras foram resfriadas e analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 30 µg de proteína em poços no gel de 8, 10, 12 e 15% de poliacrilamida para eletro-

separação, de acordo com o tamanho e a carga da proteína (150 V, 50 mA por cerca de 60 minutos). Posteriormente, as proteínas foram transferidas por eletroforese (15 V, 328 mA por cerca de 60 minutos) para membranas de PVDF (AmershamTM HybondTM), que foram previamente hidratadas em metanol por 120 segundos e lavadas em água destilada.

Quadro 3 - Anticorpos Primários para Western Blotting

ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO	PESO MOLECULAR	CÓDIGO
AMPK	Anti-Goat	63 kDa	SC-19128
AMPK-p	Anti-Rabbit	63 kDa	SC-101631
β1-AR	Anti-Rabbit	50 kDa	CSB-PA000937
β3-AR	Anti-Rabbit	48-63 kDa	BS-10921R
ATGL	Anti-Rabbit	56/20 kDa	CSB-PA836180LAO1HU
BMP7	Anti-Rabbit	55 kDa	CSB-PA001027
CPT-1	Anti-Mouse	86/90-94 kDa	SC-393070
HSL	Anti-Rabbit	72-95 kDa	CSB-PA009841
LKB1-p	Anti-Rabbit	52 kDa	SC-28465
LPL	Anti-Mouse	56 kDa	SC-58780
NRF1	Anti-Rabbit	54 kDa	CSB-PA020156
PGC1-α	Anti-Rabbit	90 kDa	SC-13067
PLIN-1	Anti-Rabbit	60 kDa	CSB-PA937313
PPARα	Anti-Rabbit	55 kDa	SC-9000
PPARγ	Anti-Mouse	54/57 kDa	SC-PA953053
PRDM16	Anti-Rabbit	130 kDa	BOST-A00782
SIRT-1	Anti-Rabbit	120 kDa	SC-15404
UCP-1	Anti-Rabbit	33 kDa	CSB-PA05554ESR2HU
β-actina	Anti-Mouse	43 kDa	SC-9104

Legenda: Anticorpos primários utilizados para marcação das membranas no experimento de Western Blotting.
Fonte: A Autora, 2022.

Após a transferência, as membranas foram incubadas por cerca de 1 hora em T-TBS acrescido de albumina a 5% para inibir as ligações inespecíficas do anticorpo. Posteriormente, as membranas foram encubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (overnight, a 5°C) na concentração de 1:500 ou 1:1000 em TBS-T. O anticorpo constitutivo utilizado foi a β-actina na concentração de 1:1000. Foram utilizados anticorpos primários das marcas Santa Cruz Biotechnology, Cusabio, Booster e Abcam, conforme indicado no quadro 3.

Posterior ao período de incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos e incubadas por cerca de 1 hora com anticorpo secundário na concentração de 1:5000 a 25°C sob agitação constante. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente em T-TBS e incubadas com streptavidina na concentração de 1:5000 por cerca de 1 hora. Todos os anticorpos secundários utilizados foram da marca Santa Cruz Biotechnology.

As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimioluminescência (ECL-plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) com incubação de 5 minutos, e as bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Adobe Photoshop Elements 11, versão 11.0 (Adobe Systems Incorporated).

Foi utilizado como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare – EUA).

3.8 Determinação do Estresse Oxidativo

3.8.1 Homogenato e Dosagem de Proteínas

O homogenato de TAM para as análises de dano oxidativo e atividade enzimática antioxidante foi preparado pela adição de Tampão Fosfato (KPE) no volume de 10 vezes o peso do tecido e, em seguida, foi homogeneizado no ultra-turrax (IKA® T25 digital) por cerca de 1 minuto.

Posteriormente, o homogenato foi centrifugado 3 vezes a 4000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi armazenado em um novo eppendorf, e mantido a -80°C até a sua utilização.

A concentração protéica foi quantificada através do método de Bradford utilizando albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976), que tem como base o Comassie brilliant Blue G 250. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 570 nm.

3.8.2 Determinação do Dano Oxidativo

3.8.2.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para a determinação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído ou MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas em sistemas de membranas e microsomas. O MDA reage com o TBA gerando um produto colorido lido por espectrofotometria.

Para este ensaio foi seguida a padronização descrita por Draper & Hadley (1990). Foram, então, utilizados 200 µl do homogenato de TAM para 400 µl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1000 RPM à 4 °C. Foram separados 500 µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionaram-se 500 µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco à 100 °C por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm.

3.8.2.2 Carbonilação de Proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas, se baseando no ataque dos radicais livres aos resíduos de proteínas para gerar produtos com o grupamento carbonil, que pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNTP).

Para este ensaio foi utilizada técnica descrita por Levine *et al.* (1990). Foram utilizados 200 µl do homogenato de TAM. As amostras foram submetidas a lavagens com solução de HCl-Acetona, TCA 10%, HCl 2M, DNPT, TCA 20%, TCA 30%, etanol-acetato de etila e guanidina. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 RPM e o sobrenadante foi descartado. O conteúdo de carbonil foi determinado por

espectrofotometria a partir do sobrenadante da amostra em guanidina no comprimento de onda de 370 nm.

3.8.3 Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes

3.8.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi estimada pela inibição da auto-oxidação da noradrenalina medida por espectrofotometria (480 nm).

A atividade enzimática da SOD foi determinada pela técnica descrita por Bannister & Calabrese (1987) para plasma e adaptada para o TAM. A atividade dessa enzima é determinada pela inibição da auto-oxidação da noradrenalina (NA) e a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 480 nm. A NA é oxidada pelo radical superóxido para formar o adrenocromo.

Foram utilizados 3, 5 e 7 µL de homogenato de TAM em cubetas separadas, e em cada uma foram adicionados 20 µL de catalase (0,0024 g/mL de água destilada) + 970 µL de tampão glicina (0,75 g em 200 mL de água destilada – 32 °C) + 40 µL de noradrenalina (95 mg em 5 mL de água destilada + 15 µL/mL de HCl).

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do Excel. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

3.8.3.2 Atividade da Catalase

A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela reação durante 2 minutos, em protocolo adaptado de Aebi, 1984. Para realização do ensaio, 20 µL de homogenato de TAM foram pipetados em cubetas de quartzo juntamente com 2 mL de soro fisiológico e 2 % de H₂O₂. Após a incubação, a leitura foi realizada a 240 nm em leitor de ELISA.

3.8.3.3 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada pela absorbância das amostras no comprimento de onda de 340 nm. Para este ensaio, 200 µL do homogenato de TAM foram incubados em cubeta contendo 1800 µL de tampão fosfato, glutathiona reduzida (GSH) (2 mM), glutathiona redutase (GR) (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) por dez minutos. Após este tempo, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e as amostras foram incubadas por mais três minutos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e a leitura foi realizada por cinco minutos. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984) e adaptada para o TAM.

3.9 **Análise Morfológica**

Para a análise da morfologia, foram retirados o TAB retroperitoneal e o TAM dos animais e os tecidos foram fixados em formalina de Millonig. Após o processamento adequado, os tecidos foram incluídos em Paraplastplus® (Sigma-AldrichCo, St. Louis, USA) para a secção de cortes de 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e dez imagens de cada lâmina foram realizadas em câmera Olympus DP71 e com microscópio de fluorescência Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japão).

3.10 **Imunohistoquímica**

Secções de 5 µm de TAM previamente emblocadas em paraplast, conforme metodologia descrita no item anterior foram desparafinizadas, reidratadas e incubadas por 10 minutos com 0,3% de H₂O₂ para bloquear a peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com tripsina (3%) diluída em água destilada por 20 minutos a 37 °C ou tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico para 1 L de água destilada, pH=6,0) previamente aquecido a 60

°C. A ligação protéica não específica foi bloqueada por incubação com albumina de soro bovino a 1% diluída em tampão fosfato (PBS) (1,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7,2 g de NaCl, 6,96 g de KH_2PO_4 , pH=7,2) por 25 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário diluído 1:100 em PBS na geladeira (4 °C) overnight em atmosfera úmida.

Quadro 4 - Anticorpos Primários para Imunohistoquímica

ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO	CÓGIGO
8-isoprostano	Anti-Goat	IS20.090709
IL-6	Anti-Goat	SC-1265
MCP-1	Anti-Goat	SC-1785
TNF-α	Anti-Mouse	SC-52746
UCP-1	Anti-Rabbit	CSB-PA05554ESR2HU

Legenda: Anticorpos primários utilizados para marcação das lâminas com cortes histológicos de tecido adiposo marrom para imunohistoquímica.

Fonte: A Autora, 2022.

As seguintes proteínas foram identificadas por este procedimento: anticorpo anti-8-isoprostano, UCP-1, IL-6, TNF- α e MCP-1 (Quadro 4). O sinal foi amplificado com um sistema complexo biotina-streptavidina (kit rápido PK-8800 Vectastain Universal; Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido) e as imunorreações positivas foram identificadas após incubação com tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina (K3466, DAB; Universal Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). As secções foram contrastadas com hematoxilina para identificar os núcleos das células e depois as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japão).

As imagens obtidas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ, versão 1.53 (National Institutes of Health, MD EUA).

3.11 Análise Estatística

Para a análise dos resultados e obtenção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, CA EUA). As análises dos gráficos de barra foram realizadas utilizando-se o teste one-way analysis of variance (ANOVA) com pós teste de

Tukey, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$ e os gráficos de linha foram analisados pelo teste Two-way analysis of variance (ANOVA), com pós teste de Tukey, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média

4 RESULTADOS

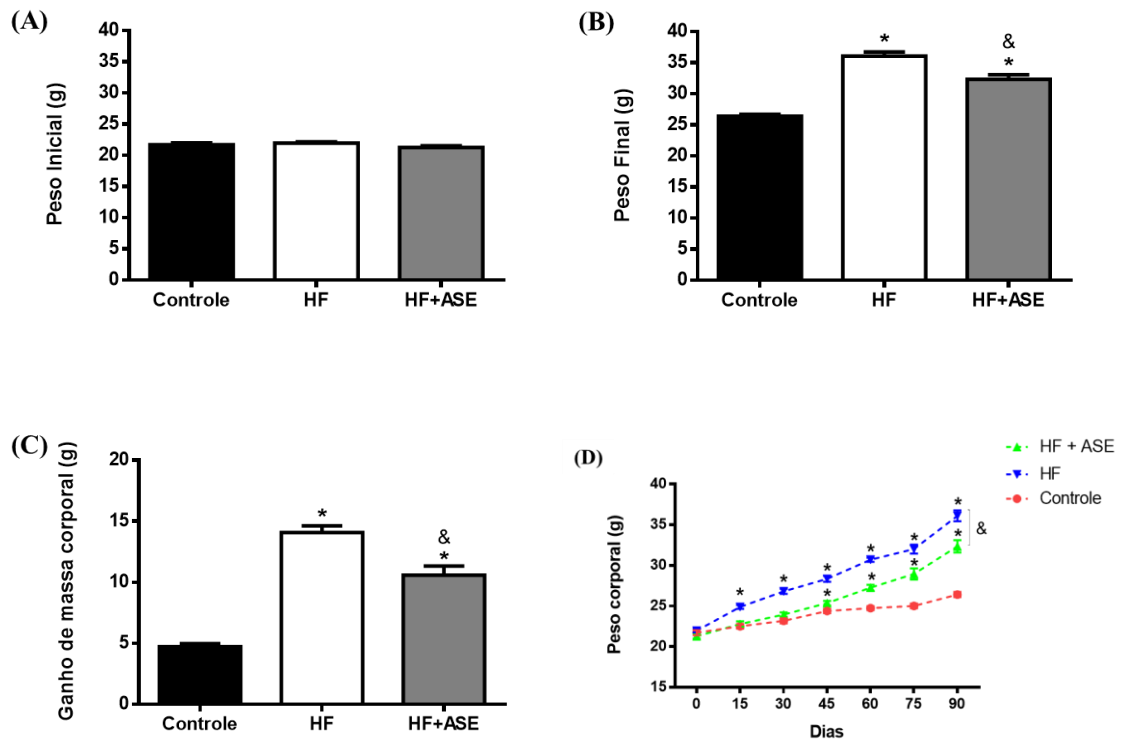
4.1 Efeito do tratamento com ASE no peso corporal e ganho de massa corporal

Os animais dos três grupos experimentais apresentaram o mesmo peso ao início do tratamento (Figura 9 A). Ao final das 12 semanas, o grupo HF demonstrou um aumento significativo de peso (36,7%) ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, enquanto o tratamento com ASE se mostrou eficaz em reduzir (10,4%) esse aumento em relação ao grupo HF, apesar de se mostrar significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 9 B).

O grupo HF demonstrou um ganho significativo (198,4%) ($p < 0,05$) de massa corporal (Figura 9 C) em relação ao grupo controle, enquanto o tratamento com ASE (HF+ASE) reduziu o ganho de massa (24,8%) ($p < 0,05$) nos animais tratados com o extrato.

Na análise de evolução do peso corporal, os animais do grupo HF apresentaram um ganho significativo ($p < 0,05$) de peso corporal (Figura 9 D) em relação do grupo controle em todas as semanas de tratamento. Já o grupo HF+ASE demonstrou uma prevenção do ganho de peso corporal em relação ao grupo HF em todas as semanas de tratamento, e demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) de peso corporal em relação ao grupo controle a partir dos 45 dias de tratamento.

Figura 9 - Efeitos do tratamento com ASE sobre o peso e ganho de massa corporal



Legenda: Gráfico demonstrado o peso inicial dos animais (A), bem como o efeito do tratamento com ASE sobre o peso final (B), o ganho de massa corporal (C) e a evolução do peso corporal (D) camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=20$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p<0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

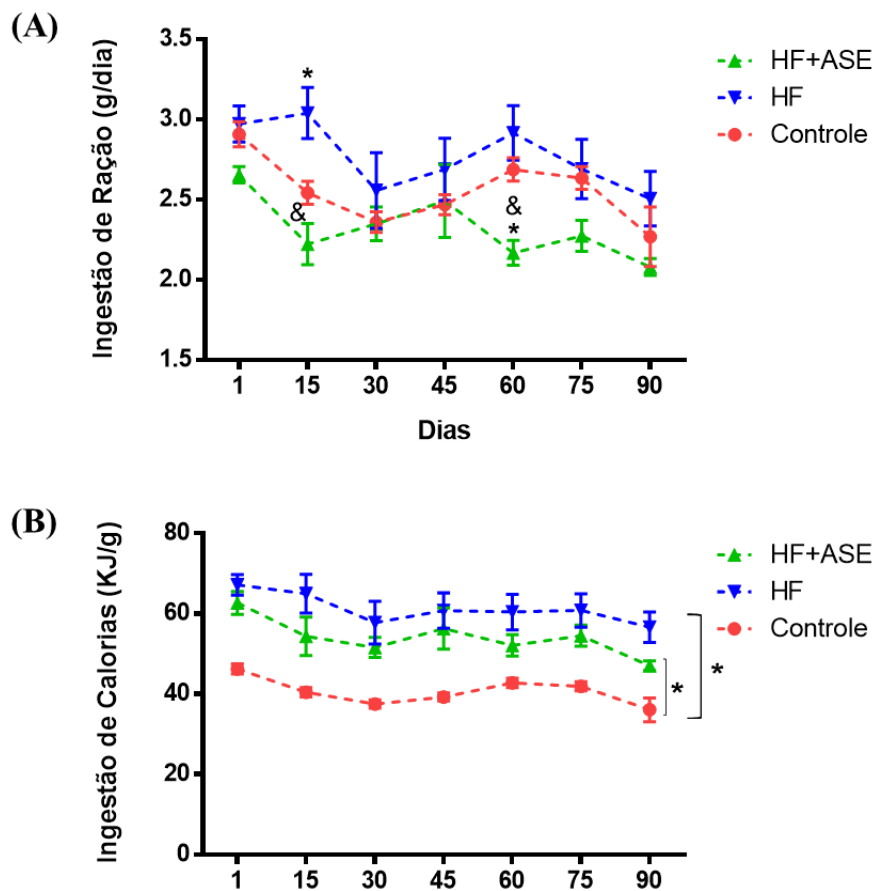
Fonte: A autora, 2022.

4.2 Efeito do tratamento com ASE sobre a ingestão de ração e energia

O grupo HF demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) da ingestão de ração (Figura 10 A) em relação do grupo controle, apenas no 15º dia. O grupo tratado com ASE apresentou uma redução significativa na ingestão de ração em relação ao grupo HF no dia 15 e em relação aos grupos controle e HF no dia 60.

Em relação à ingestão energética (Figura 10 B), os grupos HF e HF+ASE apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle durante todo o período de tratamento.

Figura 10 - Efeito do tratamento com ASE sobre a ingestão de ração e energia



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a ingestão de ração (A) e a ingestão energética (B).

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=20$. As diferenças foram indicadas com símbolo

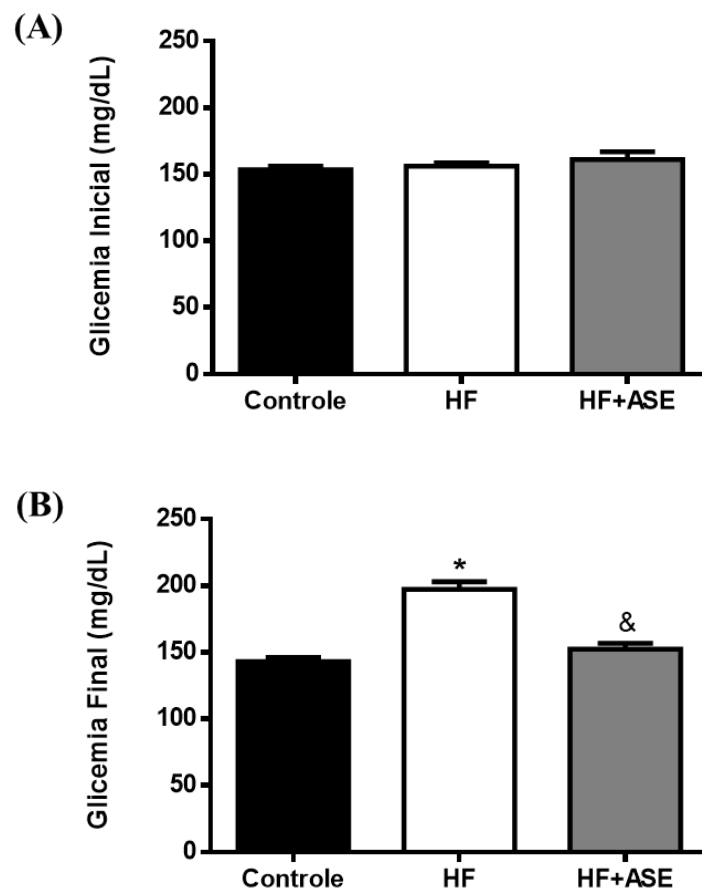
* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

4.3 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis glicêmicos

Os três grupos experimentais apresentaram a mesma glicemia inicial (Figura 11 A). O grupo HF demonstrou, ao final do tratamento, um aumento significativo ($p < 0,05$) da glicemia (Figura 11 B), enquanto o ASE (HF+ASE) preveniu esse aumento em relação ao grupo HF.

Figura 11 - Efeito do tratamento com ASE sobre os índices glicêmicos



Legenda: Gráfico demonstrado a glicemia inicial dos animais (A), bem como o efeito do tratamento com ASE sobre a glicemia final (B) camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=20$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

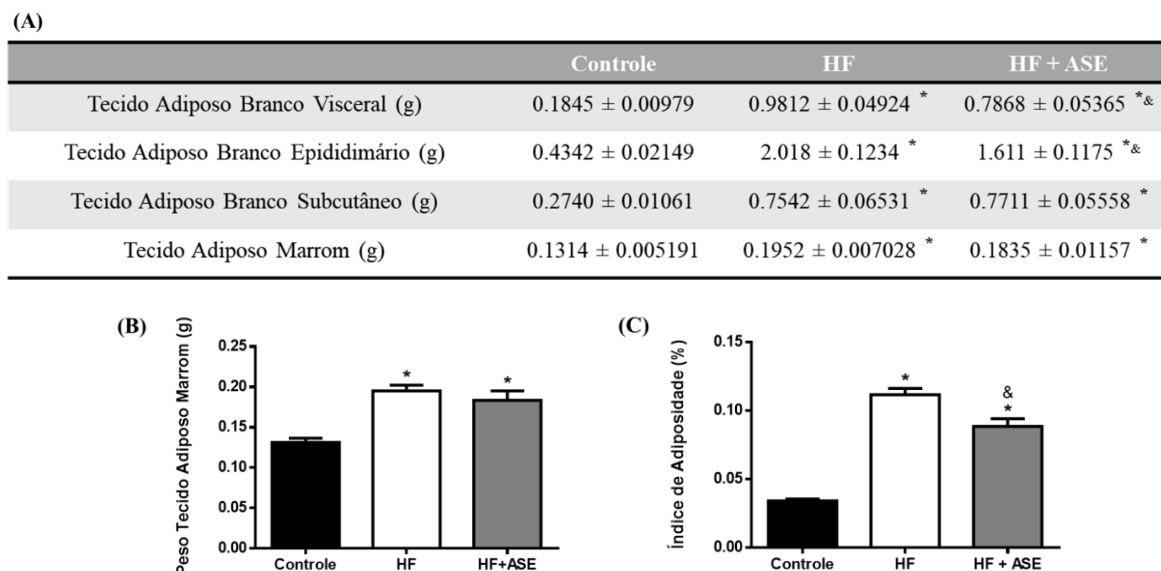
4.4 Efeito do tratamento com ASE sobre o peso do tecido adiposo e o índice de adiposidade

Todos os depósitos de tecido adiposo branco intra-abdominal do grupo HF foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 12 A). O tratamento com ASE reduziu a expansão do tecido adiposo branco visceral e epididimário, mas não do subcutâneo nesses animais.

O tecido adiposo marrom (Figura 12 A e B) teve um aumento significativo de tamanho ($p < 0,05$) nos grupos HF e HF+ASE em relação ao grupo controle e o tratamento com ASE não preveniu o aumento desse tecido.

Os animais do grupo HF apresentaram um índice de adiposidade (Figura 12 C) significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE (HF+ASE) reduziu ($p < 0,05$) o aumento do índice de adiposidade em relação ao grupo HF. Entretanto, esse índice permaneceu maior ($p < 0,05$) do que o grupo controle.

Figura 12 - Efeito do tratamento com ASE sobre o peso do tecido adiposo e o índice de adiposidade



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre o peso dos compartimentos de tecido adiposo (A), peso do tecido adiposo marrom (B) e índice de adiposidade (C) camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro da média, $n=20$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

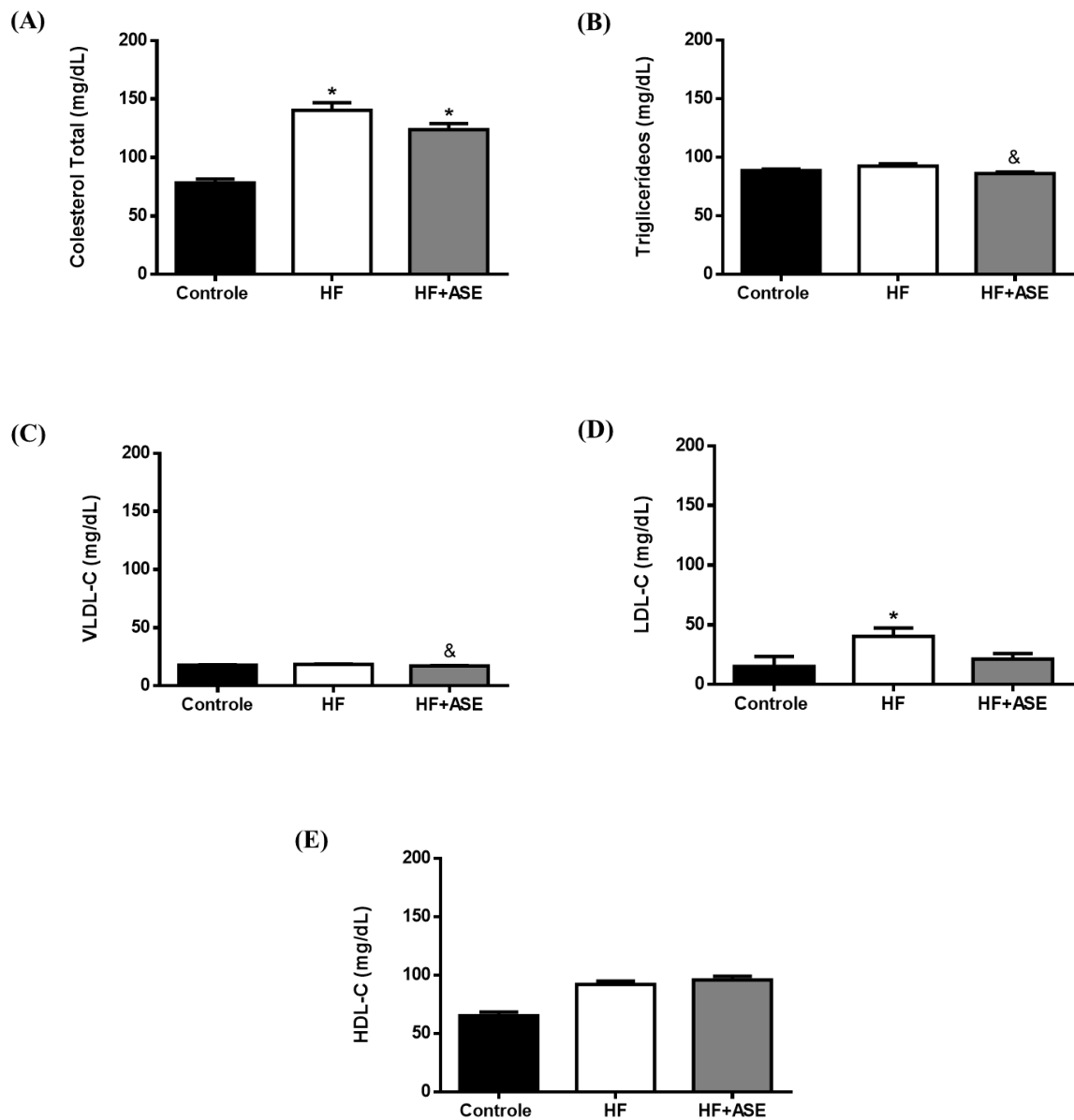
4.5 Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico

O grupo HF demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) de colesterol total (Figura 13 A) em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE (HF+ASE) não modificou os níveis de colesterol total em relação ao grupo HF.

Os grupos HF e controle não apresentaram uma diferença significativa dos níveis de triglicerídeos (Figura 13 B) e de VLDL-C (Figura 13 C), contudo esses níveis foram significativamente menores ($p < 0,05$) no grupo HF+ASE em relação ao grupo HF em ambos os marcadores.

O grupo HF apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de LDL-C (Figura 13 D) em relação ao grupo controle e, apesar de uma tendência, o tratamento com ASE não preveniu esse aumento. Em relação do HDL-C (Figura 13 E), não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 13 - Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico plasmático



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre o colesterol total (A), triglicérides (B), colesterol VLDL (C), colesterol LDL (D) e colesterol HDL (E) em plasma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

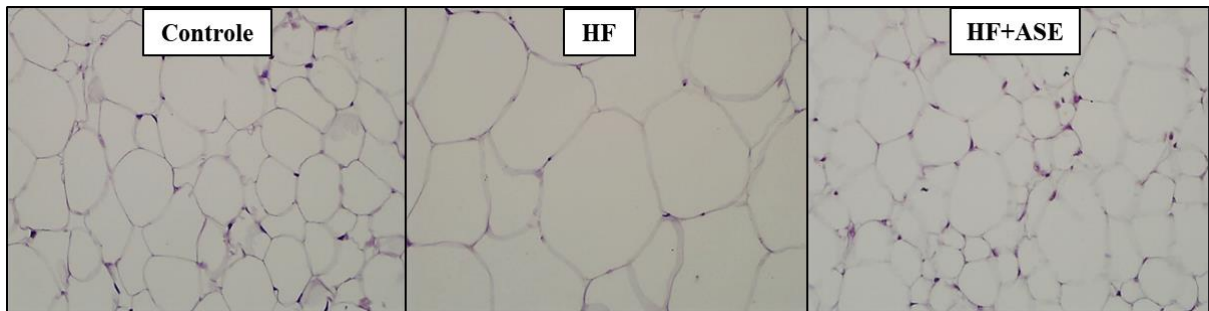
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=20. As diferenças foram indicadas com símbolo * p < 0,05 em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

4.6 Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia do Tecido Adiposo Branco Visceral

Representação qualitativa de cortes de TAB retroperitoneal dos diferentes grupos estudados (Figura 14). Pode-se observar um aumento das gotículas lipídicas no grupo HF em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE preveniu o esse aumento no grupo HF+ASE em relação ao grupo HF, se assemelhando fenotipicamente ao grupo controle.

Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE sobre as alterações morfológicas no Tecido Adiposo Branco



Legenda: Efeito do tratamento com o ASE sobre o remodelamento do tecido adiposo branco de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

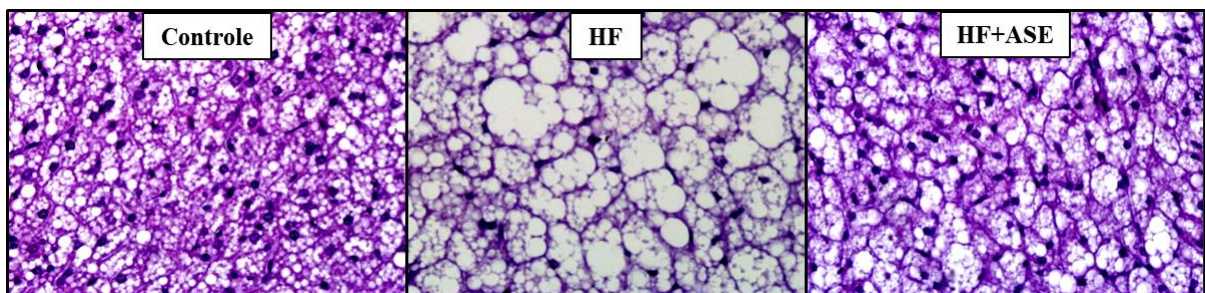
Nota: Foi utilizado n=5. As imagens foram feitas em aumento de 40x e barra de calibração = 50µm

Fonte: A autora, 2022.

4.7 Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia do Tecido Adiposo Marrom

Representação qualitativa de cortes de tecido adiposo marrom dos diferentes grupos estudados (Figura 15). Foi observado que o grupo controle apresenta células multiloculares características dos adipócitos marrons. O grupo HF apresenta infiltração lipídica com aumento de gotículas de gordura e diminuição da quantidade de núcleos, além do afastamento entre os núcleos dos adipócitos em relação ao grupo controle, correspondendo a um fenótipo semelhante ao observado nos adipócitos do TAB, indicando que houve *whitening* nesse tecido. Contudo, o tratamento com ASE se mostrou eficaz em prevenir o aumento das gotículas lipídicas neste tecido, apresentando uma estrutura multilocular do adipócito marrom semelhante ao grupo controle.

Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE sobre as alterações morfológicas do Tecido Adiposo Marrom



Legenda: Efeito do tratamento com o ASE sobre o remodelamento do tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Foi utilizado n=5. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibração = 50µm

Fonte: A autora, 2022

4.8 Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão dos principais marcadores da diferenciação e proliferação de adipócitos marrons

O grupo HF apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de BMP7 (Figura 16 B) em relação ao grupo controle, mas o tratamento com ASE não alterou significativamente esses níveis em relação ao grupo HF.

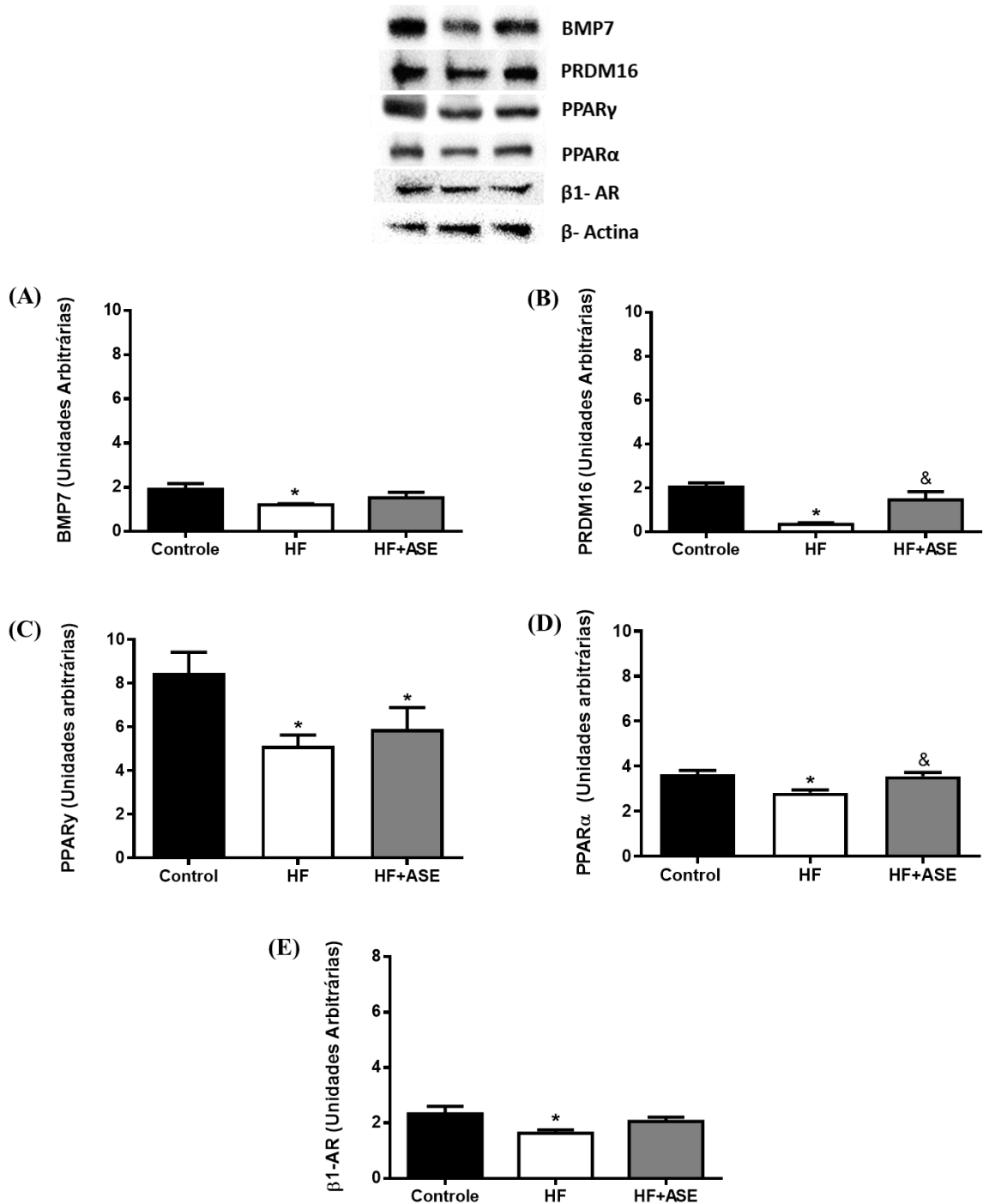
Os animais do grupo HF apresentaram uma expressão significativamente reduzida ($p < 0,05$) de PRDM16 (Figura 16 A) em relação ao grupo controle e o tratamento com ASE (HF+ASE) preveniu essa redução em relação ao grupo HF.

Em relação ao conteúdo de PPAR γ (Figura 16 C), o grupo HF apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão em relação ao grupo controle. O grupo ASE não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo HF, mas se mostrou significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo controle.

Os animais obesos do grupo HF tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de PPAR α (Figura 16 D) e o tratamento com ASE preveniu essa redução ($p < 0,05$).

O grupo HF também apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão do receptor β 1 adrenérgico (Figura 16 E). Contudo, o tratamento com ASE não promoveu alterações significativas na expressão desta proteína em relação ao grupo HF.

Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das proteínas envolvidas na diferenciação e proliferação de adipócitos marrons



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de PRDM16 (A), BMP7 (B), PPAR γ (C), PPAR α (D) e β 1-AR (E) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=6. As diferenças foram indicadas com símbolo * p<0,05 em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

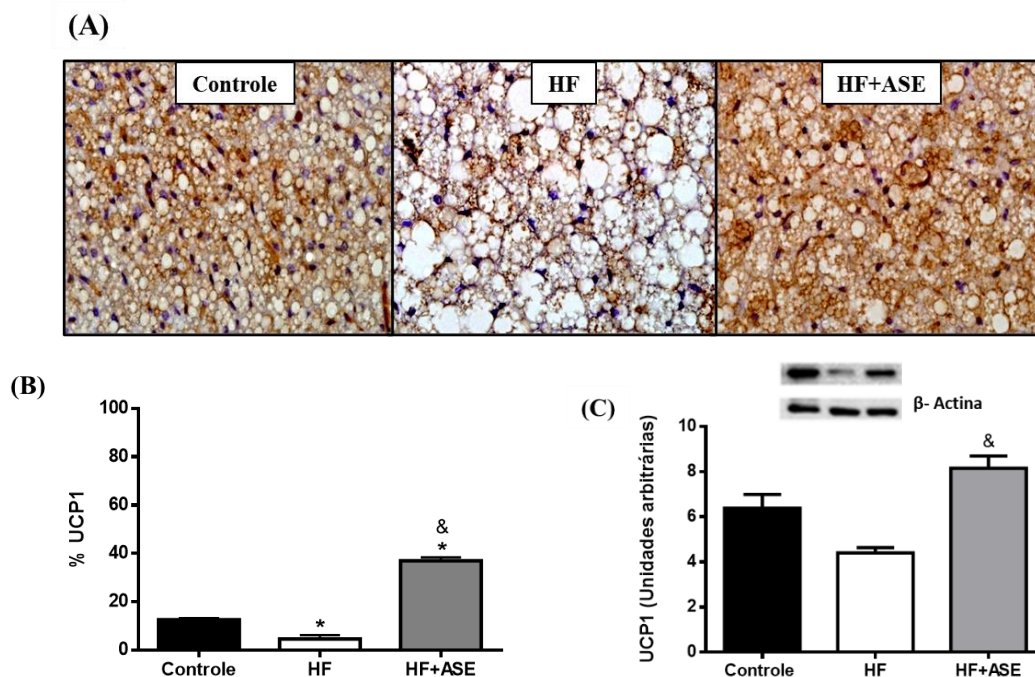
Fonte: A autora, 2022.

4.9 Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas relacionadas à termogênese no Tecido Adiposo Marrom

A imunomarcação de UCP-1 em TAM foi significativamente reduzida no grupo HF em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e significativamente aumentada no grupo tratado com ASE em relação aos grupos controle e HF ($p < 0,05$) (Figura 17 A e B). Contudo, a expressão proteica de UCP-1 em homogenato de TAM não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos HF e controle, mas o tratamento com o ASE aumentou a expressão desta proteína no grupo HF+ASE em relação ao grupo HF (Figura 17 C).

O conteúdo proteico do receptor $\beta 3$ -adrenérgico (Figura 18) foi significativamente ($p < 0,05$) reduzido nos animais do grupo HF em relação ao grupo controle e o tratamento com ASE aumentou esses níveis em relação ao grupo HF, se mantendo menor do que o grupo controle.

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de UCP-1

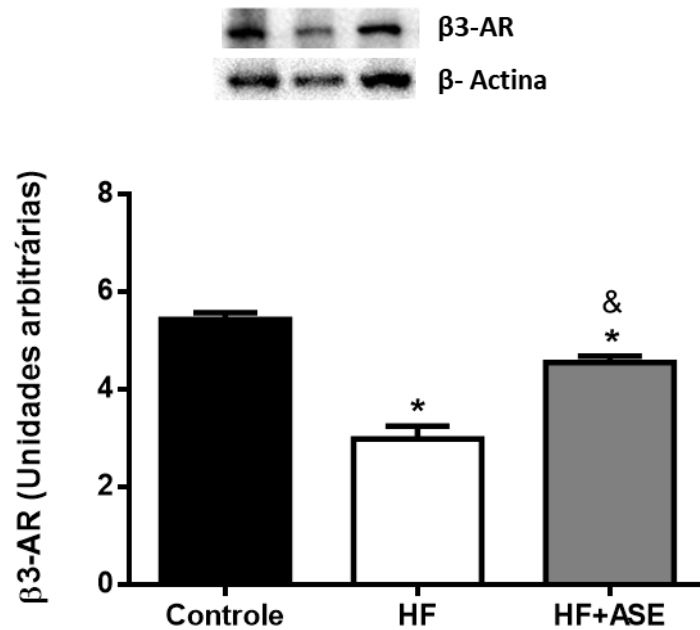


Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre imunomarcação de UCP-1, com representação qualitativa (A) e quantitativa (B) em lâminas de tecido adiposo marrom, e sobre a expressão proteica de UCP-1 (C) em homogenato de tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=6$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibração = 50 μ m.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão do Receptor β 3-adrenérgico



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão do receptor β 3-adrenérgico no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=6. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

4.10 Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das proteínas envolvidas na ativação e regulação da termogênese do Tecido Adiposo Marrom

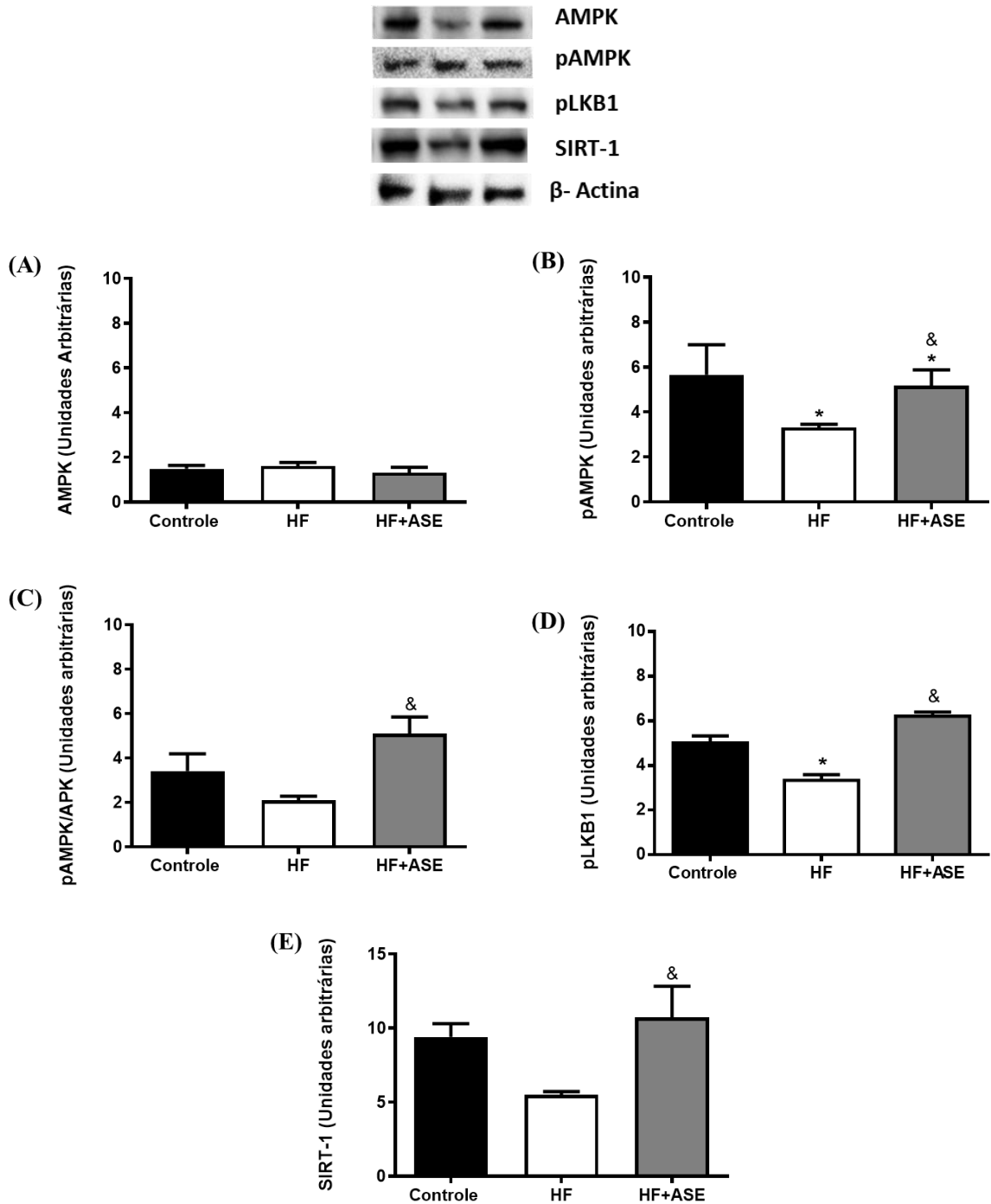
Os grupos experimentais não apresentaram diferença na expressão de AMPK total (Figura 19 A). Contudo o grupo HF demonstrou uma redução na expressão de pAMPK (Figura 19 B) em relação ao grupo controle e o tratamento com ASE aumentou a fosforilação desta proteína, se mostrando significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo HF, mas se mantendo significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

A razão entre as porções fosforilada e total da AMPK (Figura 19 C) não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e HF, mas o grupo ASE demonstrou um aumento nesta razão em relação ao grupo HF.

O grupo HF demonstrou redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de pLKB1 (Figura 19 D) em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE se mostrou eficaz em prevenir o aumento da expressão desta proteína.

Apesar de não haver diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão de SIRT-1 (Figura 19 E) no grupo HF em relação ao grupo controle, o tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) a expressão desta proteína.

Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas envolvidas na ativação do Tecido Adiposo Marrom



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de AMPK (A), pAMPK (B), a razão pAMPK/AMPK (C), pLKB1 (D) e SIRT-1 (E) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=6. As diferenças foram indicadas com símbolo * p<0,05 em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

4.11 Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas relacionadas à utilização de ácidos graxos no Tecido Adiposo Marrom

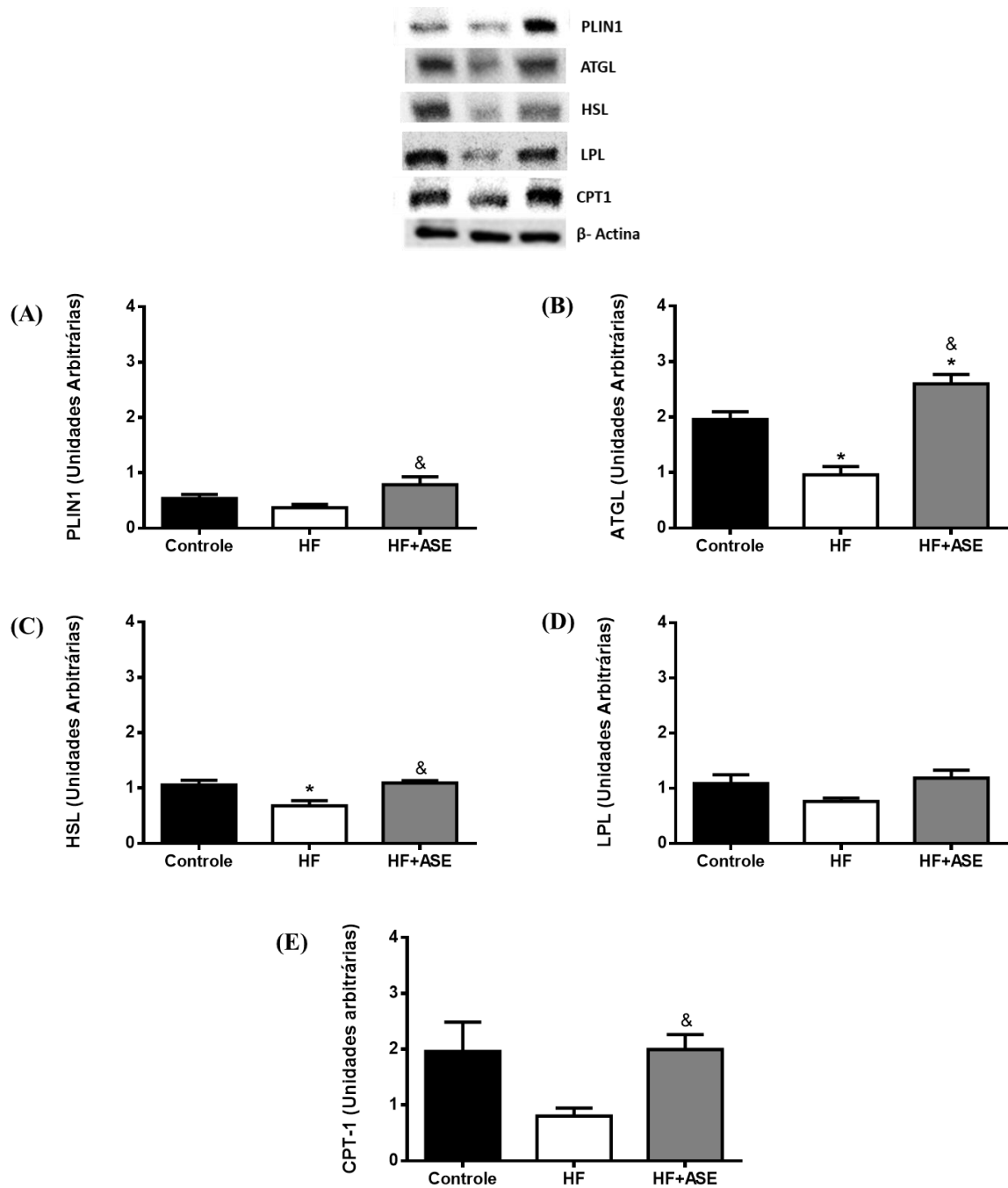
Não houve diferença na expressão da proteína PLIN1 entre os grupos HF e controle. O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) a expressão de PLIN1 (Figura 20 A) nos animais tratados (HF+ASE) em relação ao grupo HF.

Os animais do grupo HF demonstraram uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de ATGL (Figura 20 B) e HSL (Figura 20 C) em relação aos animais do grupo controle. O tratamento com o ASE demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de ATGL em relação aos grupos controle e HF, e de HSL somente em relação ao grupo HF.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais na expressão de LPL (Figura 20 D).

Em relação à expressão de CPT-1 (Figura 20 E) não foi observada uma diferença significativa entre os grupos controle e HF. Contudo, o tratamento com ASE demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta proteína em relação ao grupo HF.

Figura 20 - Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de proteínas da utilização de ácidos graxos



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de PLIN1 (A), ATGL (B), HSL (C), LPL (D) e CPT1 (E) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=6. As diferenças foram indicadas com símbolo * p<0,05 em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

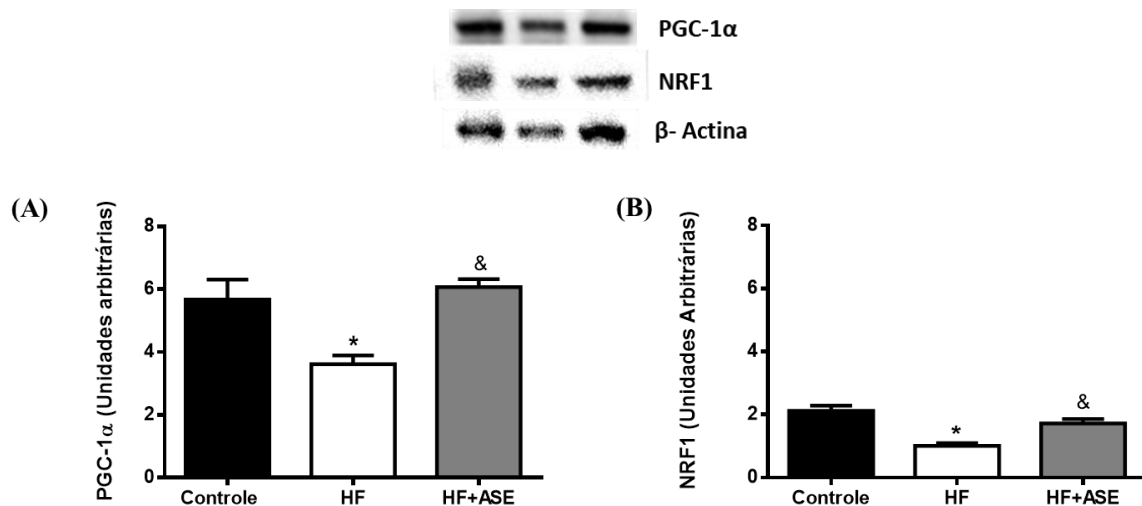
Fonte: A autora, 2022.

4.12 Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão das principais proteínas relacionadas à biogênese mitocondrial

O grupo HF demonstrou redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de PGC-1 α (Figura 21 A) em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE se mostrou eficaz em prevenir a redução da expressão desta proteína.

O grupo HF apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de NRF1 (Figura 21 B) e o tratamento com ASE preveniu a redução na expressão desta proteína.

Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da biogênese mitocondrial



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a expressão de NRF1 (A) e CPT-1 (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=6$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

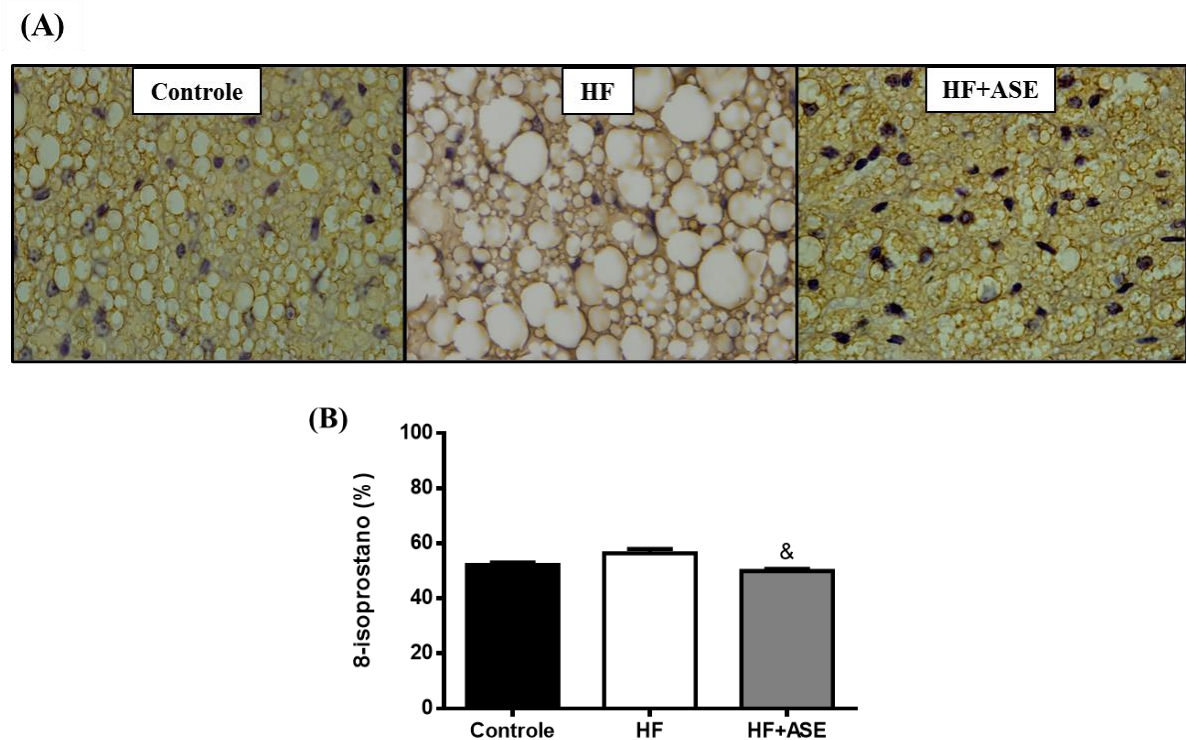
4.13 Efeito do tratamento com ASE sobre o dano oxidativo no Tecido Adiposo Marrom

Apesar de não haver um aumento significativo na imunomarcação de 8-isoprostano em lâminas histológicas de tecido adiposo marrom no grupo HF em relação ao grupo controle, o tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) a percentagem desta proteína no tecido em relação ao grupo HF (Figura 22 A e B).

Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de MDA (Figura 23 A) no grupo HF em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE preveniu o aumento desses níveis nos animais tratados em relação ao grupo HF.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de carbonilação de proteínas (Figura 23 B) entre os grupos experimentais.

Figura 22 - Efeito tratamento com ASE sobre imunomarcação de 8-isoprostano

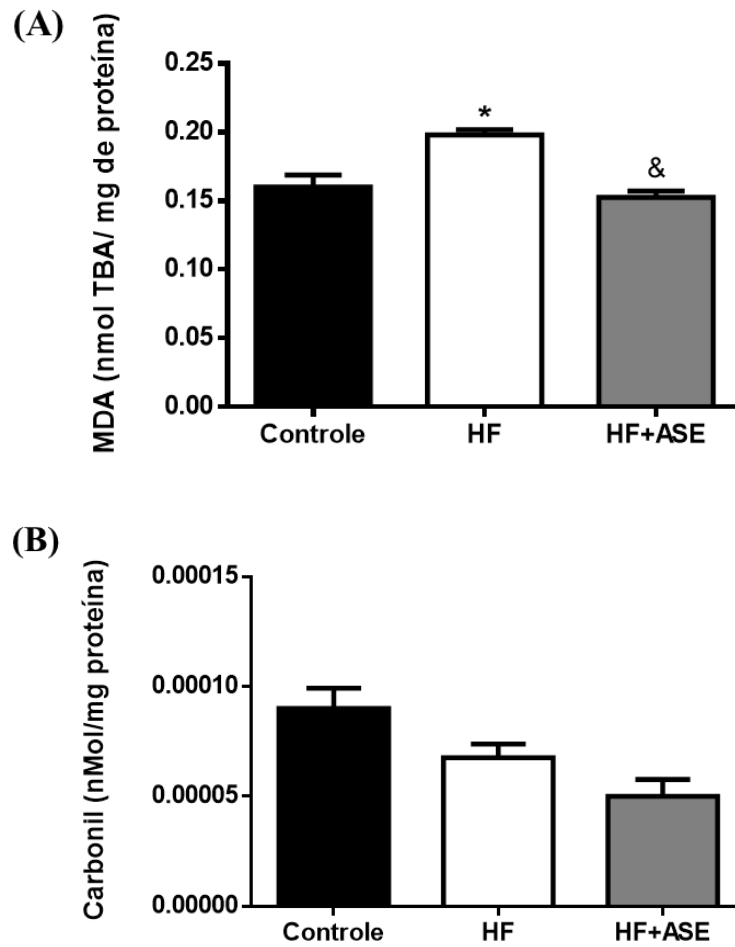


Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre imunomarcação de 8-isoprostano, com representações qualitativa (A) e quantitativa (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=5$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibração = 50 μ m.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 23 - Efeito do tratamento com ASE sobre os marcadores de dano oxidativo



Legenda: Efeito do tratamento com os níveis de MDA (A) e do grupamento carbonil (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=6$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p<0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibração = $50\mu\text{m}$.

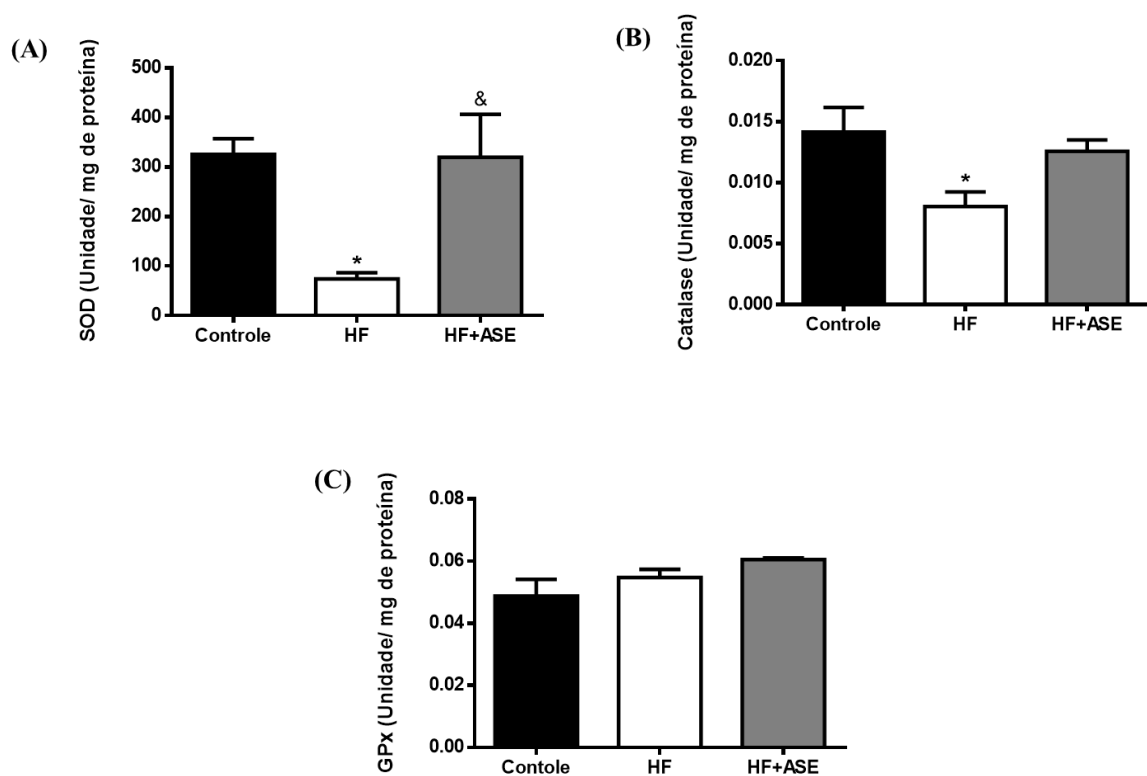
Fonte: A autora, 2022.

4.14 Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade enzimática antioxidante no Tecido Adiposo Marrom

O grupo HF demonstrou uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 24 A) e catalase (Figura 24 B) em relação ao grupo controle. O tratamento com ASE foi capaz de prevenir somente a redução da atividade da SOD, não alterando de forma significativa a atividade da catalase.

Em relação à atividade da GPx (Figura 24 C), não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 24 - Efeito do ASE sobre a atividade das enzimas antioxidantes



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da SOD (A), catalase (B) e GPx (C) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

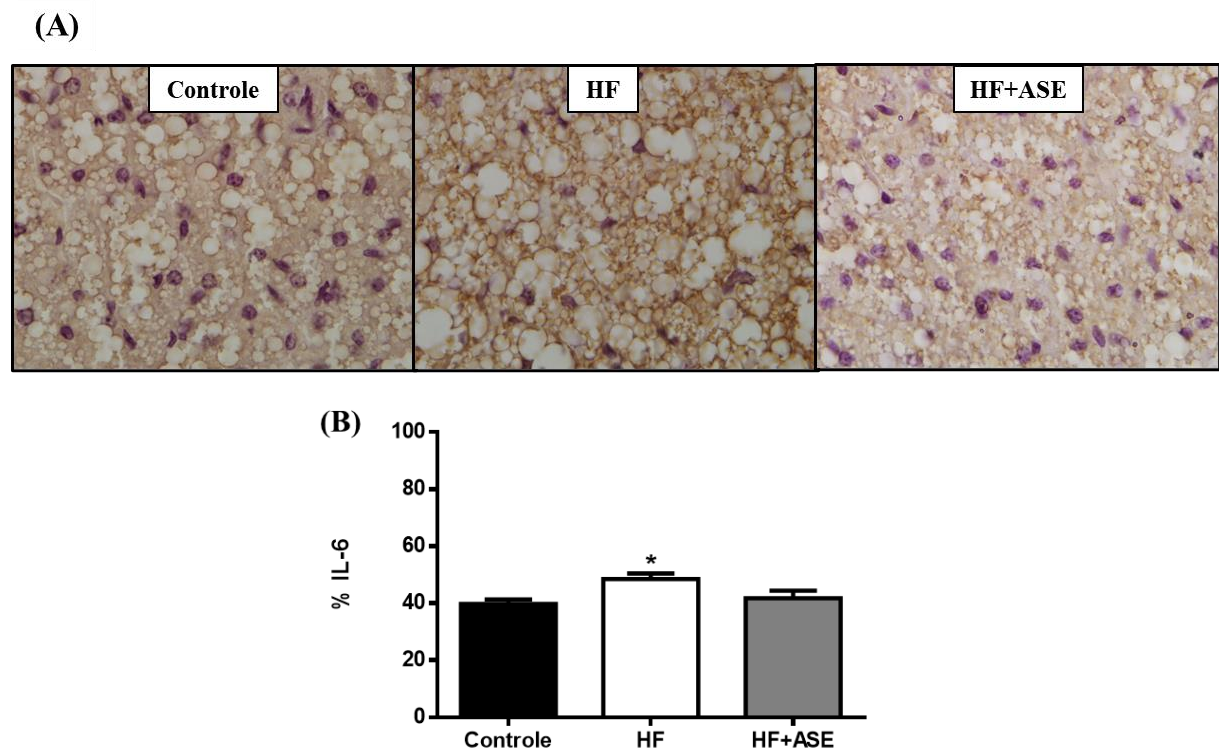
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=8$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & em relação ao grupo HF.

Fonte: A autora, 2022.

4.15 Efeito do tratamento com ASE sobre a imunomarcação de citocinas pró-inflamatórias no Tecido Adiposo Marrom

O grupo HF demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) na imunomarcação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 25), MCP-1 (Figura 26) e TNF- α (Figura 27) em rela o ao grupo controle. O tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) a marcação de MCP-1 e TNF- α , mas não de IL-6 em rela o ao grupo HF.

Figura 25 - Efeito do ASE sobre a imunomarcação de IL-6

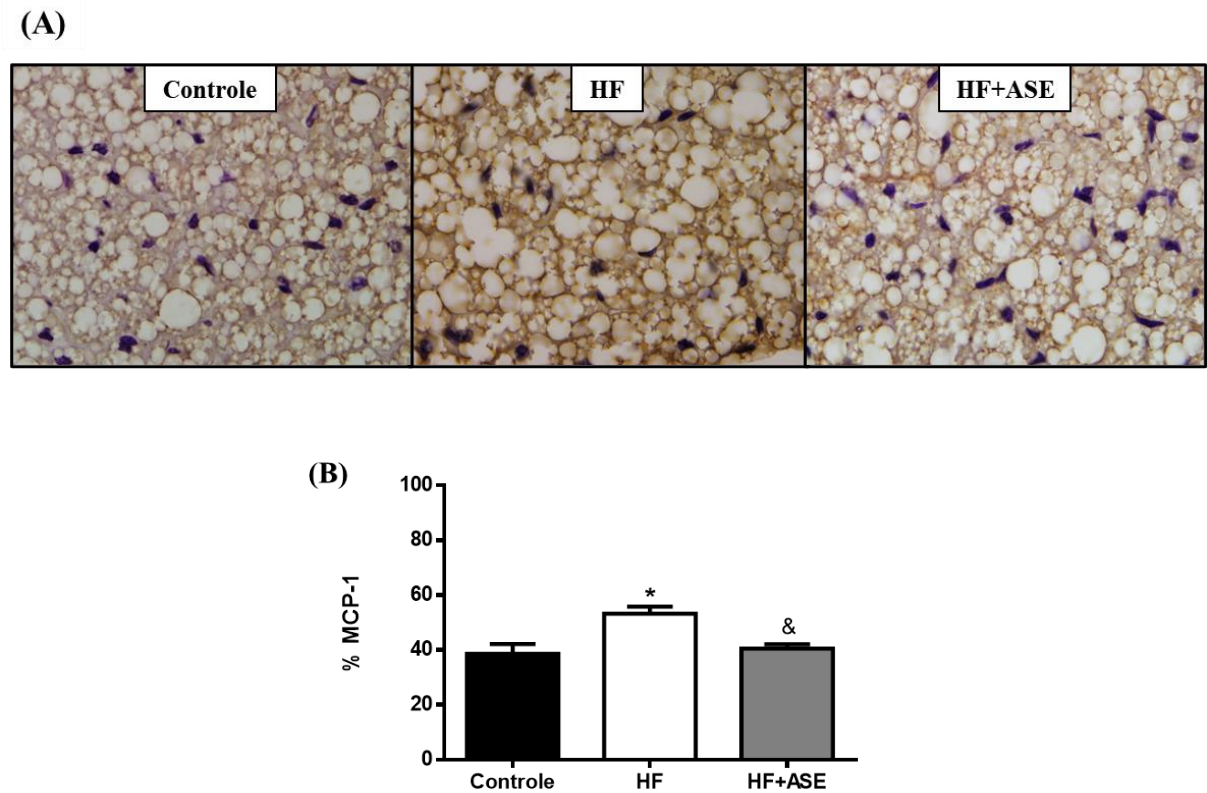


Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre imunomarcação de IL-6, com representa es qualitativa (A) e quantitativa (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos   dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=5$. As diferenças foram indicadas com símbolo * $p < 0,05$ em rela o ao grupo controle e & em rela o ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibra o = 50 μ m.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 26 - Efeito do ASE sobre a imunomarcação de MCP-1



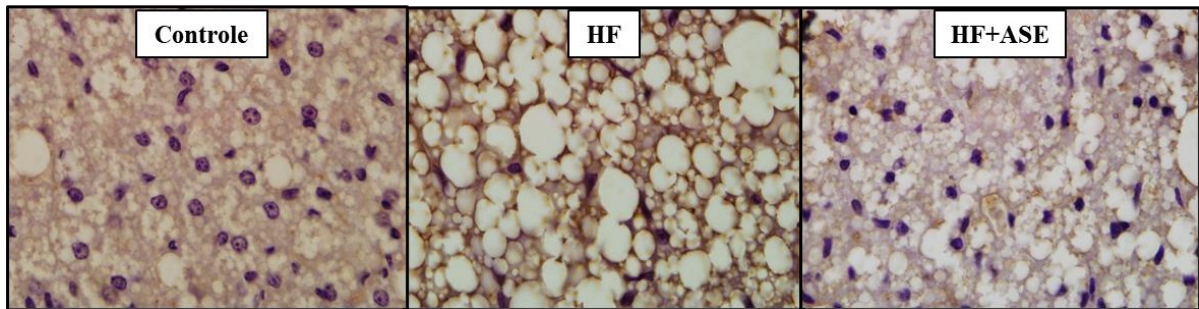
Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre imunomarcação de MCP-1, com representações qualitativa (A) e quantitativa (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos   dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, $n=5$. As diferenç as foram indicadas com símbolo * $p<0,05$ em rela o ao grupo controle e & em rela o ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibra o = 50 μ m.

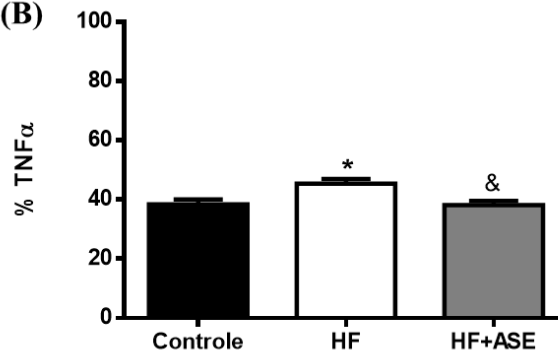
Fonte: A autora, 2022.

Figura 27 - Efeito do ASE sobre a imunomarcação de TNF- α

(A)



(B)



Legenda: Efeito do tratamento com ASE sobre imunomarcação de TNF- α , com representações qualitativa (A) e quantitativa (B) no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos   dieta hiperlipídica.

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro da média, n=5. As diferenç as foram indicadas com símbolo * p<0,05 em rela o ao grupo controle e & em rela o ao grupo HF. As imagens foram feitas em aumento de 100x e barra de calibra o = 50 μ m.

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

A obesidade é um grande problema de saúde pública em todo o mundo e está associada ao aparecimento de diversas alterações metabólicas e cardiovasculares, como o desenvolvimento da HAS e DM2 (Segura, 2007), bem como o crescimento acelerado do tecido adiposo.

Este estudo demonstrou que a dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo do peso corporal e da massa adiposa visceral, bem como do índice de adiposidade e da glicemia final nos animais do grupo HF, dados que corroboram com outros estudos em modelo de obesidade (Santos *et al.*, 2020; Romão *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2015 e 2010).

É bem descrito na literatura que o aumento da adiposidade está relacionado com a hiperglicemia e hiperlipidemia em animais alimentados com a dieta hiperlipídica (Santos *et al.*, 2020, Da Costa *et al.*, 2017; De Oliveira *et al.*, 2015 e 2010). Neste estudo, foi demonstrado um aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-C nos animais obesos em relação ao grupo controle, mas não houve alteração nos níveis de VLDL-C e triglicerídeos. Além disso, observamos um aumento bastante significativo na glicemia final destes animais, reforçando que o aumento do consumo de dieta hiperlipídica está relacionado com a redução da sensibilidade à insulina e uma consequente hiperglicemia.

Durante o período de desenvolvimento do modelo experimental, os animais dos três grupos apresentaram uma ingestão semelhante de dieta, mas o ganho de peso e demais alterações associadas à obesidade nos grupos que foram alimentados com a dieta hiperlipídica devem resultar no aumento da ingestão de energia observada na dieta com maior teor de gordura, reforçando dados anteriores que apontam que a dieta hiperlipídica induz o aumento da ingestão de energia, mas não interfere na ingestão alimentar diária dos animais (Frantz *et al.*, 2013), além de reforçar dados prévios da literatura, que destacam a alta susceptibilidade dos camundongos da linhagem C57Bl/6 ao desenvolvimento da obesidade induzida por dieta e demais desordens associadas à SM (ICTB, 2020).

O ASE é um extrato hidroalcolólico proveniente dos frutos da *Euterpe oleracea* Mart., que são ricos em polifenóis (Rocha *et al.*, 2007). Este extrato é bem descrito na literatura e apresenta efeitos metabólicos e cardioprotetores associados ao seu significativo conteúdo de polifenóis, que incluem expressivos níveis de proantocianidinas poliméricas, além de

catequina e epicatequina, conforme mostrado em estudos prévios do nosso grupo em diferentes modelos experimentais (Santos *et al.*, 2020; Romão *et al.*, 2019; De Bem *et al.*, 2018 e 2017; Cordeiro *et al.*, 2018 e 2015; De Oliveira *et al.*, 2015 e 2010; De Moura *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2008 e 2007).

Os resultados observados neste estudo sugerem que o tratamento com o ASE previne os efeitos deletérios causados pela alimentação com dieta hiperlipídica, prevenindo o aumento de peso corporal, da massa adiposa visceral e hipertrofia dos adipócitos brancos. Estes dados podem ser corroborados com estudos anteriores do nosso grupo no mesmo modelo experimental, que demonstram esse efeito benéfico do ASE e apontam que a redução da massa adiposa pode contribuir para o efeito deste extrato em reduzir o ganho de peso, além de sugerir que os polifenóis presentes no extrato podem ser responsáveis pelo seu efeito anti-obesogênico. Já os resultados observados com o ASE na prevenção da hiperglicemia e hiperlipidemia, além de corroborar fortemente com os dados da literatura, reforçam dados prévios do nosso grupo no mesmo modelo experimental, que demonstram efeitos antihiperlipidêmicos e antihiperlipidêmicos do extrato, que também estão associados ao seu conteúdo polifenólico (Santos *et al.*, 2020; Romão *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2015 e 2010).

A literatura descreve que o peso do TAM é relacionado inversamente ao IMC (Alcalá *et al.*, 2019; Bargut *et al.*, 2019). Contudo, neste estudo foi observado uma hipertrofia do TAM, com aumento da massa do tecido e aumento do tamanho dos adipócitos em animais alimentados com a dieta hiperlipídica, que corrobora com resultados encontrados em outro estudo em modelo de camundongos C57Bl/6 (Alcalá *et al.*, 2017). Esses achados, podem ser reforçados pela análise histológica do TAM, que demonstra um aumento da infiltração lipídica e gotículas de gordura mais significativas, o que pode ser sugerido como causa da disfunção do TAM na obesidade, uma vez que este tecido passa a apresentar um fenótipo semelhante ao observado no TAB.

O efeito do ASE sobre os adipócitos marrons pode ser observado na prevenção dessa infiltração lipídica e manutenção da característica multilocular do tecido, sugerindo que este extrato pode estar prevenindo a disfunção do TAM pelo aumento da ativação do TAM, indução da termogênese e ação lipogênica induzida pelos polifenóis presentes. Estudos anteriores já demonstraram a ação de outros compostos, como EPA e DHA (Bargut *et al.*, 2019) e fenofibrato (Rachid *et al.*, 2015) no remodelamento do TAM. No entanto, essas são as primeiras evidências que mostram o efeito do ASE na morfologia do TAM.

O TAM é um subtipo de tecido adiposo relacionado com a produção de calor e se difere do TAB pelas gotículas de gordura multilocular e alta concentração de mitocôndrias, conforme já bem descrito nas seções anteriores. Evidências apontam este tecido como um novo alvo em potencial para o tratamento de desordens induzidas pela obesidade, uma vez que apresenta extrema importância para o gasto energético, além melhorar a sensibilidade à insulina e alterar a sensibilidade ao ganho de peso (Cypess *et al.*, 2009). Os adipócitos marrons são originados a partir de precursores de células tronco mesenquimais e diversos cofatores têm sido descritos como reguladores do desenvolvimento dos adipócitos marrons (Alcalá *et al.*, 2019).

Neste estudo foi demonstrada uma redução na expressão de PRDM16, BMP7, PPAR γ , PPAR α e β 1-AR nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Estas proteínas são fatores importantes para o processo de diferenciação e proliferação de adipócitos marrons, atuando no comprometimento das células mesenquimais, bem como nas etapas mais tardias da diferenciação e proliferação. Desta forma, esses achados reforçam que a obesidade pode reduzir o comprometimento com a linhagem marrom, bem como a sua proliferação (Sampath *et al.*, 2016).

O ASE demonstrou aumentar a expressão de PRDM16 e PPAR α , mas não de BMP7, PPAR γ e β 1-AR. A expressão inalterada de BMP7 vai de encontro com dados prévios já publicados que indicam a atuação do BMP7 somente em condições de temperatura abaixo da termoneutralidade destes animais (Boon *et al.*, 2013). O aumento de PPAR α regula o metabolismo de lipídeos pela indução da biogênese mitocondrial, β -oxidação, captação de AGL e expressão de UCP-1. A ativação de UCP-1 resulta na preferência de lipídeos como substratos para a termogênese (Miranda *et al.*, 2020), corroborando com o que foi observado neste estudo em relação à expressão das proteínas envolvidas neste processo e reforçando a ação positiva do ASE na ativação do TAM e comprometimento das células mesenquimais com a linhagem marrom. Ademais, o aumento da expressão do PRDM16 (regulador da diferenciação de adipócitos marrons) pelo tratamento com o ASE também reforça o papel do extrato no comprometimento das células com a linhagem adipocitária marrom.

A AMPK desempenha funções no controle do balanço energético corporal através do SNS e diversos estudos sugerem uma correlação entre a sinalização da AMPK e a ativação do TAM, apesar dos mecanismos que regulam a ativação do TAM via AMPK ainda não serem totalmente compreendidos. Entretanto, evidências apontam que uma vez ativada, ela promove a ativação do TAM e induz a termogênese e a biogênese mitocondrial, além de favorecer a

lipólise, revertendo os estoques elevados de triglicerídeos no tecido (Van der Vaart *et al.*, 2021; Hardie *et al.*, 2013).

Os animais obesos, neste trabalho, apresentaram uma redução na expressão de pAMPK, bem como de seu ativador, a quinase pLKB1, o que corrobora com dados da literatura que sugerem que a obesidade suprime a ativação da AMPK e contribui para a RI (Jeon, 2016). Um dos mecanismos conhecidos que explicam essa supressão é a expressão reduzida ou inibição indireta de SIRT-1 pela redução da taxa NAD^+/NADH , que inibe a via SIRT-1/LKB1, via de importância para a fosforilação e ativação da AMPK (Jeon, 2016). Desta forma, pode-se sugerir que no TAM a inibição da via SIRT-1/LKB1 seja responsável pela redução da ativação da AMPK em animais obesos.

Em contrapartida, foi observado um aumento na expressão de pLKB1 e SIRT-1, bem como na expressão de pAMPK e na razão pAMPK/AMPK nos animais tratados, indicando uma maior ativação desta proteína promovida pelo ASE através da ativação da via SIRT-1/LKB1, que é suprimida na obesidade.

Estudos já demonstraram que uma variedade de produtos naturais, em sua maioria derivados de plantas, têm sido mostrados como ativadores da AMPK, como, por exemplo, o resveratrol, quercetina, curcumina e epigallocatequina galato. Estes compostos são considerados polifenóis e têm estrutura química bastante variáveis, podendo ser capazes de ativar a AMPK de formas diferentes (Hardie *et al.*, 2013). Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram o efeito do ASE em aumentar a ativação da AMPK em fígado de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica (De Oliveira *et al.*, 2015), mas é a primeira vez que esse aumento é observado no TAM. Esses achados podem reforçar a teoria de que a ativação da AMPK é um mecanismo importante para a função metabólica benéfica do TAM, uma vez que esta proteína está envolvida na ativação e regulação de diversas outras cascatas de sinalização, e que o ASE ativa esse importante sensor metabólico.

A termogênese requer substratos para serem oxidados e liberados na forma de calor e os lipídeos são substratos muito importantes para este processo. Este estudo demonstrou uma redução das enzimas lipolíticas ATGL e HSL nos animais obesos em relação ao grupo controle. Esses resultados reforçam dados da literatura que indicam que o acúmulo de lipídeos é controlado por um balanço entre os processos de lipogênese e lipólise (Pan *et al.*, 2016). No indivíduo obeso, o gasto energético é menor do que a ingestão energética, favorecendo a lipogênese, que irá sintetizar triglicerídeos e armazenar no tecido adiposo. Em contrapartida, a lipólise é inibida, uma vez que ela é ativada somente quando há necessidade de gasto

energético. Desta, forma, nossos dados indicam que a inibição da termogênese no TAM obeso está diretamente associada à redução da lipólise neste tecido.

Neste estudo foi observado o efeito do ASE em aumentar a expressão de PLIN1, ATGL e HSL, proteínas que estão associadas à lipólise no tecido adiposo marrom. A ativação do TAM ativa uma cascata de sinalização intracelular que aumenta o catabolismo de lipídios, aumentando a liberação de AGL, que são utilizados como combustível para a termogênese (Gharanei *et al.*, 2020). No seu estado basal, a PLIN1 envolve as gotículas de gordura e inibe a lipólise, mas o aumento sistêmico de catecolaminas resultante da ativação simpática tira a PLIN1 de seu estado basal e promove a lipólise neste tecido através da translocação de HSL. Além disso, a adrenalina também tem efeito direto sobre a ação da ATGL, enzima que catalisa a hidrólise de triglicerídeos (Sohn *et al.*, 2018). Foi observado também um aumento na expressão de CPT-1 no TAM dos animais tratados, reforçando dados da literatura que indicam que a ativação de PPAR α aumenta a expressão de CPT-1, que é uma proteína mitocondrial relacionada à captação de AG pela mitocôndria e à capacidade de oxidação mitocondrial (Miranda *et al.*, 2020). Os AGL liberados pela lipólise, além de servirem como combustível para a termogênese, também agem diretamente na ativação da UCP-1 através de ligação alostérica (Heeren & Scheja, 2018).

Desta forma, nossos achados demonstram, pela primeira, vez o efeito do ASE em induzir a lipólise no TAM, aumentando os níveis de AGL que, além de ativar diretamente a UCP-1 (proteína efetora da termogênese) irão servir como combustível para a oxidação e favorecer a ativação de fatores de transcrição pró-termogênicos, como o PPAR α .

A UCP-1 é uma proteína encontrada no TAM e que está relacionada ao processo de termogênese. Neste trabalho foi observado por meio de imunomarcagem em lâminas de TAM, bem como pela expressão por western blotting, a redução de UCP-1 nos animais do grupo HF. Nos animais obesos também foi observada uma redução da expressão do β 3-AR, que é o receptor adrenérgico mais expresso no adipócito marrom maduro e é ativado pelo estímulo do SNS, indicando que a obesidade e a disfunção adipocitária estão associadas a uma diminuição da atividade termogênica, o que é bem descrito na literatura. Além disso, a inibição da termogênese observada pela redução de UCP-1 e β 3-AR reforça ainda mais os resultados observados pela inibição da lipólise do TAM dos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

O tratamento com o ASE aumentou não só a expressão de UCP-1, como de β 3-AR, corroborando com dados da literatura que apontam que polifenóis são considerados excelentes reguladores termogênicos (Wood dos Santos *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014).

A mitocôndria é conhecida como o gerador de energia das células eucarióticas, contribuindo não somente para o metabolismo celular, mas também para regular as vias de produção de energia. A biogênese mitocondrial está ligada à proliferação e divisão de organelas, num processo que é coordenado por cascatas do ciclo celular. No entanto, diferentes estímulos podem desencadear a biogênese mitocondrial (Chodari *et al.*, 2021).

A obesidade vem sendo fortemente associada à disfunção mitocondrial, que resulta na redução da respiração mitocondrial, aumento da produção de ERO, redução da biogênese mitocondrial e da β -oxidação (Wood dos Santos *et al.*, 2018; De Mello *et al.*, 2017). Essas informações corroboram com nossos achados em animais obesos, que mostraram redução na expressão de AMPK, PGC-1 α , NRF1 e CPT1, proteínas que estão fortemente associadas à função e ativação da biogênese mitocondrial.

O PGC1- α é considerado o regulador chave da biogênese mitocondrial. Quando ativado, ele estimula a atividade de fatores de respiração nuclear, como o NRF1, que também está envolvido no controle da biogênese mitocondrial. Desta forma, a ativação da via PGC1- α /NRF1/TFAM resulta na síntese de mtDNA e proteínas para a formação de novas mitocôndrias (Chodari *et al.*, 2021; Wood dos Santos *et al.*, 2018). Apesar deste estudo não ter avaliado a expressão de TFAM, foi observado aumento na expressão de PGC1- α e NRF1 pelo tratamento com o ASE, indicando que a ativação desta via pelo extrato possa ser responsável pelo aumento da biogênese mitocondrial no TAM. Além disso, a literatura aponta que a atividade da PGC1- α pode ser regulada tanto pela AMPK, quanto pela SIRT-1 (Van der Vaart *et al.*, 2021; Wood dos Santos *et al.*, 2018), o que reforça ainda mais nossos achados, uma vez que observamos aumento na expressão de ambas as proteínas nos animais tratados com o extrato. Nossos resultados são sustentados por dados já publicados que demonstram que compostos naturais, como a curcumina e outros polifenóis, como o resveratrol e a quercetina, melhoram a produção de energia através da ativação da AMPK e da SIRT-1 (Wood dos Santos *et al.*, 2018).

Estudos já demonstraram a correlação inversa entre expressão de UCP-1 e a produção de ERO no TAM (Shabalina *et al.*, 2014). A disfunção mitocondrial, bem como o aumento da produção de ERO mitocondrial, podem estar associados ao estresse oxidativo, que foi

observado neste estudo através do aumento dos níveis de MDA, bem como pela redução da atividade das enzimas SOD e catalase em homogenato de TAM dos animais obesos.

Neste estudo foi observado aumento na imunomarcação de IL-6, MCP-1 e TNF- α em lâminas de TAM dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica. Esses achados corroboram com dados da literatura que mostram que no TAM o aumento da expressão de marcadores inflamatórios, como TNF- α e MCP-1 em modelos murinos estão relacionados a uma redução da expressão de UCP-1 e de outros marcadores termogênicos (Omran & Christian, 2020; Roberts-Toler *et al.*, 2016). Entretanto, estudos demonstram que o TAM ativado apresenta um aumento significativo na secreção de IL-6 (Maliszewska & Kretowski, 2021), dado que diverge dos nossos achados neste estudo. Acreditamos que o aumento de IL-6 no TAM possa estar relacionado à disfunção do adipócito marrom observada histologicamente, que induz o adipócito a apresentar fenótipo semelhante ao do adipócito branco, de forma que ele passa a secretar as citocinas pró-inflamatórias de forma semelhante ao TAB. Investigações apontam que a inflamação de baixo grau no TAM contribui para a produção excessiva de ERO e está associada ao estresse oxidativo (Omran & Christian, 2020).

O tratamento com ASE demonstrou eficácia em reduzir o estresse oxidativo, através da redução dos níveis de MDA e de 8-isoprostano, e do aumento da atividade da enzima antioxidante SOD, mas não da catalase e da GPx. O extrato, ainda, reduziu os níveis de TNF- α e MCP-1. Esses achados sugerem que os polifenóis presentes no extrato podem atuar reduzindo os danos do estresse oxidativo e da inflamação no TAM de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, como sugerem trabalhos prévios do nosso grupo em outros tecidos e modelos experimentais (Santos *et al.*, 2020; Romão *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2015, Da Costa *et al.*, 2012; De Moura *et al.*, 2011).

CONCLUSÃO

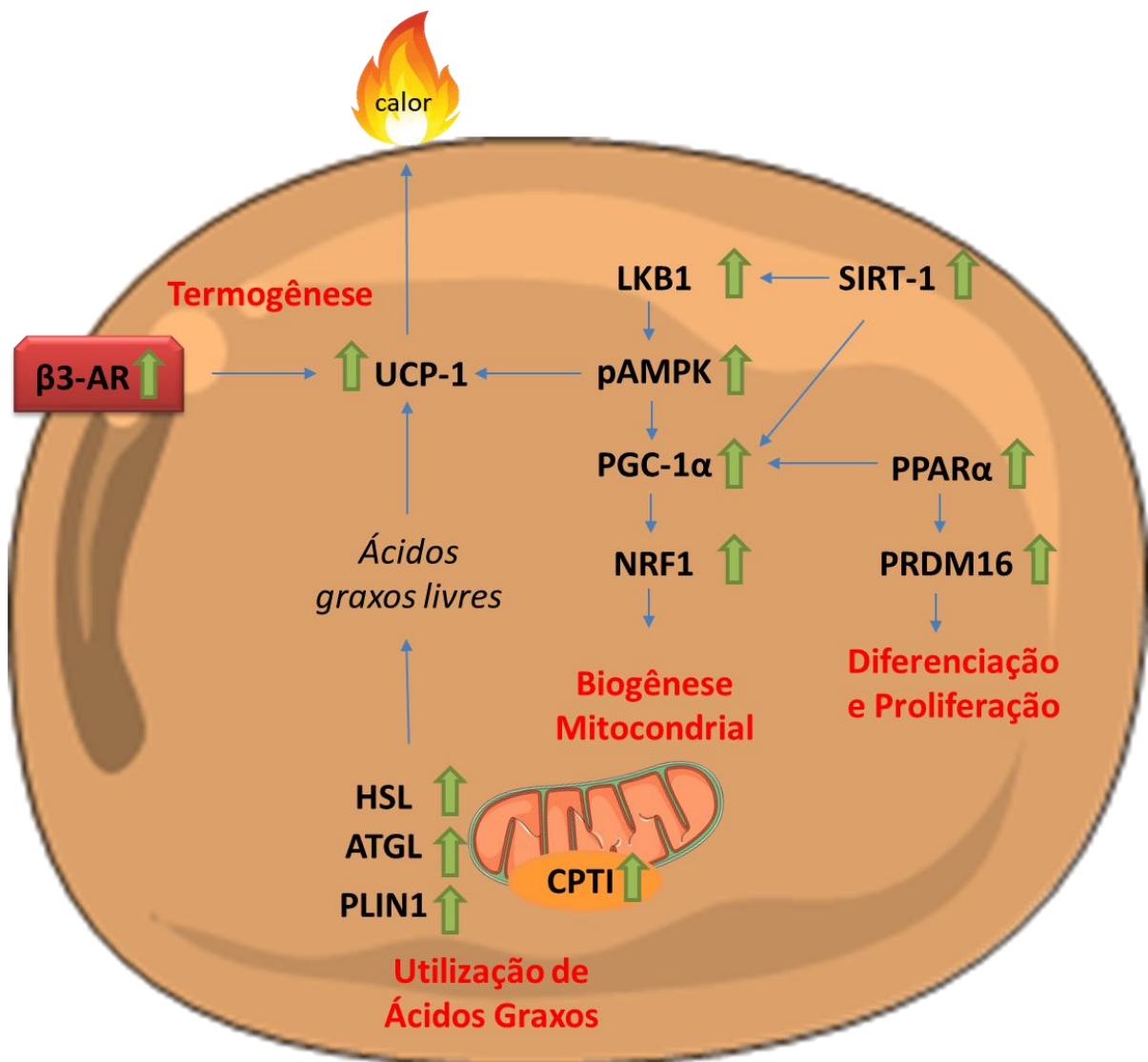
Os resultados demonstram que o ASE foi eficaz em prevenir o ganho de peso, a adiposidade visceral, glicemia e a massa do tecido adiposo intra-abdominal, bem como as alterações morfológicas nos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos C57Bl/6 submetidos à dieta hiperlipídica, indicando o potencial do ASE no tratamento da obesidade (Quadro 5).

O ASE promoveu aumento da expressão de proteínas chaves para a diferenciação do TAM, indução da termogênese, da biogênese mitocondrial e da lipólise no TAM. A ativação do TAM e indução da termogênese pode ser sugerida pela ativação da via SIRT-1/LKB1/AMPK e expressão de UCP-1 e β 3-AR; a diferenciação do TAM pela expressão de PRDM16; a ativação da via SIRT-1/PGC1- α /NRF1 para a biogênese mitocondrial; e ATGL, HSL e CPT-1 para a lipólise e captação de ácidos graxos para a mitocôndria (Figura 28).

A ação anti-inflamatória e antioxidante do extrato observada no TAM, sugere um mecanismo benéfico adicional na disfunção deste tecido e nas alterações metabólicas associadas à obesidade.

Portanto, esses achados demonstram que o tratamento com o ASE previne as alterações estruturais do TAM de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e aumenta a expressão de proteínas chaves relacionadas à termogênese e biogênese mitocondrial, além de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo no TAM, sugerindo que o extrato pode ser utilizado como uma abordagem importante na prevenção da obesidade e das alterações metabólicas associadas a ela.

Figura 28 - Resumo Gráfico dos Resultados



















Legenda: Resumo gráfico dos efeitos do tratamento com ASE sobre a expressão das proteínas no Tecido Adiposo Marrom. As setas em verde indicam o efeito do tratamento com o ASE sobre os parâmetros analisados. Abreviaturas: receptor $\beta 3$ -adrenérgico, $\beta 3\text{-AR}$; proteína desacopladora 1, UCP-1 ; proteína quinase do fígado, LKB1 ; proteína quinase dependente de AMP, AMPK ; coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ , $\text{PGC-1}\alpha$; fator de transcrição nuclear 1, NRF1 ; sirtuína 1, SIRT-1 ; lipase hormônio-sensível, HSL ; lipase triglicérido adiposa, ATGL ; perilipina 1, PLIN1 ; carnitina palmitoil transferase I, CPT1 ; Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α , $\text{PPAR}\alpha$; Domínio contendo PR16, PRDM16 .

Fonte: A Autora, 2022.

Quadro 5 - Resumo Gráfico dos Resultados

	HF	ASE
Peso e ganho de massa corporal	↑	↓
Ingestão de ração	=	=
Ingestão energética	↑	=
Glicemia	↑	↓
Peso Tecido Adiposo Intra-abdominal	↑	↓
Peso Tecido Adiposo Subcutâneo	↑	=
Peso Tecido Adiposo Marrom	↑	=
Índice de Adiposidade	↑	↓
Colesterol e LDL-C	↑	=
Triglicerídeos e HDL-C	=	=
VLDL	=	↓
Morfologia TAB	↑	↓
Morfologia TAM	↑	↓
PRDM16	↓	↑
BMP7	↓	=
PPAR γ	↓	=
PPAR α	↓	↑
pAMPK/AMPK	=	↑
PGC-1 α	↓	↑
pLKB1	↓	↑
SIRT-1	=	↑
UCP-1	↓	↑
β 1-AR	↓	=
β 3-AR	↓	↑
PLIN1	=	↑
ATGL	↓	↑
	HF	ASE

HSL		
LPL	=	=
NRF1		
CPT1	=	
8-isoprostano	=	
MDA		
Carbonil	=	=
Atividade SOD		
Atividade Catalase		=
Atividade GPx	=	=
Marcação de IL-6		=
Marcação de MCP-1		
Marcação de TNF-α		

Legenda: Quadro de resumo gráfico dos resultados. As setas indicam diferença significativa entre os grupos HF em relação ao controle e ASE em relação ao HF. Os símbolos = indicam que não houve diferença significativa entre os grupos HF em relação ao controle e ASE em relação ao HF.

Fonte: A autora, 2022.

REFERÊNCIAS

- Abbasian, Maryam; Delvarianzadeh, Mehri; Ebrahimi, Hossein; et al. Relationship between serum levels of oxidative stress and metabolic syndrome components. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 12, n. 4, p. 497–500, 2018.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 121–126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Alcalá, Martín; Calderon-Dominguez, María; Bustos, Eduvigis; *et al.* Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 16082, 2017.
- Alcalá, Martín; Calderon-Dominguez, María; Serra, Dolors; *et al.* Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 94, 2019.
- Andrade, A., Pinto, SC., and Oliveira, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books [Acesso em 25 ago 2020].
- Bannister, Joe V.; Calabrese, Lilia. Assays for Superoxide Dismutase. *In: GLICK, David (Org.). Methods of Biochemical Analysis*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 279–312. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470110539.ch5>> {Acesso em: 26 out 2021}.
- Bargut, Thereza Cristina Lonzetti; Martins, Fabiane Ferreira; Santos, Larissa Pereira; *et al.* Administration of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids may improve the remodeling and browning in subcutaneous white adipose tissue and thermogenic markers in brown adipose tissue in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 482, p. 18–27, 2019.
- Bastías-Pérez, Marianela; Serra, Dolors; Herrero, Laura. Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity. *Nutrients*, v. 12, n. 11, p. 3234, 2020.
- Bonfante, Ivan Luiz Padilha; Duft, Renata Garbellini; Chacon-Mikahil, Mara Patrícia Traina; *et al.* Novos achados relacionados ao tecido adiposo: uma revisão de literatura sobre o browning e irisina. *Revista Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 2, p. 9, 2015.
- Boon, M. R., van den Berg, S. A. A., Wang, Y., van den Bossche, J., Karkampouna, S., Bauwens, M., ... Rensen, P. C. N. (2013). BMP7 Activates Brown Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity Only at Subthermoneutrality. *PLoS ONE*, 8(9), e74083. doi:10.1371/journal.pone.0074083
- Buettner, Roland; Scholmerich, Jürgen; Bollheimer, L. Cornelius. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. *Obesity*, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
- Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L.; Golozoubova, V.; Cannon, B. & Nedergaard, J. (1999). β 1 to β 3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation. *Endocrinology*, 140(9), 4185–4197. doi:10.1210/endo.140.9.6972
- Cannon, Barbara; Nedergaard, Jan. *Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance.* *Physiological Reviews*, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- Chait, Alan; Den Hartigh, Laura J. *Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease.* *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 7, p. 22, 2020.
- Chodari, L.; Aytemir, D.M.; Vahedi, P.; Alipour, M.; Vahed, S.Z.; Kathibi, S.M.H.; Amahdian, E.; Ardalan, M.; Eftekhari, A. "Targeting Mitochondrial Biogenesis with Polyphenol Compounds", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 4946711, 20 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4946711>
- Couchani, Edward T.; Kazak, Lawrence; Jedrychowski, Mark P.; *et al.* Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, v. 532, n. 7597, p. 112–116, 2016.
- Cordeiro, Viviane; Carvalho, Lenize CRM; De Bem, Grazielle F; *et al.* Euterpe oleracea Mart. extract prevents vascular remodeling and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. p. 12, 2015.
- Cordeiro, Viviane da Silva Cristino; De Bem, Grazielle Freitas; Da Costa, Cristiane Aguiar; *et al.* Euterpe oleracea Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, v. 57, n. 2, p. 817–832, 2018.
- Cypess, Aaron M; Williams, Gethin; Goldfine, Allison B; *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *The New England Journal of Medicine*, p. 9, 2009.
- Da Costa, Cristiane Aguiar, De Oliveira, Paola Raquel Braz; De Bem, Grazielle Freitas; *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, 2012.
- Das, Eashita; Mon, Joon Ho; LEE, Ju Hee; *et al.* Adipose Tissue and Modulation of Hypertension. *Current Hypertension Reports*, v. 20, n. 11, p. 96, 2018.
- De Bem, G. F., da Costa, C. A., da Silva Cristino Cordeiro, V., Santos, I. B., de Carvalho, L. C. R. M., de Andrade Soares, R., ... de Moura, R. S. (2018). Euterpe oleracea Mart. (açai)

seed extract associated with exercise training reduces hepatic steatosis in type 2 diabetic male rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 52, 70–81. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.09.021

De Bem, Grazielle Freitas; Da Costa, Cristiane Aguiar; Santos, Izabelle Barcellos; *et al.* Antidiabetic effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract and exercise training on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats: A positive interaction. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0199207, 2018.

De Mello, A. H., Costa, A. B., Engel, J. D. G., & Rezin, G. T. (2018). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, 192, 26–32. doi:10.1016/j.lfs.2017.11.019

De Moura, Roberto Soares; Pires, Karla Maria Pereira; Ferreira, Thiago Santos; *et al.* Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 4, p. 855–863, 2011.

De Moura, Roberto S.; Resende, Ângela Castro. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açai, an Amazon Plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 68, n. 1, p. 19–26, 2016.

De Oliveira, Paola Raquel B.; Da Costa, Cristiane A.; De Bem, Grazielle F.; *et al.* *Euterpe oleracea* Mart. -Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.

De Oliveira, Paola Raquel Braz; Da Costa, Cristiane Aguiar; De Bem, Grazielle Freitas; *et al.* Effects of an Extract Obtained From Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the Components of Metabolic Syndrome Induced in C57BL/6J Mice Fed a High-fat Diet: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 56, n. 6, p. 619–626, 2010.

De Souza, Melina Oliveira; SOUZA E SILVA, Lorena; DE BRITO MAGALHÃES, Cíntia Lopes; *et al.* The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutrition Research*, v. 32, n. 12, p. 976–984, 2012.

Draper, H.H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *In: Methods in Enzymology*. [s.l.]: Elsevier, 1990, v. 186, p. 421–431. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687990861351>> [Acesso em: 26 out. 2021].

Fan, Li; XU, Haiyan; Yang, Rengui; *et al.* Combination of Capsaicin and Capsiate Induces Browning in 3T3-L1 White Adipocytes via Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ/β_3 -Adrenergic Receptor Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 22, p. 6232–6240, 2019.

Fenzl, Anna; Kiefer, Florian W.. "Brown adipose tissue and thermogenesis" *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, vol. 19, no. 1, 2014, pp. 25-37. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0022>

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. [Acesso em: 24 out. 2021].

Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-21. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05015-1. PMID: 6727659.

Fontaine, Danielle A.; Davis, Dawn Belt. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, v. 65, n. 1, p. 25–33, 2016.

Frantz, Eliete Dalla Corte; Crespo-Mascarenhas, Camila; Barreto-Vianna, Andre Rodrigues C.; et al. Renin-Angiotensin System Blockers Protect Pancreatic Islets against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. e67192, 2013.

Frigloet, Maria E.; Torres, Nimbe; Tovar, Armando R. The renin–angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 12, p. 2003–2015, 2013.

Gallori, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; *et al.* Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). *Chromatographia*, v. 59, n. 11–12, 2004. Disponível em: <<http://springerlink.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1365/s10337-004-0305-x>>. Acesso em: 26 out. 2021.

Gallou-Kabani, C.; Junien, C. Nutritional Epigenomics of Metabolic Syndrome: New Perspective Against the Epidemic. *Diabetes*, v. 54, n. 7, p. 1899–1906, 2005.

Gallou-Kabani, Catherine; VIGÉ, Alexandre; GROSS, Marie-Sylvie; *et al.* C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome*. *Obesity*, v. 15, n. 8, p. 1996–2005, 2007.

Gao Z, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation on multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* 2014;18(8): 2024-2034

Gharanei, S., Shabir, K., Brown, J. E., Weickert, M. O., Barber, T. M., Kyrou, I., & Randeve, H. S. (2020). Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. *Cells*, 9(11), 2489. doi:10.3390/cells9112489

Hardie DG. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. *Diabetes*. 2013;62:2164–2172

Hatia, S.; Septembre-Malaterre, A.; Le Sage, F.; *et al.* Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radical Research*, v. 48, n. 4, p. 387–401, 2014.

Heeren, Joerg; Scheja, Ludger. Brown adipose tissue and lipid metabolism: Current Opinion in Lipidology, v. 29, n. 3, p. 180–185, 2018.

Heinrich, Michael; Dhanji, Tasleem; Casselman, Ivan. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters*, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

ICTB – Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos
<<https://www.ictb.fiocruz.br/content/c57bl6j-inbred>>. [Acesso em 26 ago. 2020]

Itoh, Michiko; Suganami, Takayoshi; Hachiya, Rumi; *et al.* Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. *International Journal of Inflammation*, v. 2011, p. 1–8, 2011.

Jeon, S.-M. (2016). Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(7), e245–e245. doi:10.1038/emm.2016.81

Jiang, Shu-Zhong; Lu, Wen; Zong, Xue-Feng; *et al.* Obesity and hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 12, n. 4, p. 2395–2399, 2016.

Karise, Iara; Bargut, Thereza Cristina; Del Sol, Mariano; *et al.* Metformin enhances mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipocytes of mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 111, p. 1156–1165, 2019.

Lee, J., Ellis, J. M., & Wolfgang, M. J. (2015). Adipose Fatty Acid Oxidation Is Required for Thermogenesis and Potentiates Oxidative Stress-Induced Inflammation. *Cell Reports*, 10(2), 266–279. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.023

Lee, MS; Shin, Y; Jung, S; Kim, Y. Effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and mitochondrial biogenesis in brown adipose tissues of diet-induced obese mice. *Food Nutr Res.* 2017;61(1):1325307. Published 2017 May 26. doi:10.1080/16546628.2017.1325307

Levine, Rodney L.; Garland, Donita; Oliver, Cynthia N.; *et al.* [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *In: Methods in Enzymology*. [s.l.]: Elsevier, 1990, v. 186, p. 464–478. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/007668799086141H>>. [Acesso em: 26 out. 2021].

Maliszwska, K; Kretowski, A.A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,1530. <https://doi.org/10.3390/ijms22041530>

Matheus, Maria Eline; Fernandes, Sidnei Bessa de Oliveira; Silveira, Cristiane Silva; *et al.* Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p. 291–296, 2006.

McArdle, Maeve A.; Finucane, Orla M.; Connaughton, Ruth M.; *et al.* Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, v. 4, 2013. Disponível em:
<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00052/abstract>>. [Acesso em: 24 out. 2021].

- McNeill, B.T., Morton, N.M.; Stimson, R.H. (2020) Substrate Utilization by Brown Adipose Tissue: What's Hot and What's Not? *Front. Endocrinol.* 11:571659. doi: 10.3389/fendo.2020.571659
- Miranda, Carolline Santos; Silva-Veiga, Flavia; Martins, Fabiane Ferreira; *et al.* PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition*, v. 78, p. 110791, 2020.
- Omran, F.; Christian, M. (2020) Inflammatory Signaling and Brown Fat Activity. *Front. Endocrinol.* 11:156. doi: 10.3389/fendo.2020.00156
- Ouellet, Véronique; Labbé, Sébastien M.; Blondin, Denis P.; *et al.* Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 2, p. 545–552, 2012.
- Pan, H., Gao, Y., & Tu, Y. (2016). Mechanisms of Body Weight Reduction by Black Tea Polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1659. doi:10.3390/molecules21121659
- Park, H., He, A., & Lodhi, I. J. (2019). Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1016/j.tem.2019.07.020
- Pollard, Alice E.; Carling, David. Thermogenic adipocytes: lineage, function and therapeutic potential. *Biochemical Journal*, v. 477, n. 11, p. 2071–2093, 2020.
- Popov, Lucia-Doina. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, 2020.
- Queiroz, Jean César Farias de; Alonso-Vale, Maria Isabel Cardoso; Curi, Rui; *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 5, p. 582–594, 2009.
- Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Feb 15;402:86-94. doi: 10.1016/j.mce.2014.12.027. Epub 2015 Jan 7. Erratum in: *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Sep 15;413():249. PMID: 25576856.
- Roberts-Toler, C., O'Neill, B. T., & Cypess, A. M. (2015). Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity*, 23(9), 1765–1770. doi:10.1002/oby.21134
- Rocha, A.P.M.; Carvalho, L.C.R.M.; Sousa, M.A.V.; *et al.* Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, v. 46, n. 2, p. 97–104, 2007.
- Rocha, A.P.M.; Resende, A.C.; Souza, M.A.V.; *et al.* Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *Journal of Pharmacology and Toxicology*, v. 3, n. 6, p. 435–448, 2008.

Romão, Matheus Henrique; De Bem, Grazielle Freitas; Santos, Izabelle Barcellos; *et al.* Açai (Euterpe oleracea Mart.) seed extract protects against hepatic steatosis and fibrosis in high-fat diet-fed mice: Role of local renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation. *Journal of Functional Foods*, v. 65, p. 103726, 2020.

Romero, Carla Eduarda Machado; Zanesco, Angelina. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 1, p. 85–91, 2006.

Rosen, Evan D.; Spiegelman, Bruce M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, v. 156, n. 1–2, p. 20–44, 2014.

Rosendahl, Ann H.; Bergqvist, Malin; Lettiero, Barbara; *et al.* Adipocytes and Obesity-Related Conditions Jointly Promote Breast Cancer Cell Growth and Motility: Associations With CAP1 for Prognosis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, p. 689, 2018.

Rui L. Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1281-1306. Published 2017 Sep 12. doi:10.1002/cphy.c170001

Sampath, Srihari C.; Sampath, Srinath C.; Bredella, Miriam A.; *et al.* Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology*, v. 280, n. 1, p. 4–19, 2016.

Santacruz-Hidalgo, Francisco & Viscarra-Sanchez, Eliana. Hormonal signaling factors produced by brown adipose tissue as regulators of metabolism of carbohydrates and lipids. <Disponível em: https://www.revistabionatura.com/files/2019_kplwq2zk.04.01.11.pdf> doi: 10.21931/RB/2019.04.02.11 [Acesso em 03 jan 2022].

Santos, Izabelle Barcellos; De Bem, Grazielle Freitas; Da Costa, Cristiane Aguiar; *et al.* Açai seed extract prevents the renin-angiotensin system activation, oxidative stress and inflammation in white adipose tissue of high-fat diet–fed mice. *Nutrition Research*, v. 79, p. 35–49, 2020.

Scheele, Camilla; Wolfrum, Christian. “Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism.” *Endocrine reviews* vol. 41,1 (2020): 53–65. doi:10.1210/edrev/bnz007

Segura, Julian; Ruilope, Luis M.; Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. Published by Cambridge University Press: 01 October 2007. <https://doi.org/10.1017/S136898000700064X>. [Acesso em: 01 dez 2019].

Singh R.; Barrios A.; Dirakvanda G.; Pervins S. Human Brown Adipose Tissue and Metabolic Health: Potential for Therapeutic Avenues. *Cells*. 2021 Nov 5;10(11):3030. doi: 10.3390/cells10113030. PMID: 34831253; PMCID: PMC8616549.

Singleton V.L.; Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158

Shabalina, I. G., Vrbacký, M., Pecinová, A., Kalinovich, A. V., Drahotka, Z., Houštěk, J., ... Nedergaard, J. (2014). ROS production in brown adipose tissue mitochondria: The question of UCP1-dependence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(12), 2017–2030. doi:10.1016/j.bbabi.2014.04.005

Shimizu I, Aprahmiant T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolau KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2099-112. doi: 10.1172/JCI71643. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24713652; PMCID: PMC4001539.

Shinde, Abhijit Babaji; Song, Anying; WANG, Qiong A. Brown Adipose Tissue Heterogeneity, Energy Metabolism, and Beyond. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 651763, 2021.

Sohn, J. H.; Lee, Y. K.; Han, J. S.; Jeon, Y. G.; Kim, J. I., Choe, S. S., ... Kim, J. B. (2018). Perilipin 1 (Plin1) deficiency promotes inflammatory responses in lean adipose tissue through lipid dysregulation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.RA118.003541. doi:10.1074/jbc.ra118.003541

Tabuchi, Chihiro; Sul, Hei Sook. Signaling Pathways Regulating Thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 595020, 2021.

TERJUNG, Ronald (Org.). *Comprehensive Physiology*. 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/cphy>>. Acesso em: 24 out. 2021.

Tran, Thien T.; Kahn, C. Ronald. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 6, n. 4, p. 195–213, 2010.

Trindade, Patricia Leticia; Soared, Elaine Dos Ramos; Monteiro, Elisa Bernardes; et al. Antiadipogenic effects of açai seed extract on high fat diet-fed mice and 3T3-L1 adipocytes: A potential mechanism of action. *Life Sciences*, v. 228, p. 316–322, 2019.

Unser, AM; Tian, Y; Xia, Y. Opportunities and challenges in three-dimensional brown adipogenesis of stem cells. *Biotechnol Adv.* 2015 Nov 1;33(6 Pt 1):962-79. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.005. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26231586; PMCID: PMC4562467.

V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. *Sociedade Brasileira de Cardiologia* • ISSN-0066-782X • Volume 101, Nº 4, Supl. 1, Outubro 2013 <Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2013/V_Diretriz_Brasileira_de_Dislipidemias.pdf> Acesso em 01 jan 2022.

Van der Vaart, J.I.; Boon, M.R.; Houtkooper, R.H. The Role of AMPK Signaling in Brown Adipose Tissue Activation. *Cells* 2021, 10, 1122. <https://doi.org/10.3390/cells10051122>

Vásquez-Vela, M. E. F., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, 39(8), 715–728. doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005

Vigilância para Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) <Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/relatorio-vigitel-2020-original.pdf>> [Acesso em: 31 dez 2021].

Weisinger, Richard S.; Stanley, Tracy K.; Begg, Denovan P.; *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiology & Behavior*, v. 98, n. 1–2, p. 192–197, 2009.

Wood dos Santos, T., Cristina-Pereira, Q., Teixeira, L., Gambero, A., A. Villena, J., & Lima Ribeiro, M. (2018). Effects of Polyphenols on Thermogenesis and Mitochondrial Biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2757. doi:10.3390/ijms19092757

World Health Organization. Global health observatory: Overweight and obesity . <Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> [Acesso em 31 dez 2021].

World Health Organization. Global health observatory: Overweight and obesity. <Disponível em: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/> [Acesso em 12 de nov 2019].

World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva: WHO; 1998.

Yamaguchi, Klenicy Kazumy de Lima; Pereira, Luiz Felipe Ravazi; Lamarão, Carlos Victor; *et al.* Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, v. 179, p. 137–151, 2015.

Ye, Yuqing; Liu, Hailan; Zhang, Feng; *et al.* mTOR signaling in Brown and Beige adipocytes: implications for thermogenesis and obesity. *Nutrition & Metabolism*, v. 16, n. 1, p. 74, 2019.

Yoneshiro, Takeshi; Kaede, Ryuji; Nagaya, Kazuki; *et al.* Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract induces uncoupling protein 1 expression in brown fat and protects mice against diet-induced obesity, inflammation, and insulin resistance. *Nutrition Research*, v. 58, p. 17–25, 2018.

Zhang, H., Hao, Y., Wei, C., Yao, B., Liu, S., Zhou, H., ... Wu, Y. (2019). Chinese medicine Jinlida granules improve high-fat-diet induced metabolic disorders via activation of brown adipose tissue in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114, 108781. doi:10.1016/j.biopha.2019.108781

Zhang J.; Lin X.; Xu J.; Tang F. Apelin-13 reduces oxidative stress induced by uric acid via downregulation of renin-angiotensin system in adipose tissue. *Toxicol Lett.* 2019 May 1;305:51-57. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.01.014. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30710622.

Zhang Z, Yang D, Xiang J, *et al.* Non-shivering Thermogenesis Signalling Regulation and Potential Therapeutic Applications of Brown Adipose Tissue. *Int J Biol Sci.* 2021;17(11):2853-2870. Published 2021 Jul 13. doi:10.7150/ijbs.60354

Zhou Y, Li H and Xia N (2021) The Interplay Between Adipose Tissue and Vasculature: Role of Oxidative Stress in Obesity. *Front. Cardiovasc. Med.* 8:650214. doi: 10.3389/fcvm.2021.650214

Zingaretti, Maria Cristina; Crosta, Francesca; Vitali, Alessandra; *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 9, p. 3113–3120, 2009.

ANEXO – Declaração do Comitê de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais

Universidade do Estado do Rio de Janeiro Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeitos do extrato de euterpe oleracea mart. (açai) na indução da termogênese no tecido adiposo marrom de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**", registrado com o nº 004/2021, sob a responsabilidade de **Ângela de Castro Resende** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

(CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 02/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/02/2025
Espécie / linhagem / raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	60
Peso / Idade	21 gramas / 30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 02 de fevereiro de 2021.

Dr. Alex C. Manhães
Professor Associado
33303-9
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Dra. Patricia C. Lisboa
Professora AssociadaMatr.
Matr. 34765-8
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ