



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

Carolline Santos Miranda

**Efeitos do tratamento com tesaglitazar, pioglitazona e WY-14643
no eixo intestino-adiposo em camundongos alimentados com
dieta hiperlipídica**

Rio de Janeiro

2024

Carolline Santos Miranda

Efeitos do tratamento com tesaglitazar, pioglitazona e WY-14643 no eixo intestino-adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

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

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

Rio de Janeiro

2024

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

M672 Miranda, Caroline Santos.

Efeitos do tratamento com Tesaglitazar, Pioglitazona e WY-14643 no eixo intestino-adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Caroline Santos Miranda. – 2024.

119 f.

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

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

1. PPAR gama – Agonistas – Teses. 2. Tecido adiposo branco – Efeitos dos fármacos – Teses. 3. Tecido Adiposo Marrom – Efeitos dos fármacos – Teses. 4. Obesidade – Imunologia. I. Mello, Vanessa de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.39

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Carolline Santos Miranda

Efeitos do tratamento com tesaglitazar, pioglitazona e WY-14643 no eixo intestino-adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

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

Aprovada em 22 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Erica Patricia Garcia de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra Eliete Dalla Corte Frantz

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra Isabele Bringhenti Sarmento

Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mulheres da minha família pelo exemplo de força e amor que
são pra mim

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, que é minha maior referência de amor, lealdade e força. Sem ela e sua dedicação constante nada seria possível. Ao meu pai, pelo carinho e cuidado com a nossa família.

A minha tia/dinda Sandra, uma das minhas maiores incentivadoras, me sinto grata pelo seu amor incondicional. Obrigada por investir na minha educação e nos meus sonhos. Aprendo com você todos os dias.

A minha avó Norma, que se fez presente desde a minha infância com seu amor e afeto. Ao meu avô Antônio, que mesmo não estando presente fisicamente, me ensinou que desistir nunca é a solução.

A minha irmã, por vibrar pelas minhas conquistas e por ser minha companheira, a vida é mais feliz por ter você ao meu lado. E a Nanda, que fez florescer em mim sentimentos ainda desconhecidos. Aprendi mais sobre o amor e me sinto honrada em partilhar a vida com ela.

Aos meus colegas de laboratório, pelos ensinamentos e pela ajuda, nada seria possível sem o auxílio que me deram. A minha dupla Flávia, que me ajudou e continua me ajudando em todos os momentos. Obrigada por ter se mantido ao meu lado ao longo da pandemia para execução desse projeto. Aos orientados da Vanessa (Vanessetes), pela parceria e por compartilharem não só a orientadora comigo, mas também diversos sonhos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e a Prof^a. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda, por me receberem no LMMC como aluna de iniciação científica e monitora, e por contribuírem com o meu crescimento e com o desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos e funcionários da UERJ por todo suporte oferecido.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Vanessa Souza-Mello, que me acompanhou desde a iniciação científica, nesses últimos 10 anos aprendi com você não só sobre pesquisa, mas como ser uma pessoa empática. Você é um exemplo de professora/orientadora e me sinto honrada em ter você como “mãe científica”.

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

Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.

Santo Agostinho

RESUMO

MIRANDA, Carolline Santos. **Efeitos do tratamento com Tesaglitazar, Pioglitazona e WY-14643 no eixo intestino-adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**. 2024. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Objetivo: Avaliar o papel do tesaglitazar (agonista PPAR α/γ), pioglitazona (agonista PPAR γ) e WY-14643 (agonista PPAR α) no controle da endotoxemia, *browning* do tecido adiposo branco e *whitening* do tecido adiposo marrom em camundongos alimentados com excesso de gordura saturada. Métodos: Camundongos C57BL/6 machos receberam dieta controle (C, 10% de lipídios) ou dieta rica em gordura (HF, 50% de lipídios) por 12 semanas. Em seguida, o grupo HF foi dividido para receber os tratamentos durante quatro semanas: HF γ (pioglitazona, 10 mg/kg), HF α (WY-14643, 3,5 mg/kg) e HF $\alpha\gamma$ (tesaglitazar, 4 mg/kg). Resultados: O grupo HF apresentou excesso de peso, intolerância oral à glicose, disbiose intestinal, permeabilidade intestinal alterada e endotoxemia, culminando no *whitening* do tecido adiposo marrom interescapular (TAMi). A regulação negativa da sinalização LPS-Tlr4 sustentou a redução da inflamação e melhorou o metabolismo lipídico no TAMi no grupo HF $\alpha\gamma$, o único a mostrar massa corporal (MC) normalizada e aumento do gasto energético. Além disso, o tesaglitazar mitigou a resistência à insulina e induziu o *browning* do tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) com aumento da ativação da termogênese dependente e independente de UCP1, com melhora do metabolismo mitocondrial para apoiar o fenótipo de adipócitos beges. Conclusão: O sinergismo PPAR α/γ tratou a obesidade, melhorando o eixo intestino-tecido adiposo, onde a microbiota intestinal restaurada e a permeabilidade intestinal restabelecida controlaram a endotoxemia e reverteram o *whitening* do TAMi e promoveram o *browning* do TABs através da termogênese favorecida, produzindo normalização da MC e da sensibilidade à insulina. Os resultados colocam o sinergismo PPAR α/γ como um alvo potencial para o tratamento da obesidade, com possíveis aplicações clínicas.

Palavras-chave: Tecido adiposo. Obesidade. PPAR. Whitening. Browning.

ABSTRACT

MIRANDA, Caroline Santos. *Effects of treatment with tesaglitazar, pioglitazone and WY-14643 on the intestine-adipose axis in high-fat diet-fed mice*. 2024. 119 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Objective: To evaluate the role of tesaglitazar (agonist PPAR α/γ), pioglitazone (agonist PPAR γ), and WY-14643 (agonist PPAR α) in controlling endotoxemia, white adipose tissue browning, and whitening of brown adipose tissue in mice fed excess saturated fat. **Methods:** Male C57BL/6 mice received a control diet (C, 10% lipids) or high-fat diet (HF, 50% lipids) for 12 weeks. Then, the HF group was divided to receive treatments for four weeks: HF γ (pioglitazone, 10 mg/kg), HF α (WY-14643, 3.5 mg/kg), and HF $\alpha\gamma$ (tesaglitazar, 4 mg/kg). **Results:** The HF group presented excess weight, oral glucose intolerance, intestinal dysbiosis, altered intestinal permeability, and endotoxemia, culminating in the whitening of the interscapular brown adipose tissue (iBAT). Downregulation of LPS-Tlr4 signaling supported the reduction of inflammation and improved lipid metabolism in iBAT in the HF $\alpha\gamma$ group, the only one to show normalized body mass (BM) and increased energy expenditure. Tesaglitazar also mitigated insulin resistance and induced subcutaneous white adipose tissue (sWAT) browning with increased activation of UCP1-dependent and -independent thermogenesis, with improved mitochondrial metabolism to support the beige adipocyte phenotype. **Conclusion:** PPAR α/γ synergism treated obesity, improving the intestine-adipose tissue axis, where the restored intestinal microbiota and reestablished intestinal permeability controlled endotoxemia and reversed iBAT whitening and promoted WATs browning through favored thermogenesis, producing normalization of BM and insulin sensitivity. The results place PPAR α/γ synergism as a potential target for obesity treatment, with possible clinical applications.

Keywords: Adipose tissue. Obesity. PPAR. Whitening. Browning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Obesidade e suas associações	20
Figura 2 – Obesidade e endotoxemia	30
Figura 3 – Tecido adiposo e suas variações	39
Figura 4 – Mecanismo de trans-ativação dos PPARs.....	41
Figura 5 – Desenho experimental.....	49
Figura 6 – Evolução da massa corporal.....	60
Figura 7 – Ingestão energética.....	60
Figura 8 – Teste oral de tolerância à glicose	62
Figura 9 – Gasto energético e quociente respiratório	64
Figura 10 – Genes de rRNA 16S da microbiota intestinal	65
Figura 11 – Expressão relativa de RNA mensageiro de genes relacionadas às junções oclusivas no intestino	67
Figura 12 – Imunomarcção para ocludina	67
Figura 13 – Análise plasmática do LPS	68
Figura 14 – Ultraestrututa do íleo.....	69
Figura 15 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Tlr4</i> , <i>Lbp</i> e <i>Nlrp3</i> no TAMi	70
Figura 16 – Histologia e estereologia do TAMi.....	71
Figura 17 – Imunofluorescência para UCP1 no TAMi e temperatura corporal	73
Figura 18 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Atf4</i> , <i>Cidea</i> , <i>Vegfa</i> , <i>PPAR</i> <i>e Cidec</i> no TAMi.....	75
Figura 19 – Imunohistoquímica para VEGFA e CIDEC no TAMi.....	76
Figura 20 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Pgc1a</i> , <i>Ppara</i> , <i>Ucp1</i> , <i>Ucp3</i> , <i>Raf3</i> e <i>Bmp8b</i> no TAMi	78
Figura 21 – Resumo dos principais achados do intestino e TAMi.....	79
Figura 22 – Distribuição de gordura e triacilglicerol plasmático	80
Figura 23 – Histologia do TABs e área seccional média de adipócitos	81
Figura 24 – Imunohistoquímica para UCP1 e PARK2 no TABs.....	82
Figura 25 – Imunodensidade para UCP1 e PARK2 no TABs.....	82
Figura 26 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Ppara</i> , <i>Ucp1</i> , <i>Bmp8b</i> e <i>Prdm16</i> no TABs	84

Figura 27 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Slc6a8</i> , <i>Serca2b</i> e <i>Ryr2</i> no TABs	85
Figura 28 – Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes <i>Drp1</i> , <i>Fis-1</i> e <i>Pink1</i> no TABs	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição nutricional das dietas experimentais.....	50
Quadro 2 – Detalhamento dos primers utilizados	57
Quadro 3 – Análises plasmáticas.....	63
Quadro 4 – Resumo dos principais resultados	95

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AGs	Ácidos graxos
AGLs	Ácidos graxos livres
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASC	Área sob a curva do TOTG
ASM	Área seccional média
ATF4	Ativando fator de transcrição 4
ATP	Adenosina trifosfato
BMP8B	Proteína morfogenética óssea 8b
C	Grupo alimentado com dieta controle
CD137	Cluster de diferenciação 137
CPT1	Carnitina palmitol transferase 1
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DIU	Obesidade induzida por dieta
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FIS1	Fissão mitocondrial 1
GE	Gasto energético
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica
HF γ	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica tratado com pioglitazona
HF α	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica tratado com WY-14643
HF $\alpha\gamma$	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica tratado com tesaglitazar
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
Interleucina 1 β	IL1 β
Interleucina 6	IL6
Interleucina 8	IL8
JAM-A	Molécula de adesão juncional-A
Kcal	Quilocaloria
LBP	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Massa corporal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MYF5	Fator miogênico 5
NLRP3	Domínio pirin da família NLR contendo 3
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor 1 do ativador de plasminogênio
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGC1 α	Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PINK1	Quinase 1 induzida por PTEN
PKA	Proteína cinase A dependente de AMPc
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PPAR α	Receptores ativado por proliferador de peroxissoma alfa
PPAR γ	Receptores ativado por proliferador de peroxissoma gama
PPREs	Elementos responsivos ao PPAR
PRDM16	Domínio PR contendo 16
q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNs	Receptores nucleares
RNA _m	RNA mensageiro
R β 3A	Receptor beta-3 adrenérgico
RXR	Receptor X retinóide
RYR2	Receptor ryanodina 2
SERCA2	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco/endoplasmático
SM	Síndrome metabólica
SLC6A8	Família de transportadores de soluto 6 Membro 8
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAB _v	Tecido adiposo branco visceral
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TAMi	Tecido adiposo marrom interescapular

TJs	Tight junctions
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
TZDs	Tiazolidinedionas
UCP1	Proteína desacopladora 1
UCP3	Proteína desacopladora 3
VCO ₂	Volume de gás carbônico produzido
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VEGFA	Fator de crescimento endotelial A
VO ₂	Volume de oxigênio consumido
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1.	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	Obesidade	20
1.2	C57BL/6 e indução da obesidade	22
1.3	Intestino	23
1.3.1	<u>Morfologia do intestino delgado</u>	24
1.3.2	<u>Morfologia do intestino grosso</u>	25
1.3.3	<u>Microbiota intestinal</u>	26
1.3.4	<u>Disbiose intestinal</u>	28
1.4	Tecido adiposo	30
1.5	Tecido adiposo branco	31
1.5.1	<u>Browning</u>	33
1.6	Tecido adiposo marrom	35
1.6.1	<u>Whitening</u>	37
1.7	PPARs	39
1.7.1	<u>PPARα</u>	41
1.7.2	<u>PPARγ</u>	43
1.7.3	<u>PPARα/γ</u>	45
2.	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3.	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Animais e dieta	48
3.2	Massa corporal e ingestão alimentar	50
3.3	Teste oral de tolerância a glicose	51
3.4	Calorimetria indireta	51
3.5	Termografia	51
3.6	Eutanásia	52
3.7	Análise plasmática	52
3.8	Histologia	53

3.9	Estereologia.....	53
3.10	Imunofluorescência e imunohistoquímica.....	54
3.11	Microscopia eletrônica.....	55
3.12	Amplificação por PCR 16 rDNA.....	55
3.13	PCR quantitativo em tempo real.....	56
3.14	Análise plasmática.....	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Indução do sobrepeso e resistência à insulina.....	59
4.1.1	<u>Massa corporal e ingestão alimentar.....</u>	59
4.1.2	<u>Metabolismo de carboidratos.....</u>	61
4.1.3	<u>Gasto energético e quociente respiratório.....</u>	63
4.2	Intestino.....	65
4.2.1	<u>Relação <i>Firmicutes/Bacteroidates</i>.....</u>	65
4.2.2	<u>Expressão gênica e proteica das junções oclusivas no intestino e concentração plasmática de LPS.....</u>	65
4.2.3	<u>Ultraestrutura do intestino grosso (ceco)</u>	68
4.3	Tecido adiposo marrom.....	69
4.3.1	<u>Expressão gênica relacionada à endotoxemia no TAMi.....</u>	69
4.3.2	<u>Histologia e estereologia do TAMi.....</u>	70
4.3.3	<u>Imunofluorescência e termografia.....</u>	73
4.3.4	<u>Expressão gênica e proteica relacionada ao metabolismo e atividade endócrina do TAMi.....</u>	73
4.3.5	<u>Expressão gênica relacionada à atividade termogênica.....</u>	76
4.4	Tecido adiposo branco.....	79
4.4.1	<u>Distribuição de gordura e triacilglicerol plasmático.....</u>	79
4.4.2	<u>Histologia, estereologia e imunohistoquímica no TABs.....</u>	80
4.4.3	<u>Expressão gênica relacionada à atividade termogênica dependente de UCP1.....</u>	83
4.4.4	<u>Expressão gênica relacionada à atividade termogênica independente da UCP1....</u>	83
4.4.5	<u>Expressão gênica relacionada à disfunção mitocondrial.....</u>	85
5.	DISCUSSÃO.....	87
	CONSIDERAÇÃO FINAIS E CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO A - Comitê de Ética.....	113

ANEXO B - Publicações de artigos científicos referentes aos resultados do doutorado.....	114
ANEXO C - Publicação de artigo científico de primeira autoria durante o doutorado.....	115
ANEXO D - Publicações de artigos científicos em colaboração durante o doutorado.....	116
ANEXO E - Participação da elaboração de um capítulo de livro.....	119

INTRODUÇÃO

O consumo de gordura, antes visto como determinante na gênese da obesidade pela maior densidade energética, tem sido avaliado do ponto de vista qualitativo (1, 2). Nesse contexto, o consumo excessivo de gordura saturada (de origem animal) apresenta maior relação com o excesso de MC e comorbidades (2, 3). Além disso, o consumo excessivo de gordura saturada conduz a alterações na composição da microbiota intestinal (disbiose), resistência à insulina, inflamação de baixo grau (metainflamação), aumento da adiposidade com disfunção do tecido adiposo marrom (TAM) (*whitening*) e redução da termogênese (4, 5).

O tecido adiposo (TA) exerce um papel central no balanço energético e, portanto, na gênese da obesidade (6). Os adipócitos são as únicas células que possuem especialização para armazenar lipídeos sem comprometer a sua integridade funcional. Pelo menos três tipos de adipócitos metabolicamente distintos são encontrados em humanos: adipócitos brancos, beges e marrons (7). Ao contrário dos adipócitos brancos, que depositam energia extra como triacilglicerol (TAG), os adipócitos beges e marrons clássicos são diferenciados por sua capacidade única de dissipar energia mitocondrial sob forma de calor por meio da proteína desacopladora 1 (UCP1) (8, 9).

Na vigência da obesidade, os adipócitos marrons podem sofrer um “embranquecimento” (chamado de *whitening*), a partir de uma rarefação da vascularização atrelada ao menor estímulo adrenérgico e inflamação, os quais passam a exibir fenótipo de adipócito branco com baixa expressão de UCP1 e reduzida capacidade termogênica (10, 11).

Por outro lado, o fenômeno *browning* torna o adipócito branco (unilocular, com baixa expressão de UCP1) num adipócito bege (multilocular, com alta expressão de UCP1) (12). Apesar de algumas incertezas e controvérsias em torno da identidade celular, recrutamento e transdiferenciação bidirecional da gordura bege, o significado metabólico dos adipócitos marrons clássicos e beges na manutenção da homeostase energética foi estabelecido por unanimidade na última década (13, 14).

O trato digestório é povoado por diversos microrganismos, principalmente por bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que são influenciadas pela qualidade da dieta (15). O excesso de gordura saturada ou de frutose aumenta a proporção de bactérias

que possuem lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina, na parede celular (16). Altos níveis de LPS induzem inflamação de baixo grau, que compromete a integridade da mucosa por alterações nas proteínas estruturais das zônulas de oclusão e aumento da permeabilidade intestinal, resultando em migração do LPS para os demais tecidos (15).

A endotoxemia, altos níveis circulantes de LPS, pode reduzir a formação de tecido adiposo bege (*browning*) e afetar o funcionamento do TAM (*whitening*), reduzindo a termogênese adaptativa por ativação do eixo LPS-TLR4 (receptor do tipo toll 4), com consequente estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial induzidos pela inflamação (17, 18).

Diante deste cenário, a utilização de fármacos que revertam a disbiose e induzam a termogênese e aumento do gasto energético, com resultante aparecimento de *browning* do tecido adiposo branco (TAB) e redução do *whitening* do TAM advindo do excesso dietético de gordura saturada, são pertinentes para o controle da obesidade e de comorbidades como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças cardiovasculares (DCV).

Nesse contexto, os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição que se encontram no entrelaçamento de várias vias metabólicas (19). A ativação farmacológica da isoforma alfa (PPAR-alfa) promove redução da MC, alívio da resistência à insulina, formação de adipócitos beges e aumento da atividade termogênica (20).

Recentemente, a deleção do PPAR-alfa promoveu disbiose intestinal e inflamação do intestino grosso em camundongos (21), ao passo que a ativação do PPAR-alfa reverteu a disfunção dos adipócitos marrons (*whitening*) com aumento da termogênese adaptativa em camundongos alimentados com excesso de gordura saturada ou frutose (5).

Em contrapartida, a ativação total da isoforma gama (PPAR-gama) produz efeitos adversos no TA e no fígado, com hipertrofia dos adipócitos brancos e aumento do percentual de esteatose hepática, apesar do marcante aumento da sensibilidade à insulina (22, 23). Contudo, a ativação parcial do PPAR-gama pelo tesaglitazar (agonista duo PPAR-alfa/gama) induziu o *browning* e aumento do gasto energético (24). No entanto, não há na literatura nenhum estudo avaliando os efeitos do tesaglitazar na microbiota intestinal e possíveis efeitos benéficos no TAM e TAB.

A hipótese do presente trabalho é que a ativação isolada ou em associação do PPAR α e do PPAR γ module a microbiota intestinal para um perfil que reduza a produção

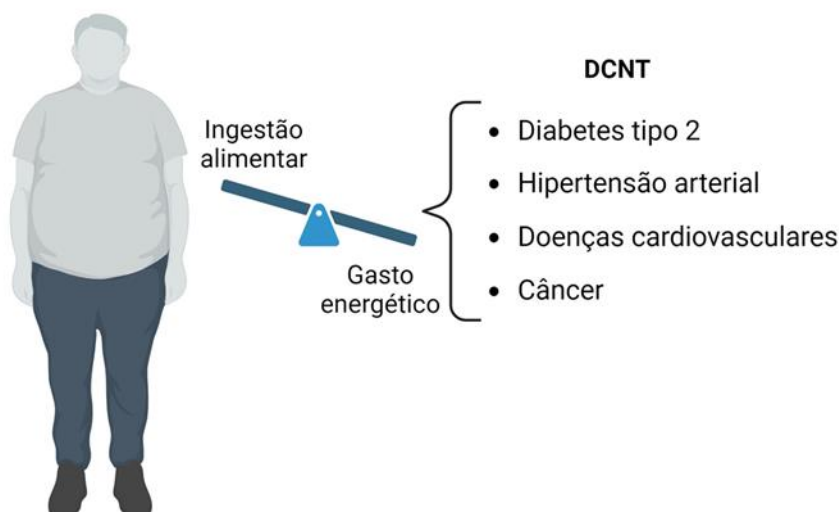
de LPS conduzindo ao *browning* do TAB e reversão do *whitening* do TAM em camundongos alimentados com dieta rica em gordura saturada.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade é considerada um agravo de caráter multifatorial decorrente de balanço energético positivo que favorece o acúmulo de gordura e está associada a riscos para a saúde devido à sua relação com complicações metabólicas (25). Já existe uma descrição aprofundada na literatura que o excesso de MC e obesidade contribuem para o aumento da mortalidade por sua associação com doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como DM2 (26), DCV (27), câncer (28), e hipertensão (29) (Figura 1).

Figura 1 – Obesidade e suas associações



Legenda: Associação entre a obesidade e doenças crônicas não transmissíveis
Fonte: A autora, 2023. Feita com Biorender (www.biorender.com)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de um bilhão de adultos, em todo o mundo, se encontram acima do peso - destes, 500 milhões são considerados obesos (30). No Brasil, os dados relativos ao crescimento da prevalência de sobrepeso e obesidade são igualmente preocupantes. O último Vigitel Brasil (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico) realizado

em 2023 pelo Ministério da Saúde, mostrou que a frequência de excesso de peso em adultos foi de 61,4% e a frequência de adultos obesos foi de 24,3% (31).

A elevada síntese de adipocinas (citocinas), a modificação da microbiota intestinal e o aumento as espécies reativas de oxigênio, presentes em indivíduos obesos, geram dano celular ou tecidual, favorecendo o desenvolvimento das DCNTs (32, 33). Os depósitos de TA nessa condição apresentam maior secreção de adipocinas pró-inflamatórias, caracterizando a obesidade como uma inflamação crônica que causa grande impacto em diversas funções corporais (32, 34).

Vários parâmetros de avaliação são utilizados com o intuito de determinar de forma adequada quais pessoas com sobrepeso ou obesidade correm risco de sérias consequências para a saúde (35). As formas de avaliação facilmente aplicáveis são as medidas antropométricas, como a mensuração da MC total, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril ou cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) (36).

O IMC é o indicador mais utilizado para avaliar o grau de obesidade, tendo como principal vantagem a possibilidade de ser interpretado em correlação com dados de referência nacionais dos níveis de adiposidade, morbidade, mortalidade em adultos (37). O IMC é calculado dividindo o peso de um indivíduo em quilogramas pela sua altura em metros ao quadrado (kg/m^2).

No entanto, o IMC sozinho não fornece informações sobre a composição corporal e respectiva contribuição de massa livre de gordura ou massa gorda para o peso corporal, sugerindo a utilização de indicadores adicionais para avaliar adiposidade central em pessoas com sobrepeso e obesidade. A circunferência da cintura é um indicador do TA visceral, mas também inclui gordura abdominal subcutânea que diminui sua sensibilidade para prever complicações relacionadas à obesidade (36).

Nas últimas décadas, a população vem aumentando o consumo de alimentos com elevada densidade energética, alta palatabilidade, baixo poder sacietógeno e de fácil absorção e digestão. Esses atributos favorecem o aumento da ingestão alimentar e, portanto, contribuem para o desequilíbrio energético (38). Prevenir precocemente a obesidade se torna muito importante para a promoção da saúde e redução de morbimortalidade, não só por ser um fator de risco importante para diversas doenças, mas também por interferir na expectativa e qualidade de vida (30).

Muitas estratégias de perda de peso têm sido testadas, porém perder peso e mantê-lo é extremamente difícil na maioria dos casos. O emagrecimento está diretamente relacionado ao quadro de balanço energético negativo, caracterizado pela redução na

ingestão alimentar em relação ao gasto energético. O balanço energético positivo causa um desequilíbrio no organismo, ocasionando um estoque de energia em excesso em forma de gordura e causando um aumento da MC total (39, 40).

As atuais estratégias de manejo da obesidade e transtornos relacionados à obesidade são classificadas em três categorias principais: mudanças de estilo de vida, terapia farmacológica e cirurgia bariátrica (41). As modificações do estilo de vida envolvem uma combinação de mudanças comportamentais, dieta e atividade física (42, 43).

Sendo assim, dietas com restrições calóricas e aumento na atividade física diária são as medidas de primeira linha para o tratamento da obesidade, mas exigem um período de meses para obter os primeiros resultados significativos (44). Um planejamento alimentar flexível, que objetive reeducação, geralmente obtém mais sucesso, devendo considerar, além da quantidade de calorias, as preferências alimentares do indivíduo, o aspecto financeiro, o estilo de vida e o requerimento energético para a manutenção da saúde (38).

1.2 C57BL/6 e indução da obesidade

O modelo experimental mais utilizado para estudos em obesidade e síndrome metabólica (SM) envolve a utilização de camundongos da linhagem C57BL/6, que são mais adequados, pois quando alimentados com dieta hiperenergética (que mimetiza as dietas ocidentais), desenvolvem obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão semelhante à de humanos. Esse modelo é conhecido como “obesidade induzida por dieta” (DIO) e é utilizado em larga escala na literatura científica (45).

Estudos já confirmaram que o consumo excessivo de uma dieta rica em gordura saturada leva ao desenvolvimento da obesidade (2), o que promove aumento dos níveis de ácidos graxos (AGs), favorecendo a lipogênese e aumento da lipólise no TAB. Este excedente provoca um acúmulo de gordura ectópica, amplificando diversos efeitos deletérios, como dislipidemias, esteatose hepática, falha na sinalização da insulina, ativação da gliconeogênese e hiperglicemia (46).

Os diferentes modelos experimentais que buscam induzir em animais a obesidade de forma semelhante à humana podem ser classificados, em sua maioria, em modelos

genéticos e induzidos por dieta. Contudo, são raras as causas genéticas como fatores etiológicos da obesidade humana. Sendo assim, o modelo que mais se assemelha à patogênese da obesidade humana é o induzido por dieta, onde se oferece ao animal um aporte calórico maior, através da sobrecarga de macronutrientes (47).

Os lipídeos representam a maior fonte energética, contendo 9 quilocalorias (kcal) por grama em comparação a 4kcal por grama de carboidratos e proteínas, por isso dietas hiperlipídicas são frequentemente utilizadas na tentativa de mimetizar a obesidade em modelos animais, de maneira semelhante à doença humana (48). A densidade energética da dieta hiperlipídica é maior que da dieta padrão utilizada nos grupos controles (49).

Outro fator de grande importância que também pode contribuir para maior adiposidade, independentemente de uma maior ingestão calórica, é o tipo de gordura utilizada na composição da dieta. De acordo com Buettner, R., *et al.*, (50), as gorduras saturada e monoinsaturada são capazes de promover, de forma mais pronunciada a obesidade e resistência à insulina quando comparadas à gordura poli-insaturada. Muitos estudos (51-53) utilizam a banha de porco que é a mais recomendada para a geração de um modelo válido de roedor obeso com alterações metabólicas.

Em camundongos, foi observado que o excesso de gordura saturada induz danos hepáticos e causam redução dos níveis de adiponectina e inflamação no TA (54). Além disso, promovem alterações na microbiota intestinal, pois levam à disbiose e ao aumento da permeabilidade intestinal (4). Dessa forma, ocorre translocação de bactérias e toxinas do lúmen intestinal para o sangue com consequências para termogênese adaptativa e metabolismo hepático (55, 56).

1.3 Intestino

O sistema digestório, desde a cavidade oral, constitui o tubo digestório, formado por quatro segmentos denominados esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso (57). Estes quatro órgãos possuem características histológicas comuns, representadas pelas quatro camadas ou túnicas concêntricas em suas paredes: a mucosa, a submucosa, a muscular e a adventícia ou serosa. Embora esta organização geral seja uniforme ao longo do tubo, os segmentos apresentam variações estruturais diretamente relacionadas com suas atividades funcionais (58).

A mucosa é constituída por um epitélio de revestimento, apoiado sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e por uma camada fina de tecido muscular liso, denominada muscular da mucosa. O epitélio de revestimento invagina-se em direção à lâmina própria e à submucosa, dando origem, respectivamente, às glândulas mucosas e submucosas. Funcionalmente, as glândulas contribuem para aumentar a capacidade secretora e as vilosidades a capacidade absorptiva do tubo digestório (58).

Como a lâmina própria dos intestinos constitui um importante local de respostas imunes, são encontrados nódulos linfáticos e células imunocompetentes dispersas. A submucosa é formada por tecido conjuntivo denso irregular com gânglios nervosos e numerosos vasos sanguíneos de médio calibre, linfáticos e nervos, que se ramificam pela mucosa e pela camada muscular. A muscular está organizada em duas camadas de músculo liso que juntas participam dos movimentos peristálticos. A adventícia é formada de tecido conjuntivo em continuidade com os tecidos adjacentes (58).

O intestino está envolvido em diversos processos do organismo, incluindo: absorção e digestão de nutrientes; modulação imunológica por ser a barreira física e química de conteúdos externos; além de ser o local que contém a maior população de microrganismos do corpo humano, a microbiota intestinal. Camundongos e mosca da fruta *Drosophila melanogaster* são modelos amplamente utilizados para estudar metabolismo intestinal e doenças humanas (59).

1.3.1 Morfologia do intestino delgado

O intestino delgado é um tubo bastante longo, com cerca de seis metros e é dividido em três regiões: duodeno (cerca de 25cm), jejuno (cerca de 2,5m) e íleo (cerca de 3,5m) (60). Nele a digestão é finalizada, e ocorre a absorção de nutrientes (61). O intestino delgado apresenta várias adaptações que aumentam a superfície de absorção: a mucosa e a submucosa formam pregas, o epitélio e o conjuntivo projetam-se nos vilos e as células epiteliais possuem microvilos. O epitélio evagina-se nos vilos e invagina-se em glândulas tubulares simples retas, as glândulas intestinais (ou de Lieberkühn) (62).

Entre os vilos existem pequenos espaços invaginados chamados de ‘criptas’, que são responsáveis pela proliferação desse tecido. Nas criptas residem as células-tronco

intestinais, que produzem um tipo celular denominado, células progenitoras. À medida que, as células progenitoras migram em direção à região apical do intestino, elas podem se diferenciar em: enterócitos, células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas (63).

As células epiteliais com microvilos são chamadas enterócitos. O glicocálix dessas células contém várias enzimas que finalizam a digestão e realizam a absorção dos nutrientes. As células caliciformes produzem glicoproteínas, que compõem um muco, o qual lubrifica a luz intestinal. As células enteroendócrinas secretam vários hormônios peptídicos, como enteroglucagon, somatostatina e colecistoquinina (63). As células de Paneth possuem núcleo basal e grandes grânulos de secreção eosinófilos que correspondem à lisozima e às defensinas (64).

A lâmina própria é constituída de tecido conjuntivo frouxo. Há capilares sanguíneos do tipo fenestrado e, em cada vilo, um capilar linfático central, com terminação cega, onde entram os nutrientes absorvidos. Na submucosa do duodeno, há as glândulas duodenais (ou de Brünner). Elas atravessam a muscular da mucosa e a lâmina própria, e os ductos abrem-se na base das glândulas de Lieberkühn ou entre as vilosidades. Essas glândulas não estão presentes no jejuno e no íleo (63, 65).

Na submucosa do duodeno e do jejuno pode haver alguns nódulos linfáticos, mas, no íleo, no lado do tubo oposto à fixação do mesentério, eles são abundantes, e o seu conjunto foi denominado placas de Peyer. Recobrimo as placas de Peyer, há as células M (M de microfold, microprega em inglês), enterócitos modificados, com forma cúbica, micropregas na superfície apical e invaginações na superfície basal, com a lâmina basal descontínua capturam antígenos da luz do intestino por endocitose e transportam-nos para os macrófagos e os linfócitos T situados entre as invaginações (63).

1.3.2 Morfologia do intestino grosso

O intestino grosso possui cerca de 1,5 metros de comprimento e 6,5cm de diâmetro. É subdividido em: ceco, apêndice, colo ascendente, transversal, descendente e sigmoide, e reto (60). No intestino grosso não há vilosidades, mas o epitélio invagina-se nas glândulas intestinais. O epitélio é simples colunar com microvilos e células

caliciformes. Ele contém ainda células-tronco e células enteroendócrinas. No ceco e no apêndice há também as células de Paneth (62).

No intestino grosso ocorre a absorção de água e de sais inorgânicos, levando à formação do bolo fecal. As células caliciformes estão presentes em grande número, e o muco secretado por elas contribui para a compactação do bolo fecal e facilita o deslizamento deste, lubrificando a superfície epitelial. Na submucosa do intestino grosso também são encontrados pequenos gânglios do sistema nervoso autônomo, pertencentes ao plexo submucoso ou de Meissner (58). A riqueza em tecido linfóide está relacionada ao acúmulo de bactérias (63).

A muscular da mucosa consiste em duas subcamadas: uma circular e outra longitudinal. Esta última, no ceco e no colo, espessa-se em três faixas equidistantes, as tênias do colo. O tônus constante das tênias forma pregas no intestino, chamadas saculações. O ceco, o apêndice e parte do colo são recobertos pela serosa. O restante do colo e o reto possuem adventícia. Na serosa do intestino grosso são observados acúmulos de tecido adiposo unilocular de formato pendular, caracterizados como apêndices epiplóicos (58, 63).

O apêndice vermiforme é um divertículo em fundo cego que desemboca no ceco, geralmente apresentando cerca de oito centímetros de comprimento. Sua estrutura apresenta as típicas tûnicas no trato digestório; no entanto, o apêndice vermiforme é considerado como formação linfóide subepitelial. A mucosa do apêndice vermiforme é essencialmente semelhante à do restante do intestino grosso, sem vilosidades e contendo glândulas de Lieberkühn comparativamente menores (58).

1.3.3 Microbiota intestinal

A superfície corporal externa (pele, unhas, lábios) e interna (cavidades nasais, cavidade oral, pulmonar, trato digestório, aparelho urogenital) do corpo humano são colonizadas por um conjunto diversificado de microrganismos denominado microbiota humana, que por sua vez é composta por bactérias, vírus, fungos e protozoários (4). A maioria significativa da microbiota humana é representada por bactérias sendo os filos predominantes: *Bacteroidetes* (9,5%), *Proteobacteria* (11,9%), *Firmicutes* (34,3%) e *Actinobacteria* (36,6%), os quais juntos representam 92,3% da microbiota humana (66).

A composição da microbiota intestinal varia de acordo com as regiões anatômicas do intestino, que diferem em termos de fisiologia, pH, tensão de O₂, taxas de fluxo da digesta, disponibilidade de substrato e secreções do hospedeiro. O intestino delgado fornece um ambiente mais desafiador para colonizadores microbianos, devido aos tempos de trânsito bastante curtos e às altas concentrações de bile. O intestino grosso, que é caracterizado por taxas de fluxo lentas e pH neutro a levemente ácido, abriga de longe a maior comunidade microbiana (67).

Além disso, a microbiota intestinal apresenta diversas funções que são significantes e bem estabelecidas, destacando-se as de proteção anti-infecciosa que fornecem resistência à colonização por microrganismos exógenos; a imunomodulação, que possibilita uma ativação das defesas imunológicas e, por fim, a contribuição nutricional resultante das interações locais e dos metabólitos produzidos oferecendo fontes energéticas e de vitaminas (68).

O tipo e o número de espécies microbianas que persistem e colonizam o trato digestório não são determinados por acaso, mas por uma combinação de fatores, incluindo, mas não limitado ao estado inflamatório do hospedeiro, dieta, genética do hospedeiro e fatores ambientais (69). A estabilidade da microbiota intestinal é alcançada a partir dos dois anos de idade e, no adulto, existe uma estabilidade considerável, entretanto, a composição da microbiota do idoso torna-se mais instável (70).

A microbiota intestinal e seu hospedeiro estabelecem uma relação simbiótica, na qual as bactérias possuem capacidade de assimilar e modificar componentes do seu ambiente e produzir novas moléculas que podem ser benéficas ou maléficas para seu hospedeiro (71). Essa relação influencia significativamente a proteção das mucosas intestinais, o metabolismo, a fisiologia e a função imune do hospedeiro, de modo que a consequência desta associação pode ser positiva ou negativa para saúde e/ou para doença (72, 73).

O filo *Firmicutes* caracteriza-se por ser um filo de bactérias gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas (74). Os microrganismos desse filo são considerados estrategistas, pois se multiplicam rapidamente no meio em que vivem em resposta à grande oferta de nutrientes. Estudos recentes evidenciaram proporção significativamente maior do filo *Firmicutes* nas pessoas com obesidade quando comparados com indivíduos eutróficos (75).

O segundo filo mais abundante na microbiota intestinal é o *Bacteroidetes*, o qual é composto por bactérias gram-negativas que apresentam características

quimiorganotróficas, sendo capazes de degradar polímeros como celulose, pectina e glicanos (76). Estudos, ao investigarem a razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, demonstraram um valor aumentado dessa razão nos grupos de indivíduos com obesidade quando comparados com eutróficos (77). Porém, os estudos ainda são conflitantes, pois outros autores não observaram diferença entre tais grupos (78).

A microbiota intestinal está sendo cada vez mais reconhecida por desempenhar papéis importantes na adiposidade e no metabolismo humano (79). A microbiota intestinal, afeta a coleta de energia e o armazenamento de gordura e, portanto, têm o potencial de influenciar o sucesso ou o fracasso da perda e ganho de peso (80).

1.3.4 Disbiose intestinal

A disbiose intestinal é o desequilíbrio entre bactérias benéficas e nocivas do intestino. Quando algumas populações bacterianas encontram-se reduzidas ou mesmo ausentes, enquanto outras podem tornar-se superabundantes ocorre a disbiose, a qual pode promover inflamação da mucosa intestinal (81, 82). Uma vez efetivada a inflamação, há alterações na permeabilidade paracelular favorecendo a translocação bacteriana do intestino para circulação sanguínea, o que pode resultar no desenvolvimento de doenças sistêmicas (83).

Além de inúmeras funções que incluem a absorção de nutrientes alimentares, o trato digestório desempenha um papel fundamental como barreira contra patógenos entéricos. Essa função do intestino é influenciada por uma variedade de fatores, tais como enzimas, agentes infecciosos, toxinas, hormônios e estresse (84). A barreira intestinal é constituída por componentes químicos, imunes, microbiológicos e físicos (85).

Uma fina monocamada de células epiteliais justapostas, unidas às junções intercelulares, formam o principal mecanismo físico de defesa entre o lúmen e os tecidos das mucosas. Essas junções que interconectam as células são especializações da membrana plasmática que possibilitam a ancoragem aos elementos do citoesqueleto oferecendo integridade estrutural celular (86).

A integridade da barreira intestinal também é mediada por um complexo proteico denominado ‘junções estreitas/oclusivas’, também conhecida como ‘*tight junctions*’ (TJs). As TJs estão localizadas na porção apical da membrana lateral das células

epiteliais, constituídas principalmente por três proteínas: claudina, ocludina e molécula de adesão juncional-A (JAM-A) (87). As TJs exercem ‘função de porta’ por formar uma barreira de permeabilidade que restringe a livre difusão de moléculas no espaço intracelular e ‘função de vedação’ por atuar como uma barreira que restringe a mistura do domínio da membrana plasmática apical e basolateral (88).

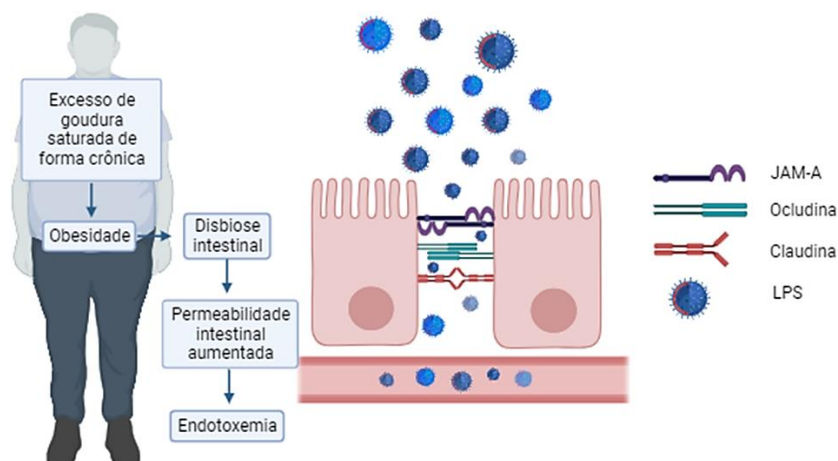
Após o desenvolvimento do Projeto Microbioma Humano foi possível realizar o sequenciamento genético da microbiota intestinal, e a diversidade do ecossistema intestinal tem sido amplamente estudada (89). Com a aplicação do sequenciamento do gene metagenômico e do RNA ribossômico 16S foi possível identificar que em humanos e camundongos os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são os mais abundantes, seguido dos demais filos como *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* (90).

Os LPS são compostos estruturais da membrana externa das bactérias Gram-negativas, sua presença induz inflamação através da ativação dos TLR. Os LPS são padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que se ligam ao TLR4 induzindo inflamação de baixo grau, comprometendo a integridade da mucosa por alterações nas TJs, contribuindo para a translocação de metabólitos e microrganismos até a lâmina própria intestinal (91-93).

Altos níveis de LPS induzem inflamação de baixo grau, que compromete a integridade da mucosa por alterações nas proteínas estruturais das zônulas de oclusão e aumento da permeabilidade intestinal, resultando em migração do LPS para os demais tecidos (23). Dietas ricas em frutose ou em gordura saturada aumentam a endotoxemia pós-prandial, com efeitos cumulativos quando consumidas cronicamente (24) (Figura 2).

A endotoxemia, altos níveis circulantes de LPS, pode reduzir a formação de tecido adiposo bege (*browning*) e afetar o funcionamento do TAM (*whitening*), reduzindo a termogênese adaptativa por ativação do eixo LPS-TLR4, com consequente estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial induzidas pela inflamação (85). Sendo assim, fármacos que modulem a microbiota intestinal podem auxiliar na disfunção do TA.

Figura 2 – Obesidade e endotoxemia



Legenda: O excesso de gordura saturada de forma crônica está associado à obesidade e esta consequentemente pode induzir a disbiose intestinal. Na disbiose intestinal ocorre o aumento da permeabilidade intestinal favorecendo a endotoxemia.

Fonte: A autora, 2023. Feita com Biorender (www.biorender.com)

1.4 Tecido adiposo

Os adipócitos são as únicas células que possuem especialização para armazenar lipídios, sem que isso comprometa a sua integridade funcional. Possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar AGs e estocar TAG, quando a oferta de energia for abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit energético (94). Além da sua função de metabolismo e acúmulo de gordura, os adipócitos também possuem funções secretoras de caráter autócrino, parácrino e endócrino (95).

O sistema nervoso autônomo atua diretamente sobre o TA. O sistema nervoso simpático promove ações catabólicas (lipólise), via estimulação adrenérgica, que ativa a enzima lipase hormônio-sensível (96). Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático promove ações anabólicas por estimular a secreção de insulina, aumentando a captação de glicose e de AGs que podem ser estocados sob a forma de TAG (97).

Nos mamíferos, o órgão adiposo é composto por dois tipos de tecidos: o TAB e o TAM. Sabe-se que, conforme a origem do TA (por exemplo, gonadal ou subcutâneo),

ocorrem diferenças na sua capacidade lipolítica ou lipogênica. O tecido gonadal, em roedores em geral, foi amplamente utilizado como padrão para avaliar respostas induzidas por condições normais ou patológicas por mimetizar a gordura abdominal humana (98).

Em relação às diferenças entre os adipócitos, já foi observado que o adipócito branco maduro armazena TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa a porção central da célula, o que promove o deslocamento do núcleo para a periferia e seu consequente achatamento. A existência de uma única gotícula lipídica caracteriza o adipócito branco como unilocular (7, 99).

De forma oposta, o TAM apresenta o adipócito menor que o branco, os quais possuem várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos (multilocular), citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que produzem energia pela oxidação de ácidos (100).

Entre as diversas adipocinas secretadas pelo TA, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adiposina, a resistina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1), as interleucinas 1 β , 6 e 8 (IL1 β , 6 e 8), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e a visfatina. Com exceção quase que única da adiponectina, a produção e a secreção desses fatores se intensificam com a obesidade, como o TNF- α , a resistina, o PAI-1, a IL-6 e a MCP-1, sendo diretamente associados à indução de resistência à insulina, à hipercoagulabilidade e à aterosclerose (101).

A recente descoberta de que uma grande fração de humanos adultos apresenta TAM fez com que estudos experimentais que ambicionam desvendar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade, ganhassem relevância científica (102). Além disso, foi observado que após estímulos o TAB pode apresentar características do TAM, processo conhecido como *browning*, que se torna alvo para um possível controle da obesidade no futuro.

1.5 Tecido adiposo branco

O TAB, descrito como o principal reservatório de energia em mamíferos, tem origem mesenquimal e é composto por adipócitos e a fração vascular estromal (constituída principalmente por pré-adipócitos, células imunes e fibroblastos); juntos,

adipócitos e fração vascular estromal produzem a matriz extracelular para manter a integridade estrutural e funcional do tecido (103, 104).

O adipócito branco maduro armazena os TAG em uma única e grande inclusão lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, e podem alterar acentuadamente seu tamanho conforme a quantidade de TAG acumulado (7, 99).

O TAB está distribuído por todo o corpo em diversos compartimentos, sendo localizado principalmente na região subcutânea (gordura subcutânea, que forma uma camada sob a pele) e na cavidade toracoabdominal. Sua principal função é o armazenamento de energia, proteção mecânica, isolante térmico, manutenção da temperatura corporal, auxílio no deslizamento entre vísceras e feixes musculares (105).

Existem diferenças entre o TA presente nas áreas subcutâneas (TABs) e visceral (TABv), presente na cavidade toracoabdominal. O TABv quando comparado ao TABs é mais vascular, innervado, contém um número maior de células inflamatórias e imunológicas, menor capacidade de diferenciação de pré-adipócitos e uma porcentagem maior de adipócitos grandes. Além disso, os adipócitos do TABv são mais metabolicamente ativos e mais sensíveis à lipólise que os adipócitos TABs (106).

A inclusão lipídica é reconhecida como uma organela celular dinâmica, envolvida por uma monocamada de fosfolipídios, proteínas estruturais e enzimas, que protege as organelas celulares dos efeitos citotóxicos dos AGs (107-109). Entre as várias proteínas que compõem essa monocamada, a perilipina 1A pode ser enfatizada, pois é a principal encontrada no adipócito. Dependendo do seu status de ativação, a perilipina 1A pode proteger e delimitar a gota lipídica ou facilitar a hidrólise lipídica (109, 110).

Em períodos prolongados de balanço energético positivo, que resultam do consumo excessivo de alimentos ricos em calorias, somados à inatividade física, a adiposidade aumenta. Esse processo crônico pode levar ao desenvolvimento da obesidade (111, 112). Por outro lado, em períodos prolongados de jejum ou de alta demanda de energia, a lipólise é essencial para fornecer AGs e glicerol como substratos energéticos para os tecidos (112, 113).

Para acomodar o excesso de energia na obesidade, o TAB passa por vários processos de remodelação celular e estrutural: 1- expansão do tecido através da coordenação do aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou número (hiperplasia) (114), 2- recrutamento de células inflamatórias (115) e 3- remodelação da

vasculatura e da matriz extracelular para permitir expansão tecidual adequada, oxigenação e mobilização de nutrientes (116, 117).

No entanto, quando a obesidade e a inflamação são sustentadas, esses mecanismos homeostáticos adaptativos não são suficientes, levando à disfunção do TAB caracterizada por secreção prejudicada de adipocinas, armazenamento lipídico e adipogênese anormais, e resistência à insulina (118, 119).

Durante muito tempo, acreditava-se que o TAB era uma estrutura secundária, cuja característica era armazenar grandes quantidades de gordura na forma de TAG. Pouco se atentou para sua participação no controle do peso corporal e da ingestão alimentar. Em decorrência da descoberta da capacidade do TAB em secretar substâncias com efeitos biológicos, grande importância foi atribuída ao seu papel endócrino (98).

Visto que a obesidade é um problema de saúde pública presente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento e prevenção da obesidade e suas comorbidades. Foi documentado que o *browning* do TAB pode ser uma estratégia adequada para combater a epidemia de obesidade que está se desenvolvendo em todo o mundo (120).

1.5.1 *Browning*

Os adipócitos bege ou "brite" ("*brown in white*") foram descritos recentemente como adipócitos localizados no TAB, mas que se assemelham ao fenótipo dos adipócitos marrons. No estado basal, os adipócitos beges agem como adipócitos brancos, mas sob o estímulo adequado eles podem se transformar em adipócitos pardos, em um processo chamado "*browning*" (121). O *browning* do TAB ocorre em condições específicas por meio da exposição a certos estímulos, como frio, hormônios tireoideanos, dieta, peptídeos natriuréticos, medicamentos e exercícios (122-124).

Estudos recentes indicaram que o TAM de humanos é composto por adipócitos beges que adquiriram fenótipo semelhante ao marrom e que essa conversão tem consequências metabólicas benéficas (125). A promoção da atividade do TAM ou o *browning* do TAB estão associados à tolerância ao frio *in vivo*, aumento do gasto energético e proteção contra a obesidade e o DM2 (126).

O recrutamento de adipócitos bege pode ocorrer por diferenciação de células progenitoras (pré-adipócitos bege, expressam o cluster de diferenciação 137, *Cd137*) ou por conversão de branco para bege (transdiferenciação) de adipócitos brancos fenotipicamente maduros [baixo *Cd137*, negativo para o fator mio gênico 5, (MYF5)] (127). A conversão do branco para o bege é um processo bidirecional no qual o estímulo termogênico promove a conversão para o fenótipo bege (127). Após sua retirada, ocorre o 'branqueamento' ou conversão de bege para branco através da mitofagia (128).

Quando o TAB é estimulado, um subconjunto de células pode adquirir um fenótipo termogênico sem compartilhar os marcadores genéticos do TAM, tendo uma única origem de desenvolvimento e características moleculares (129). De fato, os adipócitos beges têm um padrão de expressão gênica diferente de TAB e TAM (121). A expressão ectópica da UCP1 e do domínio PR contendo 16 (PRDM16) é consistente para identificar a presença de adipócitos beges nos adipócitos brancos (9, 14).

O fenômeno de *browning* ganhou relevância entre a comunidade científica quando adipócitos termogênicos ativados pela exposição ao frio foram identificados acidentalmente em pacientes submetidos à tomografia por emissão de pósitron na Suécia (100). Esses adipócitos, observados na região supraclavicular, se assemelhavam aos adipócitos beges observados em camundongos (130).

A visão de que o TA termogênico humano adulto se assemelha mais aos adipócitos beges de camundongos foi recentemente contestada. Estudos em camundongos conduzidos em condições 'fisiologicamente humanizadas' (ratos de meia-idade alimentados com uma dieta rica em gordura e alojados em termoneutralidade, 30°C) em oposição às condições 'padrão' (ratos jovens alimentados com dieta padrão e alojados em temperatura padrão, 20°C) indicam que o TAM clássico de camundongos exibe marcadores moleculares de TA termogênico humano (131).

Antes dessa observação, acreditava-se que a termogênese não poderia produzir uma perda significativa de MC em adultos (132). No entanto, nos últimos anos, os adipócitos beges são considerados um benefício metabólico: apenas 63 g de adipócitos termogênicos completamente ativados podem evitar o acúmulo de aproximadamente 4 kg de TAB por ano (133, 134). Assim, diante da epidemia de obesidade, é urgente descobrir alvos gênicos promissores e abordagens para alcançar a ativação segura e eficaz da gordura bege.

As estratégias farmacológicas de "*browning*" para mudar os adipócitos brancos em direção aos fenótipos marrom/bege estão em vários estágios da pesquisa pré-clínica e

de ensaios clínicos, incluindo: agentes adrenérgicos β_3 , agonistas de PPAR γ (receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo), agentes de indução de monofosfato de guanosina cíclico e agonistas do fator de crescimento de fibroblastos (135).

1.6 Tecido adiposo marrom

O TAM, especializado na produção de calor - termogênese – encontra-se em quantidade variável em humanos adultos, mas é encontrado em grande quantidade em fetos e recém-nascidos. Foi inicialmente descrito pela sua função em mamíferos hibernantes e crianças, dada sua capacidade de liberação de calor para manutenção da temperatura corporal em resposta ao frio (9, 136). No entanto, atividades dentro da medicina nuclear produziram resultados indicando que o TAM está presente e ativo em humanos adultos e pode, portanto, ser considerado um órgão de importância fisiológica (100).

Em relação ao padrão de distribuição, os depósitos supraclaviculares e do pescoço são os mais frequentes no homem adulto. Um depósito de TAM é visto ao longo da medula espinhal como um depósito paravertebral, mediastino (137), na área para-aórtica (138), e ao redor do coração. Além disso, existem depósitos infradiafragmáticos (139), particularmente na área perirrenal (138). Embora a distribuição apresente semelhanças com os dos roedores existem algumas diferenças: não há depósito interescapular, axilar e o perinéfrico não é muito proeminente (100).

O TAM é composto por 20% a 30% de adipócitos maduros (140) e uma fração vascular estromal abundante na qual residem células-tronco adiposas, pré-adipócitos, células endoteliais, células hematopoiéticas e células neurais. Os pré-adipócitos se originam de células-tronco mesenquimais e ambas as populações estão presentes no tecido adiposo (141).

Um extenso mapeamento *post-mortem* de adipócitos marrons em tecidos adiposos humanos desde a infância até os 80 anos de idade revelou uma mudança gradual na morfologia do TAM. Durante a primeira década de idade, os adipócitos multiloculares eram abundantes e continham apenas pequenas quantidades de lipídios. Depois disso, adipócitos multiloculares ainda eram encontrados; no entanto, as células eram mais preenchidas com lipídios (142).

Sendo assim, o TAM infantil se assemelha ao TAMi de camundongos alojados em temperaturas abaixo da termoneutralidade, enquanto o TAM de adultos tem a morfologia semelhante ao TABs de camundongos alojados sob condições frias ou TAMi de camundongos alojados em termoneutralidade (143).

Já foi descrito que a coloração amarronzada do TAM é acarretada por uma elevada presença de mitocôndrias. Tem sido demonstrado que a UCP1 é um dos principais marcadores para a identificação do TAM (95, 144). A UCP1 se encontra na membrana mitocondrial interna, atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP) e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (100).

A termogênese acontece através de estímulos a receptores adrenérgicos constantes (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1). Em seguida, inicia-se uma cascata de reações que se seguem com o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), ativação da proteína cinase A dependente de AMPC (PKA) e indução da lipólise (14, 145-148). Não somente a gordura armazenada em suas gotículas lipídicas é usada para gerar calor, mas também AGs e glicose da circulação sistêmica, aumentando exponencialmente sua capacidade termogênica (102).

A disfunção mitocondrial (organela importante para funcionalidade dos adipócitos marrons e beges) contribui para a patogênese de distúrbios metabólicos como a obesidade (149). A mitofagia, a biogênese mitocondrial e vários processos de degradação de proteínas mitocondriais controlam a qualidade das mitocôndrias com o objetivo de manter a saúde metabólica (150).

Para sustentar sua atividade metabólica oxidativa, o TAM utiliza vastas quantidades de nutrientes intracelulares e circulantes (151), fazendo com que a sua atividade exerça efeitos metabólicos benéficos sobre a obesidade (151), resistência à insulina (152) e aterosclerose (153, 154). Durante a aclimação ao frio, o TAM sofre um processo de recrutamento adaptativo e o tecido cresce em tamanho e em capacidade metabólica total. Esse processo envolve tanto a diferenciação de novos adipócitos quanto o aumento da atividade metabólica dos adipócitos existentes (136, 155, 156).

Além disso, o TAM ainda desempenha papéis autócrinos, parácrinos e endócrinos. Dentro de seu papel autócrino, o TAM pode secretar proteína de membrana basal, como o colágeno IV e fibronectina (157, 158). Ademais, pode sintetizar e secretar adiposina, fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento semelhante à

insulina tipo 1 (IGF-1), prostaglandinas e adenosina (159, 160). No que tange à sua função parácrina, o TAM pode secretar o fator de crescimento nervoso, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o óxido nítrico e o angiotensinogênio (161, 162). Por último, como órgão endócrino, produz AG, e somente em circunstâncias especiais, produz leptina, adiponectina e resistina (163).

Os adipócitos marrons têm origem a partir de células progenitoras de miócitos (células musculares), chamadas de mioblastos, que expressam o Myf5⁺ (164). No entanto, o PRDM16 controla uma alternância bidirecional do destino celular entre os mioblastos esqueléticos e as células adiposas marrons. A perda de PRDM16 em precursores de gordura marrom causa perda de características da gordura marrom e promove a diferenciação muscular (165). O PRDM16 induz um programa completo de diferenciação de gordura marrom, incluindo a expressão de *Pgc-1α* e *Ucp-1* (166).

Embora a massa total de TAM em mamíferos seja pequena, pesquisas anteriores já demonstraram que sua estimulação poderia quadruplicar o gasto energético (GE) de um animal, à medida que ocorre um aumento na perfusão tecidual (102, 167, 168). Desse modo, torna-se importante estudar as alterações causadas nesse tecido na obesidade para compreender melhor os melhores tratamentos para reduzir os prejuízos causados pelo *whitening* do TAM.

1.6.1 Whitening

Com base na crescente percepção de que o TAM é um potencial regulador da função metabólica sistêmica, estudos analisaram o *browning* do TABs, como uma estratégia para combater a obesidade (9, 169, 170). No entanto, tem sido argumentado que estas ações são quantitativamente incapazes de impactar de forma significativa para o metabolismo sistêmico, devido à baixa capacidade termogênica desse “amarronzamento” em relação àquela exibida pelos depósitos clássicos do TAM (171).

Na vigência da obesidade, os adipócitos marrons podem sofrer um “embranquecimento” (chamado de *whitening*), a partir de uma rarefação da vascularização atrelada ao menor estímulo adrenérgico e inflamação, os quais passam a exibir fenótipo de adipócito branco com baixa expressão de UCP1 e reduzida capacidade termogênica (10, 172). Contudo, os mecanismos moleculares que levam à redução da

atividade do TAM na obesidade e suas implicações fisiológicas são ainda pouco explorados.

Os adipócitos são o local de armazenamento de lipídios, cuja entrada e saída é fortemente regulada por várias proteínas de ligação/transferência de AGs (173). Essa maquinaria permite que os adipócitos armazenem com grandes quantidades de lipídios, mas até os adipócitos têm limites que, quando atingidos, levam a doenças metabólicas. Postula-se que a hipertrofia além de um diâmetro celular de 100 µm leva a uma baixa perfusão e à hipóxia celular que, por sua vez, podem iniciar a inflamação, sendo necessário uma resposta adaptativa (34).

Em camundongos alimentados com dieta padrão e mantidos à temperatura ambiente, os adipócitos brancos e marrons são encontrados em vários depósitos subcutâneos e viscerais (174). Porém, no TA de animais e humanos obesos, adipócitos marrons são dificilmente encontrados, pois a maioria passa por uma conversão para um fenótipo “branco” (175, 176).

Esse *whitening* pode ocorrer por alguns mecanismos, como: baixa atividade do sistema nervoso simpático (136, 177), cuja sinalização adrenérgica é essencial para a manutenção do fenótipo marrom (178, 179), a atividade da enzima lipase de triacilglicerol do adipócito que é fundamental para a morfologia e função normais do TAM (180, 181), temperatura ambiente (136, 177), entre outros.

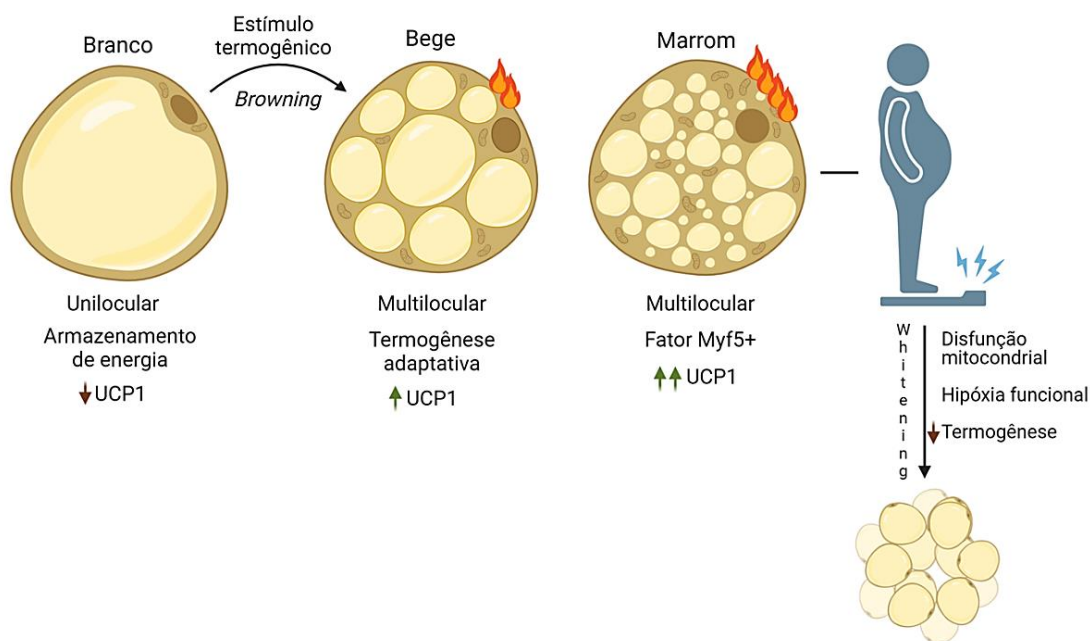
Em comparação com o TAB, o TAM é mais extensivamente vascularizado, e a angiogênese dependente do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) tem se mostrado importante para a resposta termogênica (182). O *whitening* já foi associado ao desenvolvimento de hipóxia. Tem sido demonstrado que o microambiente hipóxico no TAM, devido à obesidade, leva a uma perda acelerada de mitocôndrias e, à medida que a capacidade oxidativa é perdida, as gotículas lipídicas se acumulam, gerando o fenótipo branco (11).

A sinalização β -adrenérgica é reconhecida como um ativador central da expressão de VEGFA em adipócitos marrons (183). Vários estudos associaram a vascularização do TA à homeostase metabólica sistêmica (184-190). A maior parte destes estudos concentrou-se na vascularização do TAB e o papel da vascularização do TAM no controle metabólico sistêmico não foi investigado profundamente.

A recente descoberta que a presença de TAM com atividade termogênica é capaz de evitar o acúmulo de gordura (133) fez com que a descoberta de fármacos que ativem a termogênese adaptativa e combatam o *whitening* sejam pertinentes para o controle do

sobrepeso e/ou comorbidades associadas. A figura 3 resume as principais características dos diferentes adipócitos.

Figura 3 – Tecido adiposo e suas variações



Legenda: Principais diferenças encontradas nos adipócitos e o impacto da obesidade no TAMI. O TABs que possui a função principal de armazenamento lipídico pode sofrer um remodelamento a partir de determinados estímulos apresentando características de um adipócito marrom (tecido adiposo bege). O TAMI apresenta alterações estruturais na vigência da obesidade. Fonte: A autora, 2023. Feita com Biorender (www.biorender.com)

1.7 PPARs

Os receptores nucleares (RNs) são uma superfamília de proteínas de fatores de transcrição regulados por ligantes e desempenham papéis importantes na reprodução, desenvolvimento e fisiologia (191). O conceito de RNs surgiu em 1985, quando os genes que codificam os receptores para glicocorticoides e estrogênio foram identificados pela primeira vez por clonagem molecular, que revelou que eles compartilham estruturas muito semelhantes (192, 193).

Os PPARs são uma família de fatores de transcrição ligados ao metabolismo celular de lipídios, carboidratos, proteínas e proliferação celular, existentes em três isoformas: alfa (PPAR α), beta/delta (PPAR β/δ) e gama (PPAR γ) (194). Embora as três

isoformas exibam semelhanças estruturais, elas também exibem diferenças na distribuição do tecido, especificidades do ligante e atividades regulatórias metabólicas.

Os PPARs regulam muitas vias metabólicas após a ativação por ligantes endógenos, como AGs e seus derivados, ou agonistas sintéticos, que desencadeiam uma mudança conformacional para interagir com coativadores transcricionais (195, 196). O PPAR α é predominantemente expresso no fígado, músculo e coração e sua ativação, segundo estudos já realizados, sugere uma participação desse receptor no metabolismo lipídico. O PPAR γ é expresso principalmente no TAB e no TAM, sendo responsável, dentre outras funções, pela lipogênese. Enfim, o PPAR β/δ apresenta uma ampla distribuição corporal com diversas funções como a oxidação de AGs no músculo e regulação geral de energia (194).

É comum encontrar na literatura agonistas parciais e totais dentre os agonistas PPARs. Um agonista parcial é uma molécula que se liga a um receptor em seu sítio ativo, mas que só produz uma resposta parcial, mesmo quando todos os receptores estão ocupados (ligados) pelo agonista, diferente do agonista total que produz resposta integral ao ligar-se ao seu receptor. Com análises da curva de dose-resposta é possível perceber a diferença de efeitos máximos entre os agonistas parciais e totais (197).

A utilização de agonistas dos PPARs tem sido descrita na literatura com efeitos benéficos sobre a ingestão alimentar, MC, mobilização da deposição de gordura e sobre a esteatose pancreática e hepática, geradas a partir da administração de diferentes dietas (198, 199). Além disso, foi sugerido que o planejamento cuidadoso de agonistas parciais de PPARs pode mostrar melhora em relação aos efeitos colaterais e também aumentar o valor terapêutico para diferentes doenças (200).

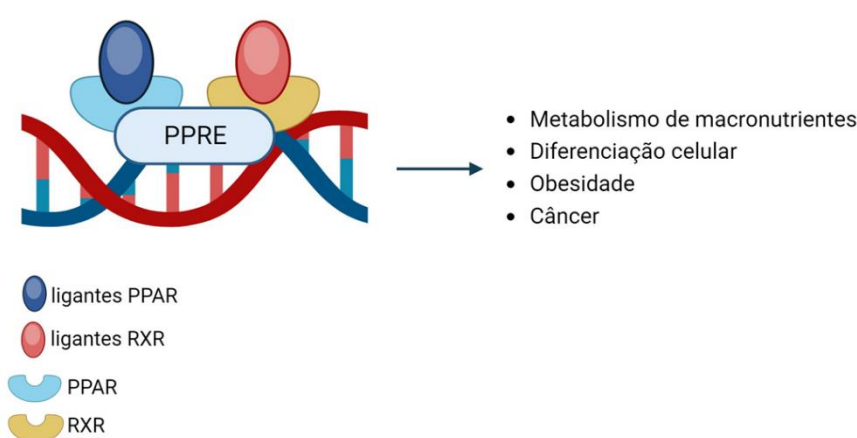
Os RNs atuam diretamente no processo de transcrição de genes. A transcrição é uma etapa regulatória que pode gerar a indução ou a inibição da expressão de determinado gene, a depender de respostas extracelulares. A maioria dos eventos regulatórios de produção de proteínas ocorre na iniciação da transcrição, com isso os RNs atuam diretamente na regulação de inúmeros processos biológicos como reprodução, desenvolvimento e metabolismo geral (201).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR, em que X pode ser α , β/δ ou γ) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá

sequências específicas do DNA para a transcrição de seus genes-alvo (Figura 4). Esse mecanismo de ação dos PPARs é conhecido como o mecanismo de trans-ativação (202).

Além dessa forma de ação, os PPARs podem regular a expressão gênica independentemente de ligação ao PPREs, através do mecanismo de trans-repressão. Existe um “*crosstalk*” entre os PPARs e outros fatores de transcrição que influencia e regula a expressão gênica deles, e a maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos PPARs podem provavelmente ser explicados por esse mecanismo (203, 204).

Figura 4 – Mecanismo de trans-ativação dos PPARs



Fonte: A autora, 2023. Feita com Biorender (www.biorender.com)

1.7.1 PPAR α

O PPAR α foi o primeiro receptor descoberto, inicialmente visto em sapos, depois em ratos, coelhos e humanos. Em humanos, este receptor foi mapeado no cromossomo 22q12-13.1 e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e TAM (205, 206). Este receptor possui como ligantes naturais os AGs poli-insaturados e os leucotrienos, que são importantes mediadores inflamatórios; como ligantes farmacológicos, a família das drogas hipolipidêmicas (“fibratos”) é considerada um importante agonista PPAR α (207).

A ativação de PPAR α tem relação com o aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) e diminuição da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e TAG plasmáticos. Além disso, o PPAR α atua diretamente sobre a β -oxidação hepática, estimulando a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que participam desse processo. Já foi visto que a expressão de carnitina palmitoiltransferase I (CPT1) é extremamente aumentada com a ativação desse receptor (208, 209).

A participação do PPAR α na via termogênica passa pelo direcionamento dos ácidos graxos livres (AGLs), gerados após estímulo adrenérgico, para a via de β -oxidação, ao invés do direcionamento ao efluxo celular. O estímulo crônico ao receptor beta-3 adrenérgico (R β 3A) regula positivamente a expressão de PPAR α , o que resulta em capacidade de oxidação aumentada no interior dos adipócitos (148).

A ativação do PPAR α ocorre principalmente sob privação de energia, conduzindo à regulação positiva do metabolismo energético intracelular, o que induz a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa (210). O catabolismo de AGs mediado por PPAR α é crucial para a síntese de vários metabólitos a serem usados como fontes de energia por outros tecidos, tais como corpos cetônicos no cérebro (197).

Ligantes naturais ou farmacológicos controlam principalmente a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Se a concentração de AGs aumenta, o PPAR α é ativado e absorve as formas oxidadas desses ácidos (211). Durante o influxo de AGs, a transcrição de genes regulados por PPAR α é estimulada e os sistemas são ativados (212). Assim, o PPAR α funciona como um sensor lipídico e controla a combustão de energia.

Um estudo anterior mostrou que o tratamento com WY-14643 (agonista PPAR α) apresentou efeitos lipolíticos com redução da massa gorda e aumento da oxidação de gordura no corpo todo. Estes resultados demonstram um novo papel da ativação do PPAR α na regulação beta-adrenérgica da lipólise do TA (23). Além disso, o tratamento com WY-14643 já mostrou efeitos na diminuição da esteatose hepática, insulina sérica e inflamação no TA, sendo essas alterações geralmente observadas em um quadro de obesidade (52, 53).

No intestino, a ativação do PPAR α suprime a hiperlipidemia pós-prandial, aumentando a oxidação de ácidos graxos das células epiteliais intestinais (213). Além disso, a ativação intestinal do PPAR α reduz a esterificação do colesterol, suprime a produção de quilomícrons e aumenta a síntese de HDL pelos enterócitos (214).

Neste cenário, um estudo demonstrou que a ativação do PPAR α por um agente farmacológico (fenofibrato) foi capaz de ativar a termogênese adaptativa e a biogênese mitocondrial no TAM de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por um período que não foi capaz de promover o whitening nesse tecido a partir de uma interação *irisina-Pgc1 α -Prdm16* (215).

Posteriormente, a ingestão crônica de uma dieta rica em gordura causou o *whitening* do TAM, e o tratamento com WY14643 mitigou esse comprometimento morfofisiológico por meio de sinais anti-inflamatórios e aumentou o VEGFA, resultando em aumento da termogênese. No mesmo experimento, a dieta rica em frutose não desencadeou o *whitening*, mas o WY14643 também atenuou as alterações histológicas causadas pelo excesso de frutose na dieta (5).

1.7.2 PPAR γ

O PPAR γ tem recebido muita atenção desde meados da década de 1990, quando foi identificado como o alvo molecular das tiazolidinedionas (TZDs), uma classe de drogas sensibilizadoras à insulina e antidiabéticos (216). O PPAR γ , um membro da família de receptores nucleares de fatores de transcrição, desempenha um papel significativo na regulação do metabolismo de lipídios e glicose (217). É expresso no TAB e TAM, no intestino grosso e no baço. No entanto, sua expressão é mais elevada em adipócitos (218, 219).

O PPAR γ ativado por ligante induz a diferenciação de adipócitos, estimula a biogênese mitocondrial e inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios (219). Além disso, o PPAR γ ativado nos adipócitos garante uma secreção balanceada e adequada de adipocitocinas (adiponectina e leptina) que são mediadores da ação da insulina nos tecidos periféricos (220).

No TAB, o PPAR γ é principalmente importante para o acúmulo de lipídios. Em contraste, a ativação de PPAR γ no TAM induz a expressão de genes relacionados ao programa termogênico, incluindo coativador 1 α do PPAR γ (PGC1 α) e UCP1. O PPAR γ é crucial para a diferenciação de adipócitos marrons, mas fatores de transcrição adicionais, incluindo o PRDM16, são necessários para ativar o programa termogênico (221).

A isoforma PPAR γ 1 é expressa em quase todas as células, enquanto PPAR γ 2 se limita principalmente ao TA. No entanto, o PPAR γ 2 é um ativador de transcrição mais potente (222). Ambas as formas de PPAR γ 1 e PPAR γ 2 são essenciais para o desenvolvimento do TA e o controle da sensibilidade à insulina. No entanto, o PPAR γ 2 é a isoforma regulada em resposta à ingestão de nutrientes e obesidade (223, 224).

As TZDs (também chamadas de glitazonas), ligantes PPAR γ sintéticos, são drogas antidiabéticas com potentes efeitos de sensibilização à insulina que conferem controle glicêmico em longo prazo (225). No entanto, seu uso clínico tem sido contestado devido aos efeitos colaterais, como ganho de peso corporal, edema e fraturas ósseas (226). O aumento no peso corporal após a administração de TZD é devido à expansão do TAB dependente de PPAR γ (227) e retenção de líquidos causada pela ativação total de PPAR γ nos dutos coletores renais (228).

Os fármacos TZDs além de melhorarem a sensibilidade periférica à insulina possuem um espectro de propriedades anti-inflamatórias, incluindo redução nos marcadores inflamatórios do plasma e nos macrófagos do TA (223, 229). Em adipócitos brancos, os TZDs promovem a diferenciação dos adipócitos, a ação da insulina e a formação de adipócitos bege (217). No TAM, os TZDs ativam a atividade termogênica (230).

Antes de 2008, a rosiglitazona e a pioglitazona eram amplamente prescritas. Após 18 meses da publicação da meta-análise questionando a segurança cardiovascular da rosiglitazona (231), o número de prescrições de rosiglitazona caiu pela metade e o número de prescrições de pioglitazona dobrou (232). A rosiglitazona foi associada a aumentos significativos de infarto do miocárdio e morte por causas cardiovasculares após exposição apenas de curto prazo (233) e a Agência Europeia de Medicamentos retirou a aprovação deste medicamento em 2010 devido a essas preocupações de segurança cardiovascular (234).

A pioglitazona, um agonista total do PPAR γ com propriedades modestas de ativação do PPAR α (235), diminui os triglicerídeos, aumenta o HDL-C e reduz os eventos cardiovasculares em pessoas com DM2 (236) ou que são resistentes à insulina (237). Em contraste, o agonista PPAR γ puro, rosiglitazona, não diminui o risco cardiovasculares em pessoas com DM2 e aumenta tanto o HDL-C quanto o LDL-C (238). Portanto, os efeitos benéficos da pioglitazona são provavelmente devido à ativação combinada de PPAR α e PPAR γ .

O uso de baixa dosagem da pioglitazona começou a ser considerado uma saída terapêutica para redução dos efeitos adversos do ganho de peso, edema e insuficiência cardíaca desse tratamento. Ratos administrados com pioglitazona (3mg/kg) por 4 semanas, melhoraram o perfil metabólico lipídico e a resposta à insulina, além de redução de marcadores inflamatórios hepáticos, sem impacto na MC (239).

1.7.3 PPAR α / γ

Medicamentos com especificidade para pelo menos duas isoformas de PPAR (por exemplo, agonistas duplos de PPAR α / γ ou pan-PPAR) poderiam ser mais eficazes e ter relativamente menos efeitos colaterais indesejáveis em comparação com agonistas atualmente usados com especificidade para uma única isoforma de PPAR (240).

Neste contexto, uma série de agonistas duplos de PPAR α / γ , denominados glitazars, foi projetada para combinar a ativação total do PPAR α e a ativação parcial do PPAR γ , mantendo a propriedade de sensibilização à insulina dos genes alvo do PPAR γ com os efeitos benéficos da ativação do PPAR α no metabolismo energético (241).

A vantagem dos agonistas PPAR α / γ é que eles, além dos efeitos de sensibilização à insulina do PPAR γ , melhoram os parâmetros lipídicos e reduzem as complicações cardiovasculares associadas a distúrbios metabólicos por meio do PPAR α (242). Sendo assim, a ativação concomitante de PPAR α e PPAR γ , pode ser uma opção terapêutica benéfica para o manejo de patologias como a dislipidemia diabética.

Diante desse contexto, vários agonistas duplos de PPAR α / γ como muraglitazar, naveglitazar, tesaglitazar, ragaglitazar e aleglitazar foram estudados quanto aos seus potenciais terapêuticos e perfis de segurança; no entanto, os efeitos adversos indesejáveis desses medicamentos observados em estudos pré-clínicos e clínicos levantou uma preocupação de segurança e, como resultado, o desenvolvimento desses glitazars foi interrompido em vários estágios (243-245).

Na maioria dos casos, os efeitos adversos atribuídos aos agonistas duplos se devem à maior potência de ativação do receptor PPAR-gama, o que leva à sua ativação suprafisiológica em alguns tecidos e órgãos. Diante disso, novos agonistas duplos com ativação parcial do PPAR-gama vêm sendo desenvolvidos, de modo que previna as complicações encontradas na ativação total desse agonista.

Dois estudos de fase III com saroglitazar mostraram melhores perfis de glicose e lipídios em pacientes com dislipidemia diabética em comparação com pioglitazona ou placebo. Em contraste com os outros glitazares PPAR γ -dominante, o saroglitazar ativa predominantemente PPAR α com apenas agonismo PPAR γ moderado, o que pode explicar a falta de efeitos colaterais típicos do PPAR γ (246).

De forma semelhante, o tratamento com tesaglitazar foi capaz de reduzir significativamente as lesões ateroscleróticas, o acúmulo de lipídios no fígado, a infiltração de macrófagos e diminuiu o colesterol hepático total e o conteúdo de TAG em camundongos. Além disso, o tesaglitazar reduziu os marcadores inflamatórios tanto no nível sérico quanto no mRNA (247). O tesaglitazar foi considerado bem tolerado e um tratamento potencial para prevenir complicações vasculares e retardar a progressão para diabetes em humanos (248).

Tesaglitazar (GalidaTM) foi desenvolvido pela AstraZeneca com a intenção de tratar a hiperglicemia e anormalidades lipídicas em pacientes com diabetes tipo 2. Embora efeitos antidiabéticos muito promissores tenham sido relatados em roedores (241) e humanos (248), o desenvolvimento de tesaglitazar foi interrompido durante a fase III pelos efeitos colaterais causados no rim (249). Sendo assim, um direcionamento seletivo do tesaglitazar aos adipócitos poderia ser uma estratégia promissora para continuar seus ensaios clínicos (250, 251).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do tesaglitazar (agonista PPAR α/γ), pioglitazona (agonista PPAR γ) e WY-14643 (agonista PPAR α) no controle da endotoxemia, *browning* do tecido adiposo branco e *whitening* do tecido adiposo marrom em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tesaglitazar pioglitazona e WY-14643, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica sobre os seguintes parâmetros:

- a) Massa corporal, ingestão alimentar, metabolismo energético, tolerância oral à glicose e concentrações plasmáticas de insulina, leptina, adiponectina, LPS e triacilglicerol;
- b) Remodelamento estrutural do tecido adiposo branco subcutâneo e marrom interescapular;
- c) Expressão gênica de diferentes vias no tecido adiposo branco subcutâneo e marrom interescapular;
- d) Expressão proteica de diferentes vias no tecido adiposo branco subcutâneo e marrom interescapular;
- e) Composição dos principais filos (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*) da microbiota intestinal;
- f) Expressão gênica de vias relacionadas às zônulas de oclusão no intestino delgado (íleo);
- g) Remodelamento estrutural (íleo) e ultraestrutural do intestino delgado (ceco) com ênfase nas zônulas de oclusão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Os procedimentos realizados ocorreram de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996), além de seguirem as normas impostas no mundo e no Brasil e serem aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/017/2021.

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

Aos três meses de idade, os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: grupo controle (C, $n=10$), alimentado com dieta padrão para roedores (14% da energia advinda de proteínas, 10% de lipídios e 76% de carboidratos; energia total de 15.884 kJ/kg) e o grupo dieta hiperlipídica (HF, *high-fat*, $n=40$), alimentado com uma dieta com excesso de lipídio (14% da energia advinda de proteínas; 50% de lipídios e 36% de carboidratos; energia total de 20.900 kJ/kg). As referidas dietas foram administradas durante 12 semanas (período de indução das alterações metabólicas).

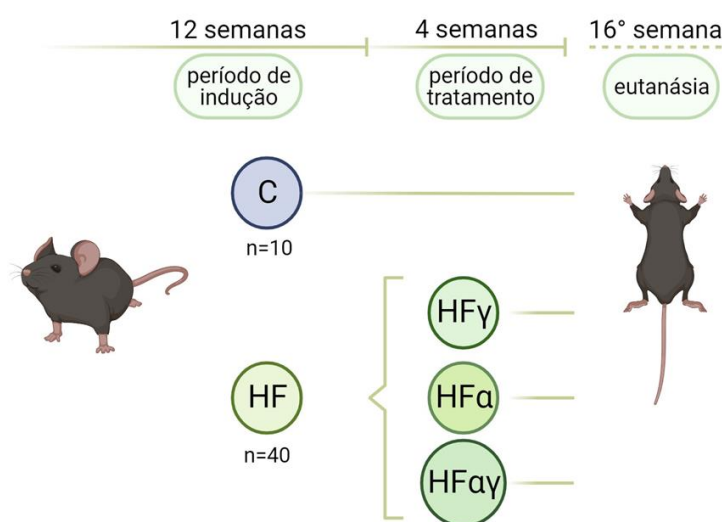
Após esse período de doze semanas, o grupo HF foi subdividido para o início do tratamento com tesaglitazar, pioglitazona e WY-14643 que ocorreu por 4 semanas, conforme a Figura 5. Os grupos C e HF foram mantidos no esquema alimentar descrito inicialmente. Os tratamentos foram incorporados às respectivas dietas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil).

Tanto as dosagens quanto a forma de administração foram escolhidos com base em estudos anteriores que foram citados durante o tópico de discussão.

Os grupos experimentais formados foram os seguintes:

- a) **C:** dieta padrão ao longo de todo o experimento;
- b) **HF:** dieta hiperlipídica ao longo de todo o experimento;
- c) **HF α :** dieta HF + tratamento com WY-14643 (agonista PPAR α) na dose de 3,5 mg/kg de massa corporal;
- d) **HF γ :** dieta HF + tratamento com pioglitazona (agonista PPAR γ) na dose de 10,0 mg/kg de massa corporal;
- e) **HF $\alpha\gamma$:** dieta HF + tratamento com tesaglitazar (agonista PPAR α/γ) na dose de 4,0 mg/kg de massa corporal.

Figura 5 – Desenho experimental



Legenda: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico com agonista PPAR α (HF α); Hiperlipídico com agonista PPAR γ (HF γ); Hiperlipídico com agonista PPAR α/γ (HF $\alpha\gamma$).

Nota: Esquema representativo dos grupos experimentais. Feita com Biorender (www.biorender.com)

Fonte: A autora, 2023.

A fim de alcançar as doses estabelecidas para cada tratamento, foram adicionados 35 mg de WY-14643, 100 mg de pioglitazona e 40 mg de tesaglitazar por quilo de dieta hiperlipídica, considerando a ingestão de ração pelos grupos (em média, 3g por dia). É importante ressaltar que o conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas eram idênticos e estavam de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (252) para o período de manutenção dos animais a

partir dos três meses de idade. As dietas foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil), tais dietas experimentais encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição nutricional das dietas experimentais

Nutrientes	Dietas	
	Controle	HF
Caseína	140,0	175,0
Amido de milho	620,7	347,7
Sacarose	100,0	100,0
Banha de porco	---	238,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,0016	0,0016
Total (g)	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	5000
Carboidrato (% , energia)	76	36
Proteína (% , energia)	14	14
Lipídios (% , energia)	10	50

Fonte: Instituto Americano de Nutrição (252).

3.2 Massa corporal e ingestão alimentar

Durante todo o período experimental, a MC dos animais foi mensurada semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). A ingestão alimentar foi obtida diariamente durante todo o protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi calculada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules, medida universal de energia.

3.3 **Teste de tolerância oral a glicose**

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado nos camundongos na semana anterior à eutanásia. Os animais ficaram em jejum durante o período de 6 horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril – 0,9% NaCl) na dosagem de 2g/kg MC. O sangue dos animais foi obtido por ordenha da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose para a verificação dos níveis glicêmicos com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). O tempo zero (0) foi utilizado para o cálculo da glicose em jejum. A área sob a curva (ASC) foi calculada usando a ferramenta trapezoide do programa GraphPad Prism versão 9.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 **Calorimetria indireta**

Uma semana antes do sacrifício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de calorimetria (Panlab Havard Apparatus, MA, EUA) durante três dias com livre acesso à dieta e à água. Este sistema monitora o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2), a taxa de troca respiratória e a temperatura dos animais. Os dados foram coletados a cada 3 minutos durante 72 horas. Descartamos as primeiras 24 horas por considerarmos um período de manutenção e o gasto energético diário e o quociente respiratório foram calculados a partir dos dados coletados no ciclo escuro, a fim de verificar alterações na taxa metabólica basal dos animais.

3.5 **Termografia**

Com auxílio da câmera termográfica FLIR C5 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA) foi possível aferir a temperatura corporal dos

animais com o foco da câmera voltada para o TAMi. As imagens foram captadas em temperatura ambiente, com animais conscientes (sem utilização de sedativos), na 15ª semana de experimento.

3.6 Eutanásia

Após 16 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos a jejum de seis horas e, após administração de heparina, foram anestesiados com ketamina (240 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg). Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca; as quais foram centrifugadas (712 *xg*, por 15 minutos) e congeladas (-80°C) para posterior análise bioquímica. O intestino delgado (íleo), TAMi (encontrada na região interescapular) e TABs (encontrada na região inguinal) foram obtidos por cuidadosa dissecação, tiveram sua massa aferida em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) e foram fixados em formalina de Millonig (para técnica de microscopia de luz) ou congelados (-80°C, para análises moleculares). O intestino grosso (ceco) foi fixado em 2,5% de glutaraldeído e em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2) (para técnica de microscopia eletrônica). As gorduras retroperitoneais (ligada à parede posterior do abdômen e aos rins e ureteres) e epididimária (ligada ao epidídimo, na porção inferior do abdômen) foram cuidadosamente dissecadas e pesadas para avaliação da distribuição de gordura corporal.

3.7 Análise plasmática

A concentração plasmática de TAG foi mensurada utilizando o Analisador Semi-Automático de Bioquímica (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). As concentrações plasmáticas de insulina, adiponectina, leptina e LPS foram mensuradas através dos painéis de imunoensaio específico para camundongos (Rat/mouse insulin ELISA kit Cat #EZRMI-13K e mouse adiponectin ELISA kit Cat #EZMADP-60K (Millipore, Missouri, USA), e multi-species ELISA Kit Cat #SEB526Ge-96T (Cloud-Clone Corp., Katy,

USA). O índice de resistência à insulina em jejum (FIRI) foi calculado da seguinte forma: insulina em jejum ($\mu\text{g/L}$) x glicemia em jejum (mmol/L)/25 (253).

3.8 Histologia

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

3.9 Estereologia

Com o objetivo de estimar indiretamente a densidade numérica de adipócito marrom por área, foi realizado a densidade numérica de núcleos por área (Q_A), uma vez que o adipócito marrom é uma célula mononucleada. O Q_A foi obtido pela divisão do número total de núcleos contados na área teste, à exceção dos que tocam a linha proibida, pela área teste (em μm^2), obtida a partir do software STEPanizer (www.stepanizer.com), versão beta offline 0.28.

No TABs, a densidade de volume (V_v) de adipócitos foi estimada pela técnica de contagem de pontos, utilizando um sistema teste de dezesseis pontos produzido pelo STEPanizer (www.stepanizer.com). Foram contados os pontos que tocavam adipócitos, excluindo da contagem os adipócitos que tocavam a linha proibida. O V_v foi obtido pela

divisão dos pontos parciais (que tocavam a estrutura de interesse) pelo número de pontos totais. O número de perfis de adipócitos por área (Q_A) foi estimado pela contagem dos adipócitos encontrados dentro de uma área conhecida, gerada também pelo STEPanizer. Mais uma vez, foram excluídos os adipócitos que tangenciavam a linha proibida e o Q_A foi obtido pela divisão do número de perfis de adipócitos contados pela área conhecida em μm^2 . A área seccional média (ASM) dos adipócitos foi estimada pela fórmula: $ASM = V_v / 2 \times Q_A$.

3.10 Imunofluorescência e imunohistoquímica

Para realização da imunofluorescência, secções desparafinizadas e hidratadas do TAMi (5 μm) foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0, a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e, então, com glicina 2% e PBS/BSA 5% para bloqueio das ligações inespecíficas. Os cortes foram incubados “overnight” à 4°C com o anticorpo para UCP1 na diluição 1:50 em PBS/BSA 1%. Em seguida, foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo, na diluição 1:50 em PBS/BSA 1%. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e montadas com *Slow Fade Antifade* (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Imagens digitais imunofluorescentes foram obtidas utilizando a técnica de microscopia confocal (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Model C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

Após o mesmo protocolo de recuperação antigênica, bloqueios da peroxidase endógena e de ligações inespecíficas, as lâminas de intestino delgado (íleo) foram incubadas com anticorpo anti-occludina (Invitrogen, 40-4700, Waltham, MA, EUA, diluição 1:20) “overnight” a 4°C. Paralelamente, as lâminas do TAMi foram incubadas com anticorpos anti-UCP1 (Cusabio, PA025554ESR2HU, Houston, TX, EUA, diluição 1:150), anti-VEGFA (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; diluição 1:150) ou anti-CIDEA (Abcam, ab198204, Cambridge, Reino Unido, diluição 1:150) por 2 horas a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas de TABs foram incubadas com o mesmo anti-UCP1, na mesma diluição ou com o anticorpo anti-PARK2/PARKIN (Cusabio, CSB-PA020236, diluição 1:100). Todos os anticorpos foram diluídos em 1,5% de soro de cavalo (Vector Laboratories, CA, EUA).

Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado pan-específico por 10 minutos, seguidas de incubações com estreptavidina e peroxidase por cinco minutos. As imunorreações foram desenvolvidas em incubação com DAB por cinco minutos (kit Vectastain Universal Quick HRP, peroxidase, PK-7800, Vector Laboratories), e então as lâminas foram contracoradas com hematoxilina e eosina e montadas com Entellan (Merck). Em relação à UCP1 no TAMi e TABs e PARK2 no TABs, o % de imunodensidade foi estimado usando Image J e o plug-in deconvolução de cores conforme detalhado anteriormente (254).

3.11 Microscopia eletrônica

Fragmentos do ceco (1 mm^3) de três animais de cada grupo foram fixados em 2,5% de glutaraldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram, então, pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incorporadas em resina epóxi (48h a 60/70°C). Seções ultrafinas (60-80 nm de espessura) foram cortadas em ultramicrotomo (Leica UltraCut ultramicrotome, Wetzlar, Alemanha), e transferidas para grades metálicas, as quais foram contrastadas com 5% de acetato de uranila e 2% de citrato de chumbo e, depois, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL/JEM - 1200 EX (Instituto Nacional de Bioquímica e Ciência e Tecnologia de Bioimagem - CENABIO - UFRJ).

3.12 Amplificação por PCR 16S rDNA

As fezes presentes no intestino grosso (ceco) dos camundongos foram utilizadas para a extração de DNA microbiano e, posteriormente, análise da microbiota fecal por PCR em tempo real. Uma alíquota de aproximadamente 200 mg de fezes foi utilizada para extração de DNA usando o kit comercial “QIAamp® Fast DNA stool minikit” (Quiagen, Düsseldorf, Alemanha). Para cada amostra, o DNA foi extraído em duplicata para evitar viés e os extratos da mesma amostra foram agrupados. A quantificação, pureza

e concentração do DNA foram analisadas, especificamente, utilizando-se Qubit e eletroforese horizontal (gel de agarose a 1%). Os ensaios de PCR quantitativo em tempo real foram utilizados para quantificação relativa de determinados filos de microrganismos na microbiota intestinal dos camundongos do estudo através da detecção de genes de rRNA 16S (Filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*). Para a quantificação relativa, a abundância dos diferentes filos foi normalizada por $\Delta\Delta C_t$ da quantificação total de bactérias presente na amostra.

3.13 PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído do TAMi ou TABs (alíquota de 30 mg) e do intestino delgado (íleo) (alíquota de 70 mg) utilizando 700µL de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Posteriormente, foi adicionado 100µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, por dez minutos a 4°C). Em seguida, retirou-se o sobrenadante da fase aquosa correspondente ao RNA, foi adicionado 250 µL de álcool isopropílico seguido de centrifugação (11.200 rpm, por 10 minutos a 4°C) para precipitação e formação de um pellet de RNA. Em seguida, retirou-se o álcool isopropílico e o pellet foi ressuscitado com 500 µL de etanol (70%) com centrifugação (12.000 g, por 5 minutos a 4°C) para purificação do RNA. O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuscitado em 40 µL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectrometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando Oligo (dT) e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA) para RNAm.

A *beta-actina* foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados para o TAMi e o TABs e o *Gapgh* foi utilizado como controle endógeno para os genes selecionados para o intestino (Quadro 2). A eficiência para o gene alvo e controle endógeno foram aproximadamente iguais e foram calculados através de uma série de diluição de cDNA. As reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95°C) com quarenta ciclos, cada ciclo consistindo em 95°C por 10s e 60°C por 15s, seguida pela curva de melt (60 a 95°C com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa de mRNA foi

calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ onde $-\Delta C_t$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno (255). Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3 e estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Detalhamento dos primers utilizados

Gene	Forward	Reverse
<i>Beta-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA
<i>Ppara</i>	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<i>Prdm16</i>	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>Ucp3</i>	AGCAGTTCTACACCCCCAAG	GGCGTATCATGGCTTGAAAT
<i>Rβ3a</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGA
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Pgc1a</i>	AACCACACCCACAGGATCAGA	TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
<i>Cidea</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAAGTGTCCCGTCATCTGT
<i>Cidec</i>	AGCTAGCCCTTTCCCAAG	TAGAGGGTTGCCCTTCACGTT
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Nrlp3</i>	ATGCTGCTTCGACATCTCCT	GTTTCTGGAGGTTGCAGAGC
<i>Pparγ</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Lbp</i>	GGTGGCTGCTGAATCTCTTC	TCTGCTGTGACTGGCAGAGT
<i>Vegfa</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG
<i>Ocludina</i>	CCTTCTGCTTCATCGCTTCC	AGCGCTGACTATGATCACGA
<i>Claudina-12</i>	GCCTTGCTACTCTGCCTGAT	CAGACACTTGCCAGTTTGA
<i>Jam-a</i>	AAGTCGGGGGATCTGATCTT	CACATTCAGCTCCACAGCAT
<i>Gapdh</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<i>Slc6a8</i>	TTGGGTTTATGGAGCTGACC	AGGACCAGCACCATTTTCATC
<i>Serca2b</i>	TGTGAATGATGCTCCTGCTC	GCCACAATGGTGGAGAAGTT
<i>Ryr2</i>	GCTTGAAAGACACCGAGGAG	TAGAGAGCCATCTGCCACCT
<i>Pink1</i>	TGAGGAGCAGACTCCCAGTT	AGTCCCCTCCACAAGGATG
<i>Fis-1</i>	GCCCCTGCTACTGGACCAT	CCCTGAAAGCCTCACACTAAGG
<i>Drp-1</i>	ATGCCAGCAAGTCCACAGAA	TGTTCTCGGGCAGACAGTTT

Fonte: A autora, 2023.

3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão e analisados por Teste t de Student durante o período de indução das alterações metabólicas (até 12 semanas) e por análise de variância (ANOVA) de um fator com teste de Brown-Forsythe e Welch e

pós teste Dunnett T3, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos utilizando-se o índice de significância com $p < 0,05$ (GraphPadPrism, versão 9.3, CA, EUA).

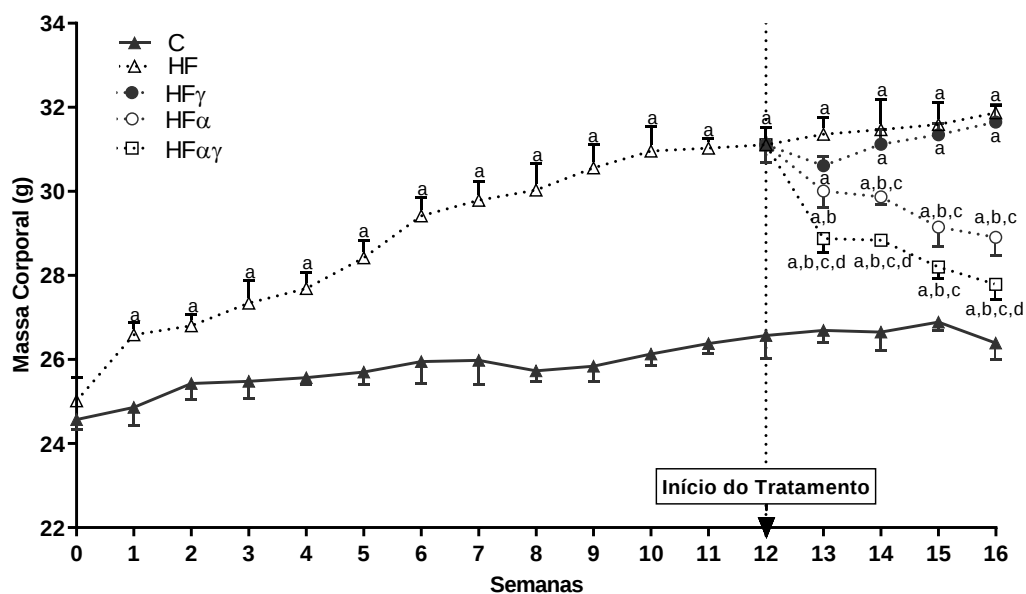
4. RESULTADOS

4.1 Indução do sobrepeso e resistência à insulina

4.1.1 Massa corporal e ingestão alimentar

Os grupos C e HF iniciaram o experimento (semana 0) sem diferença estatística na MC. Após uma semana da ingestão de dieta, o grupo HF apresentou aumento da MC (+7% vs. C), o que perdurou até a semana 16 (+21% vs. C). Os agonistas PPAR α e PPAR α/γ reduziram a MC (-9% para HF α vs. HF e -13% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF). Em contrapartida, o grupo HF γ não apresentou diferença significativa na MC em relação ao grupo HF (Figura 6). A ingestão energética foi maior nos grupos que consumiram a dieta hiperlipídica (HF: $64,22 \pm 0,31$ kJ, HF γ : $64,17 \pm 1,69$ kJ, HF α : $62,70 \pm 1,02$ kJ, HF $\alpha\gamma$: $63,38 \pm 1,11$ kJ) em comparação ao grupo C ($48,22 \pm 0,30$ kJ, Figura 7). Não houve diferença estatística na ingestão alimentar em gramatura, o que descarta a necessidade de grupos *pair-feeding* destacando que a redução da MC foi devido ao tratamento.

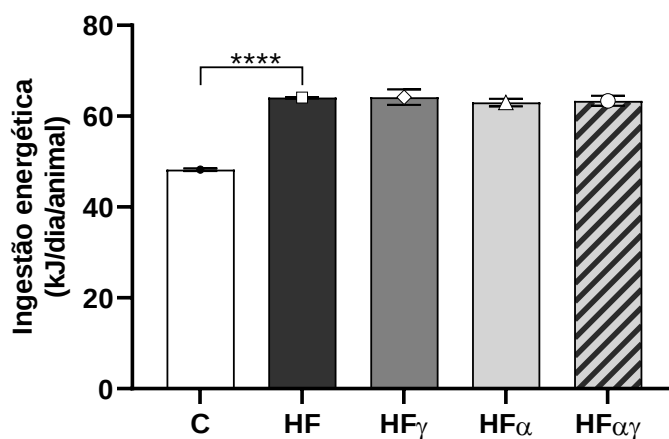
Figura 6 – Evolução da massa corporal



Legenda: Primeiras semanas (um a doze) referem-se ao período de indução da obesidade, e as semanas seguintes (doze a dezesseis) correspondem à fase de tratamento. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, $n = 10$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq HF$; $c \neq HF\gamma$; $d \neq HF\alpha$ conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 7 – Ingestão energética



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, $n=10$ por grupo. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

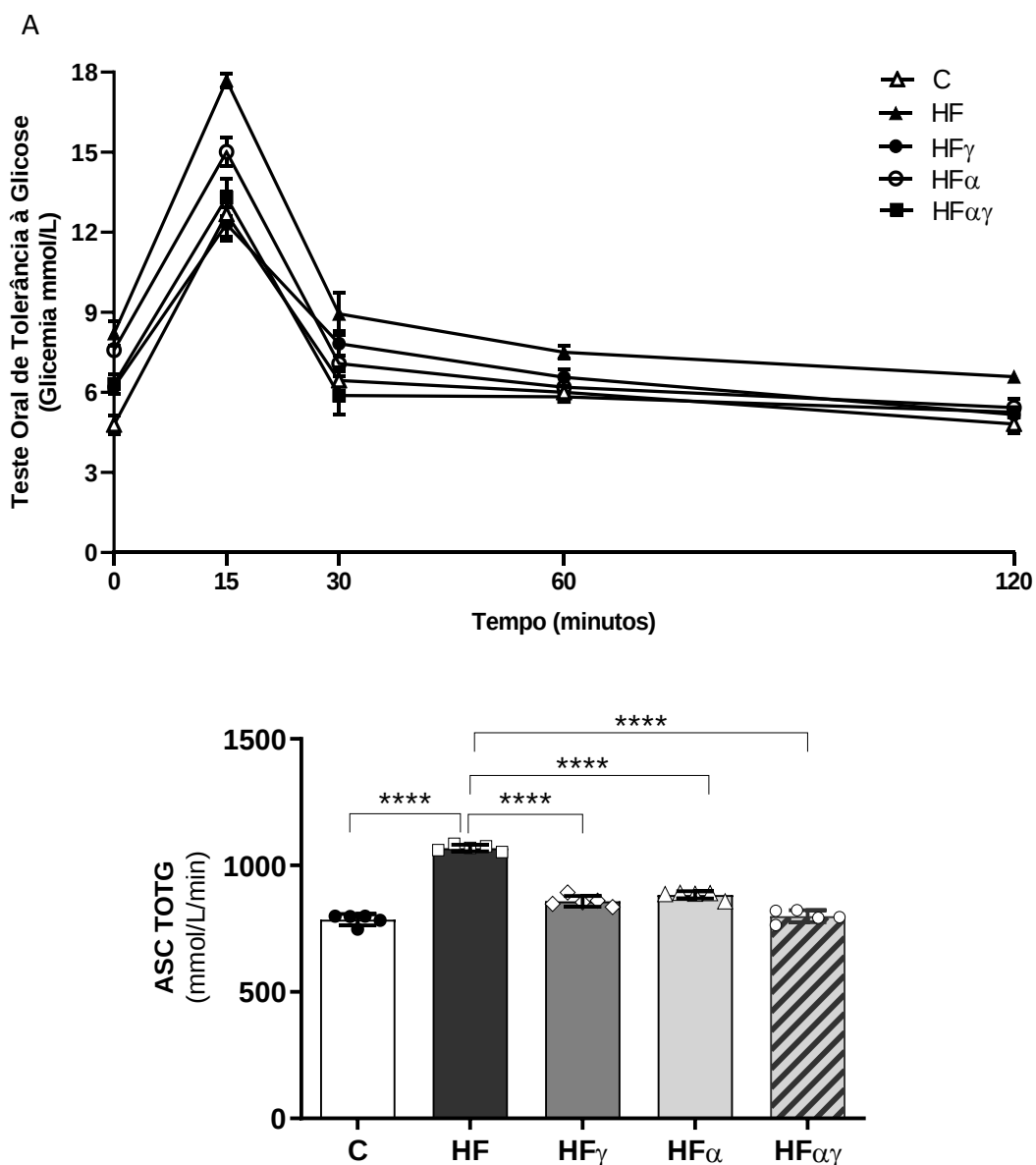
4.1.2 Metabolismo de carboidratos

A área sob a curva (ASC) do TOTG (Figura 8A e 8B) revelou intolerância oral à glicose no grupo HF por meio de aumento significativo da ASC (+36% para HF vs. C). Os tratamentos atenuaram a intolerância oral à glicose, produzindo ASC menor que o grupo HF (HF γ : -20%; HF α : -17%; HF $\alpha\gamma$: -25%). Além disso, o sinergismo PPAR α/γ reverteu a intolerância oral à glicose, pois o grupo HF $\alpha\gamma$ não apresentou diferença na ASC em comparação ao grupo C. Em concordância com os dados do TOTG, o grupo HF apresentou uma maior concentração plasmática de insulina quando comparado ao grupo C (+90%, Quadro 3), enquanto apenas o grupo HF $\alpha\gamma$ apresentou concentrações de insulina mais baixas do que o grupo HF (-44%, Quadro 3), não apresentando diferença estatística com o grupo C, promovendo uma reversão da hiperinsulinemia.

Em relação a resistência à insulina, o valor de FIRI apresentou aumento no grupo HF quando comparado ao grupo C (+208% para HF vs C; Quadro 3), embora todos os tratamentos tenham atenuado a resistência à insulina expressando redução do FIRI, o tratamento com tesaglitazar se mostrou mais eficaz (-26% para HF γ vs HF; -15% para HF α vs HF; e -54% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Quadro 3).

A resistência à insulina no grupo HF relaciona-se à redução da adiponectina plasmática (-81% para HF vs C; Quadro 3) e aumento da concentração plasmática de leptina (+163% para HF vs C; Quadro 3). Por outro lado, os grupos tratados apresentaram aumento da adiponectina (HF γ : +44%; HF α : +275%; e HF $\alpha\gamma$: +1.127%;) e redução da leptina plasmática (HF γ : -56%; HF α : -63%; e HF $\alpha\gamma$: -62%; Quadro 3) quando comparados com o grupo HF.

Figura 8 – Teste oral de tolerância à glicose



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=10 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

Quadro 3 – Análises plasmáticas

Parâmetros	C	HF	HF γ	HF α	HF $\alpha\gamma$
FIRI	18,46 $\pm$ 2,07	56,92 $\pm$ 2,56 ^{a,c,d,e}	42,02 $\pm$ 1,59 ^{a,d,e}	48,38 $\pm$ 3,14 ^{a,e}	26,23 $\pm$ 3,87
Insulina (pg/mL)	668,8 $\pm$ 53,84	1274 $\pm$ 143,4 ^{a,e}	1177 $\pm$ 36,73	1.126 $\pm$ 94,91	718,8 $\pm$ 77,18
Adiponectina (ng/mL)	11.913 $\pm$ 482,1	2238 $\pm$ 135,3 ^{a,c,d,e}	3.219 $\pm$ 203,2 ^{a,d,e}	8390 $\pm$ 257,1 ^{a,e}	27.467 $\pm$ 397,7 ^a
Leptina (ng/mL)	3,292 $\pm$ 0,43	8,662 $\pm$ 0,95 ^{a,c,d,e}	3,790 $\pm$ 0,53	3,186 $\pm$ 0,32	3,288 $\pm$ 0,36

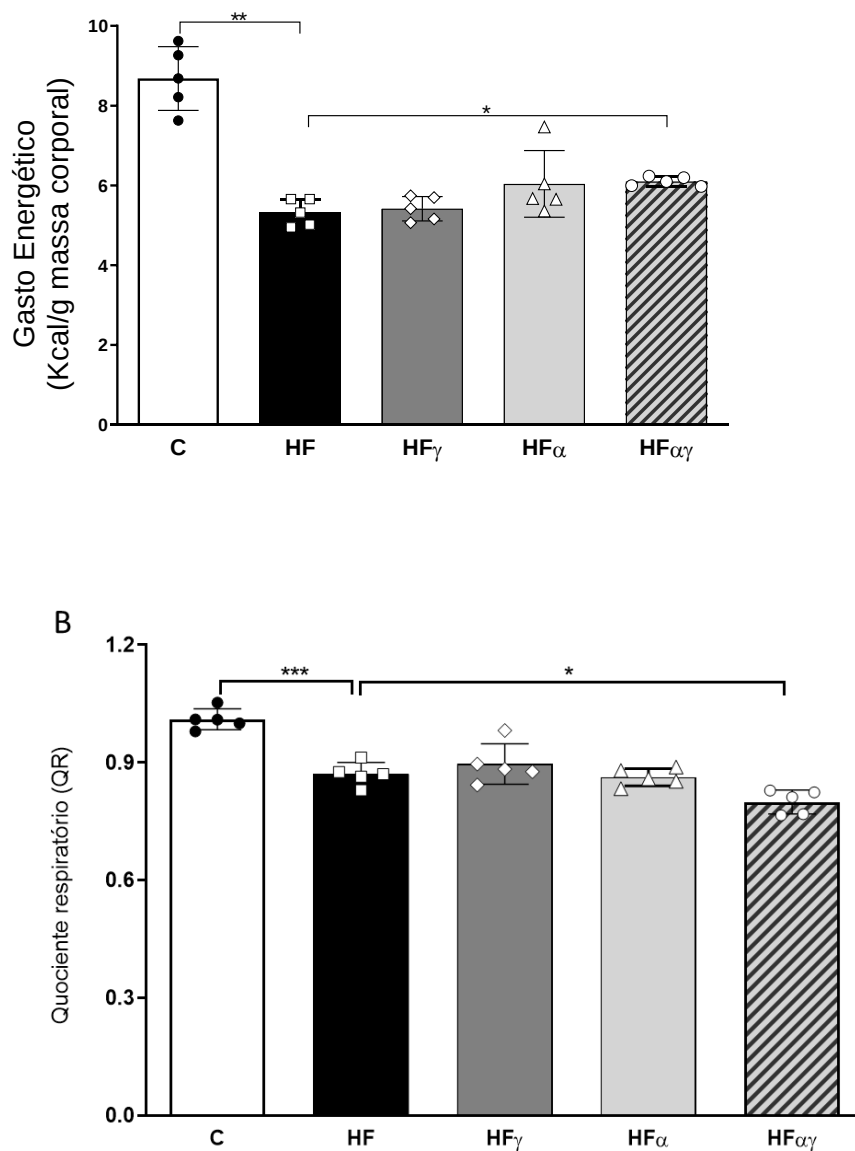
Legenda: Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, n = 5. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a $\neq$ C; b $\neq$ HF; c $\neq$ HF γ ; d $\neq$ HF α ; e $\neq$ HF $\alpha\gamma$; conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

4.1.3 Gasto energético e quociente respiratório

Em relação ao gasto energético, o grupo HF apresentou valores diminuídos em relação ao grupo C (-25%, Figura 9A). Apenas o grupo HF $\alpha\gamma$ apresentou maior gasto energético que o grupo HF (+21%), sem diferença do grupo C (Figura 9A). O quociente respiratório de próximo à 0,8 implica que o grupo HF $\alpha\gamma$ possivelmente usou uma mistura de lipídios e carboidratos como combustível energético preferencial (Figura 9B).

Figura 9 – Gasto energético e quociente respiratório



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF_γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF_α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF_{αγ}).

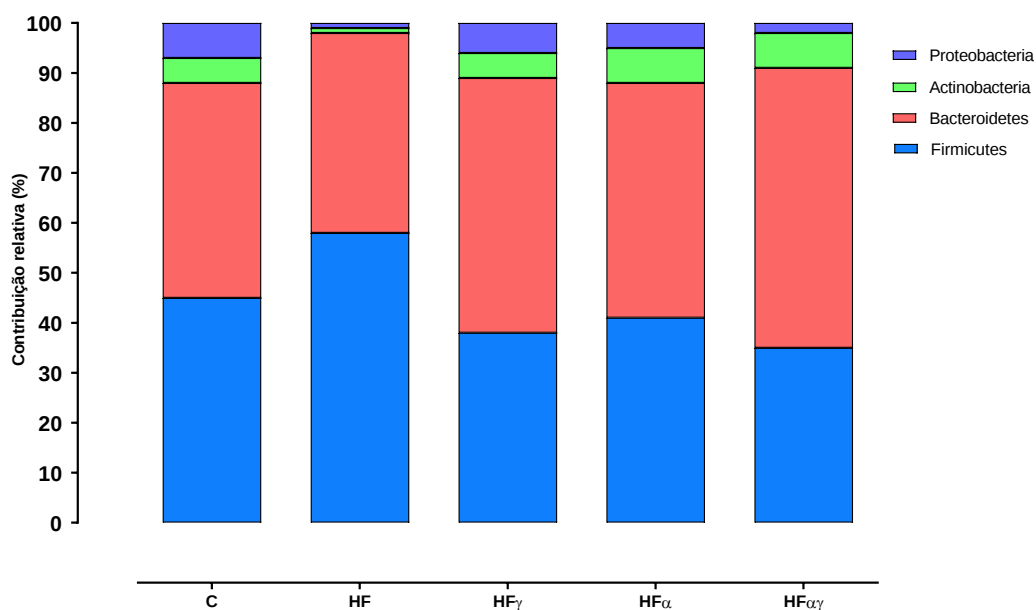
Fonte: A autora, 2023.

4.2 Intestino

4.4.1 Relação *Firmicutes/Bacteroidetes*

A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* foi avaliada por PCR16S rDNA. O grupo HF apresentou aumento de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes* em relação ao grupo C. Todos os tratamentos melhoraram a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* e, curiosamente, todos os grupos tratados apresentaram diminuição do filo *Proteobacteria* (Figura 10).

Figura 10 - Genes de rRNA 16S da microbiota intestinal



Legenda: Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF_γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF_α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF_{αγ}).

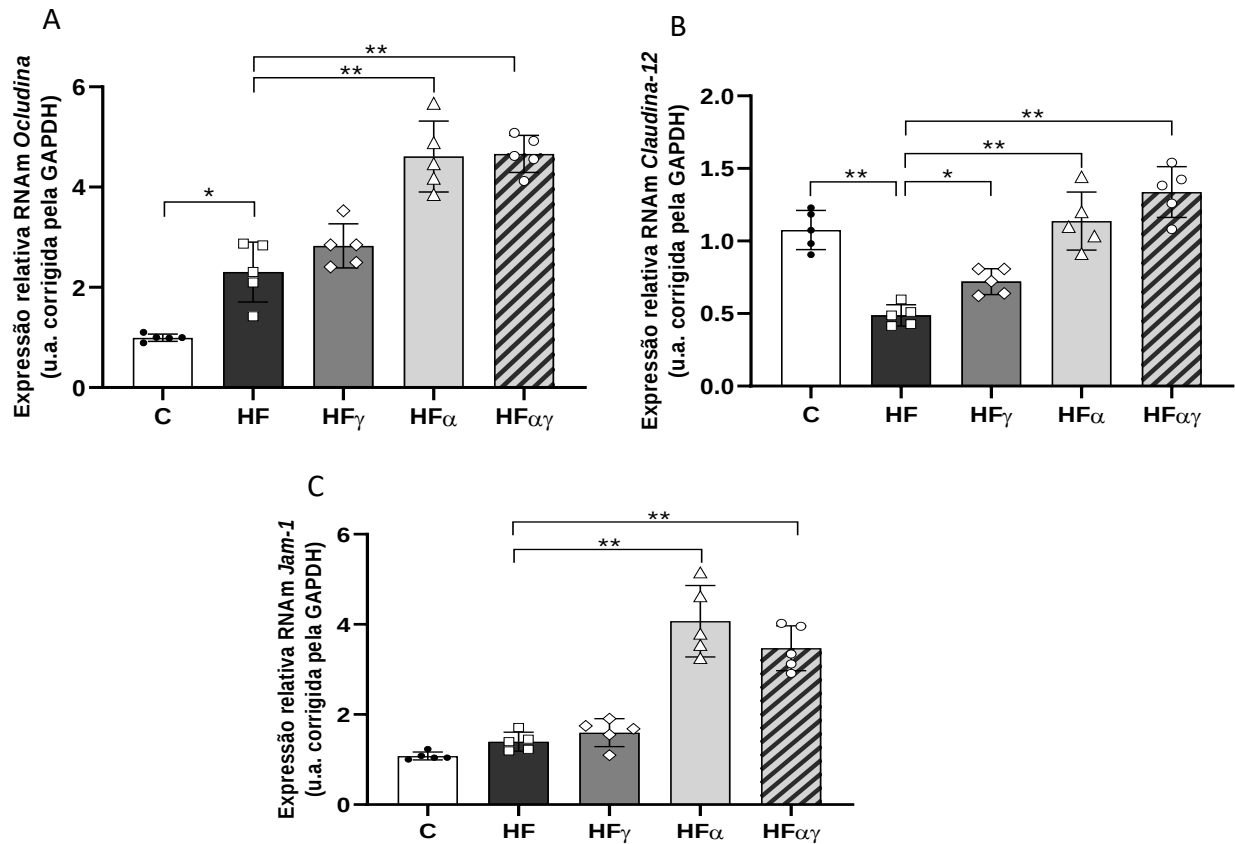
Fonte: A autora, 2023.

4.2.2 Expressão gênica e proteica das junções oclusivas no intestino e concentração plasmática de LPS

Em relação à expressão relativa de mRNA das proteínas das junções oclusivas no íleo, o HF e o HF γ mostraram expressão de *Ocludina* semelhante. Os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram maior expressão de *Ocludina* do que o grupo HF (HF α : +91% e HF $\alpha\gamma$: +100%, Figura 11A). A expressão da proteína ocludina foi semelhante à expressão gênica, com imunomarcagem positiva nos grupos C e tratados (Figura 12). A expressão do gene *Claudina-12* diminuiu no grupo HF (-55% vs. C, Figura 11B), enquanto todos os grupos tratados mostraram maior expressão do que o grupo HF (HF γ : +48%, HF α : +133% e HF $\alpha\gamma$: +174%, Figura 11B). A expressão de *Jam-a* não diferiu entre os grupos C e HF, nem entre os grupos HF e HF γ . No entanto, os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram maior expressão de *Jam-a* do que o grupo HF (HF α : +191% e HF $\alpha\gamma$: +185%, Figura 11C).

A disbiose intestinal (avaliada pela relação *Firmicutes/Bacteroidetes*) e as alterações gênicas das junções oclusivas concordam com o aumento da concentração plasmática de LPS no grupo HF (+40% para HF vs. C, Figura 13). Em contraste, os grupos tratados apresentaram concentrações plasmáticas de LPS reduzidas comparadas ao grupo HF (HF γ : -13%, HF α : -17% e HF $\alpha\gamma$: -18%, Figura 13).

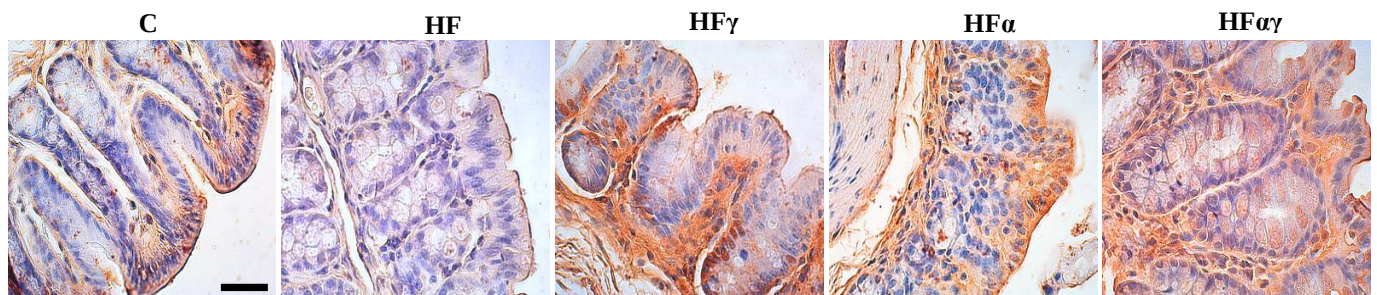
Figura 11 - Expressão relativa de RNA mensageiro de genes relacionadas às junções oclusivas no intestino



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

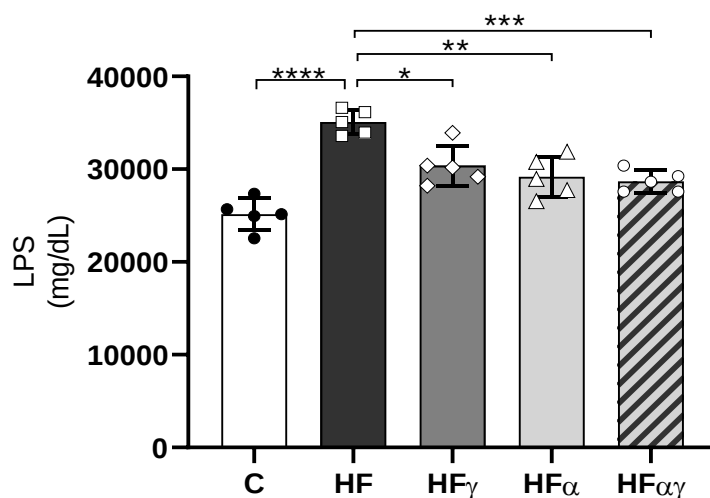
Figura 12 – Imunomarcagem para ocludina



Legenda: Intestino delgado (íleo) imunomarcado com anticorpo anti-occludina e contracorado com hematoxilina (barra de escala=10 μ m). Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 13 – Análise plasmática do LPS



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=10 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF_γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF_α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF_{αγ}).

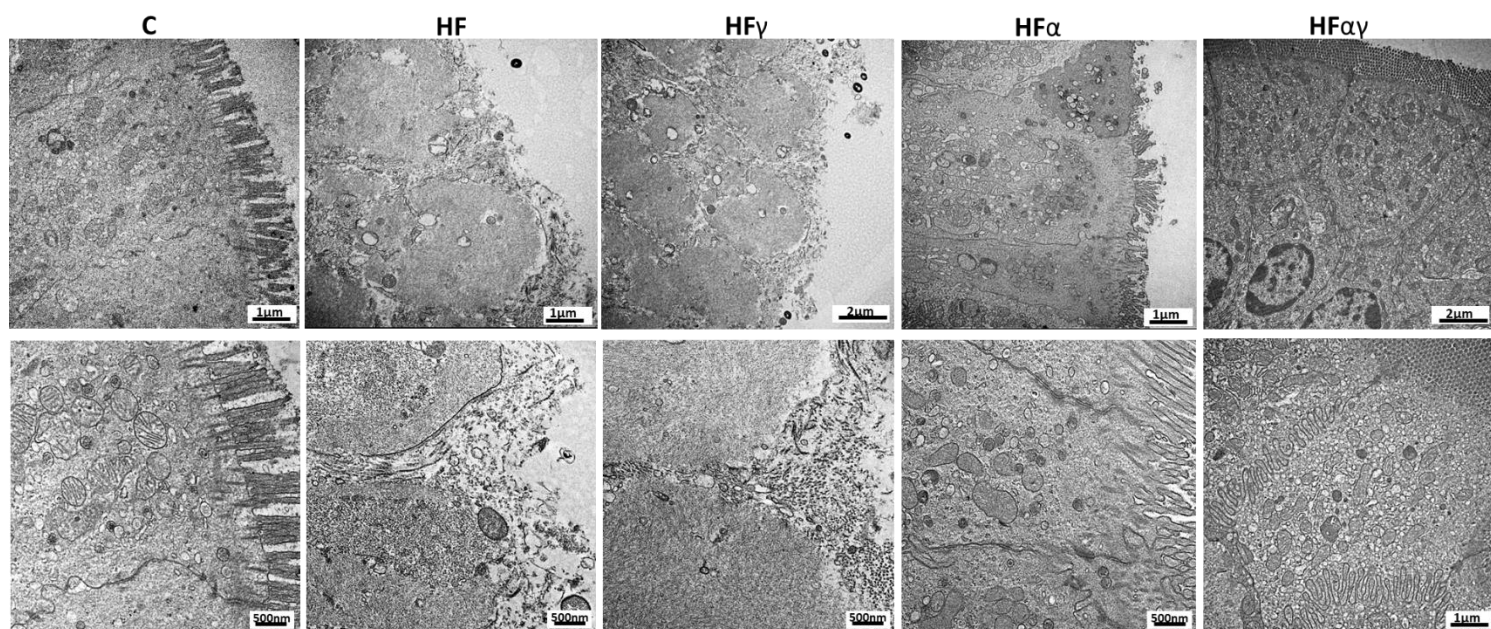
Fonte: A autora, 2023.

4.2.3 Ultraestrutura do intestino grosso (ceco)

As imagens referentes à microscopia eletrônica de transmissão (Figura 14) mostram ultraestrutura do ceco bem preservada no grupo C, com células apresentando microvilosidades regulares e uniformes em sua superfície apical e presença de complexos juncionais ancorando enterócitos vizinhos e mitocôndrias preservadas. Ao contrário, os enterócitos dos animais HF exibiram ausência de microvilosidades na superfície apical, além de citoplasma desordenado, mitocôndrias danificadas e junções oclusivas desorganizadas, o que facilita o transporte paracelular de LPS, configurando o intestino permeável (do inglês “*leaky gut*”). A ultraestrutura do íleo do grupo HF_γ se assemelhou ao grupo HF. O grupo HF_α exibiu microvilosidades irregulares e não uniformes e junções oclusivas e mitocôndrias menos danificadas do que os grupos HF e HF_γ. No entanto, apenas o grupo HF_{αγ} resgatou a ultraestrutura das junções oclusivas e se assemelhou ao grupo C, juntamente com a expressão restaurada de mRNA de *Ocludina*, *Claudina-12* e *Jam-a*, sugerindo que o intestino permeável provocado pelos danos da dieta hiperlipídica

foram restaurados após o tratamento com HF $\alpha\gamma$. Em seguida, realizamos análises para avaliar o efeito da endotoxemia no TAMi.

Figura 14 – Ultraestrutura do ceco



Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão do ceco. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

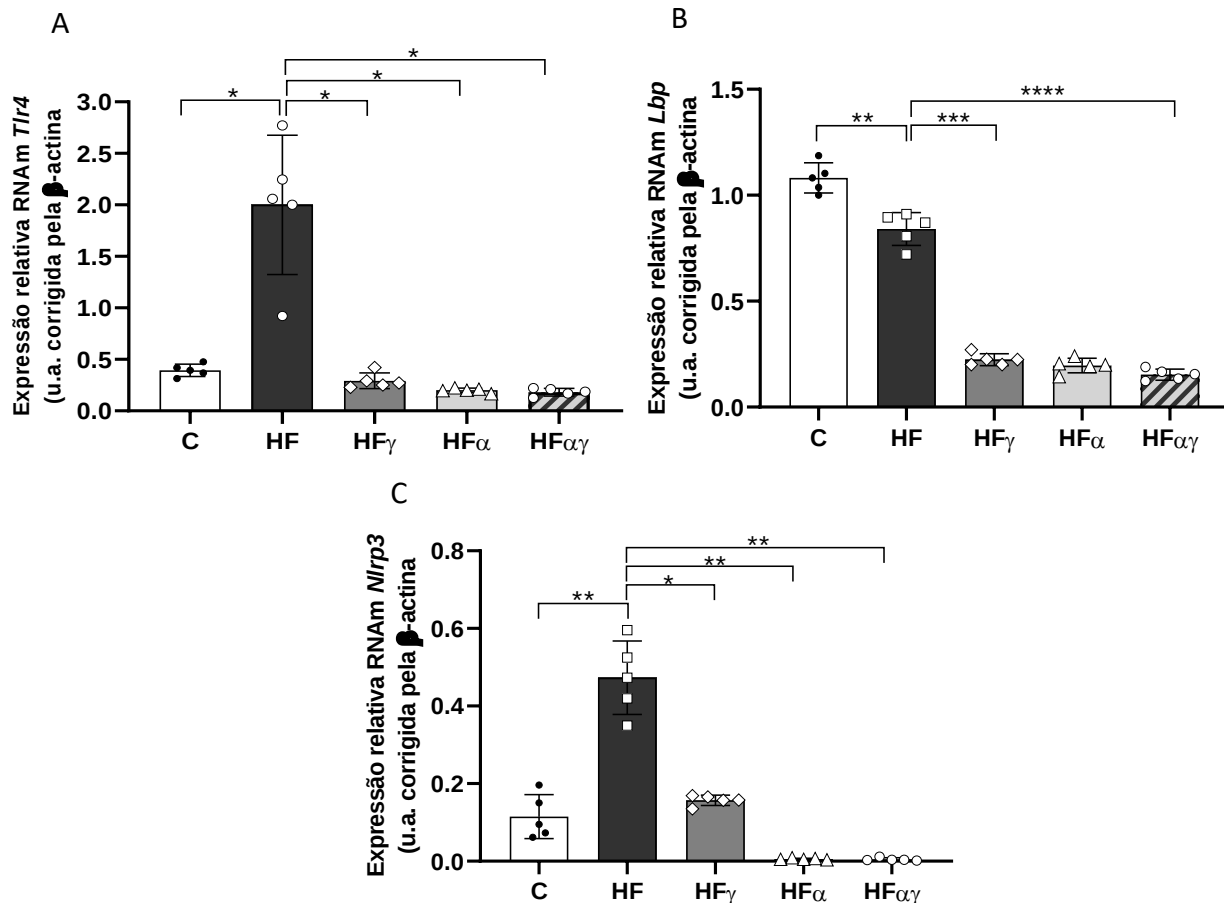
4.3 Tecido adiposo marrom

4.3.1 Expressão gênica relacionada à endotoxemia no TAMi

As concentrações plasmáticas de LPS concordam com a expressão gênica de *Tlr4* no TAMi, com um aumento no grupo HF (+407% vs. C) e diminuição após os tratamentos (-85% para HF γ , -90% para HF α e -91% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 15A). A expressão gênica de *Lbp*, proteína envolvida na fase aguda da resposta imune a infecções bacterianas gram-negativas e na liberação de citocinas em resposta ao LPS bacteriano, aumentou no grupo HF (+22% vs. C). Os grupos tratados apresentaram menor expressão de *Lbp* que o grupo HF (HF γ : -73%, HF α : -77% e HF $\alpha\gamma$: -82%, Figura 15B). Em resposta à endotoxemia, a expressão gênica de *Nlrp3*, um inflamassoma, apresentou um aumento no grupo HF em comparação com o grupo C (+311%). No entanto, os grupos tratados

apresentaram uma menor expressão de *Nlrp3* do que o grupo HF (-69% em HF γ , -99% em HF α e -99% em HF $\alpha\gamma$, Figura 15C).

Figura 15 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Tlr4*, *Lbp* e *Nlrp3* no TAMi



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=10 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

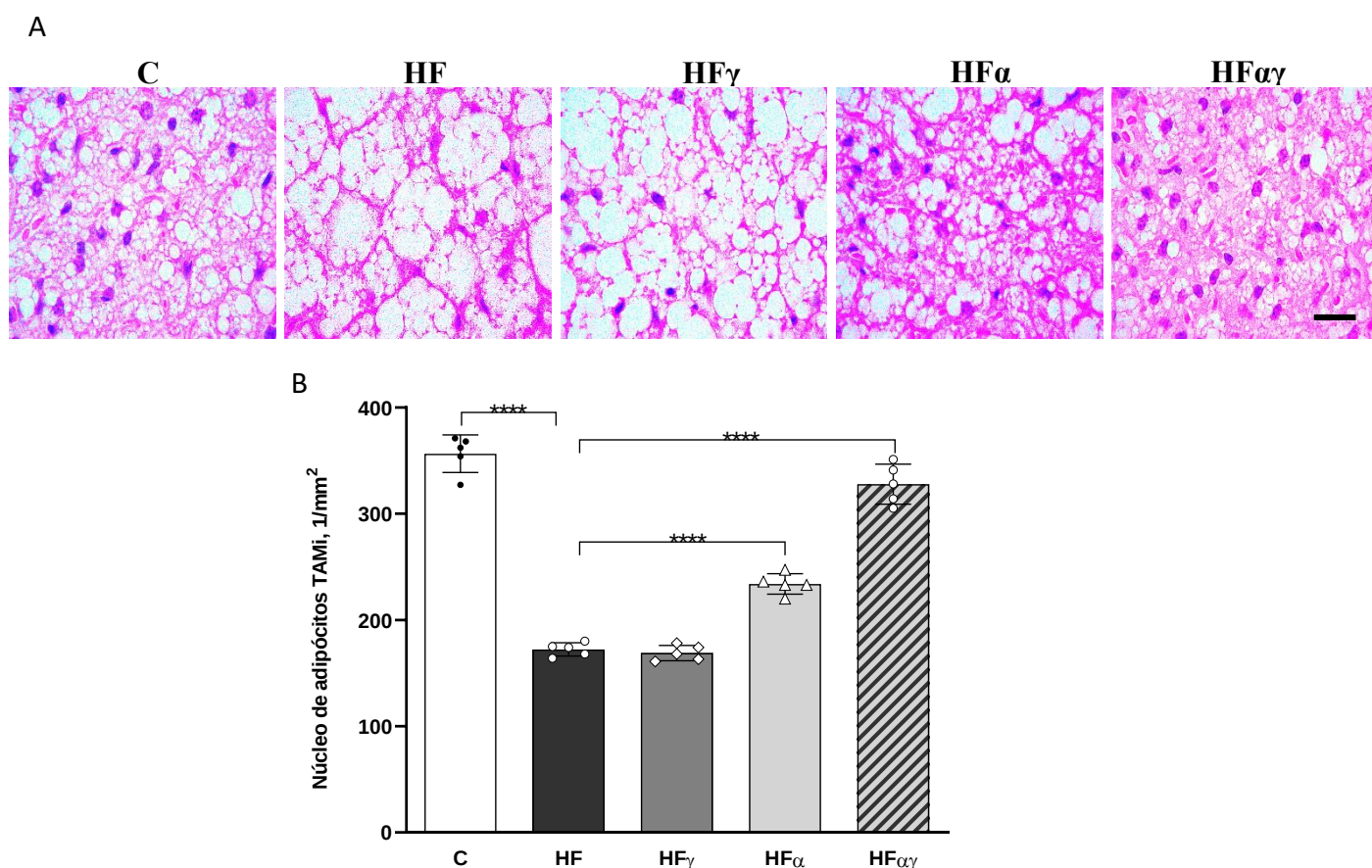
4.3.2 Histologia e estereologia do TAMi

O grupo HF apresentou aumento pronunciado no acúmulo de gotículas de gordura em relação ao grupo C, exibindo um fenótipo de adipócito branco, um fenômeno conhecido como *whitening* (Figura 16A). O tratamento com agonista PPAR α recuperou

parcialmente a citoarquitetura TAMi. No entanto, o sinergismo PPAR α / γ produziu uma redução evidente no acúmulo de gordura nos adipócitos marrons do grupo HF $\alpha\gamma$ (Figura 16A). Essas observações sugerem aumento da atividade metabólica, com citoarquitetura do TAMi semelhante ao grupo C.

Os dados de estereologia corroboram com os achados histológicos, pois o grupo HF apresentou menor QA [núcleos] que o grupo C (-52%), confirmando o *whitening*. Por outro lado, os grupos HF α e HF α / γ mostraram maior QA [núcleos] que o grupo HF (+36% e +90%, Figura 16B), e o sinergismo PPAR α / γ resgatou a citoarquitetura do TAMi, pois este grupo não mostrou diferença do grupo C (Figura 16B).

Figura 16 – Histologia e estereologia do TAMi



Legenda: A: Fotomicrografias representativas do TAMi dos grupos experimentais corado com hematoxilina-eosina. Objetiva de 100x e barra de calibração = 20 μ m. B: QA de núcleos do TAMi. Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

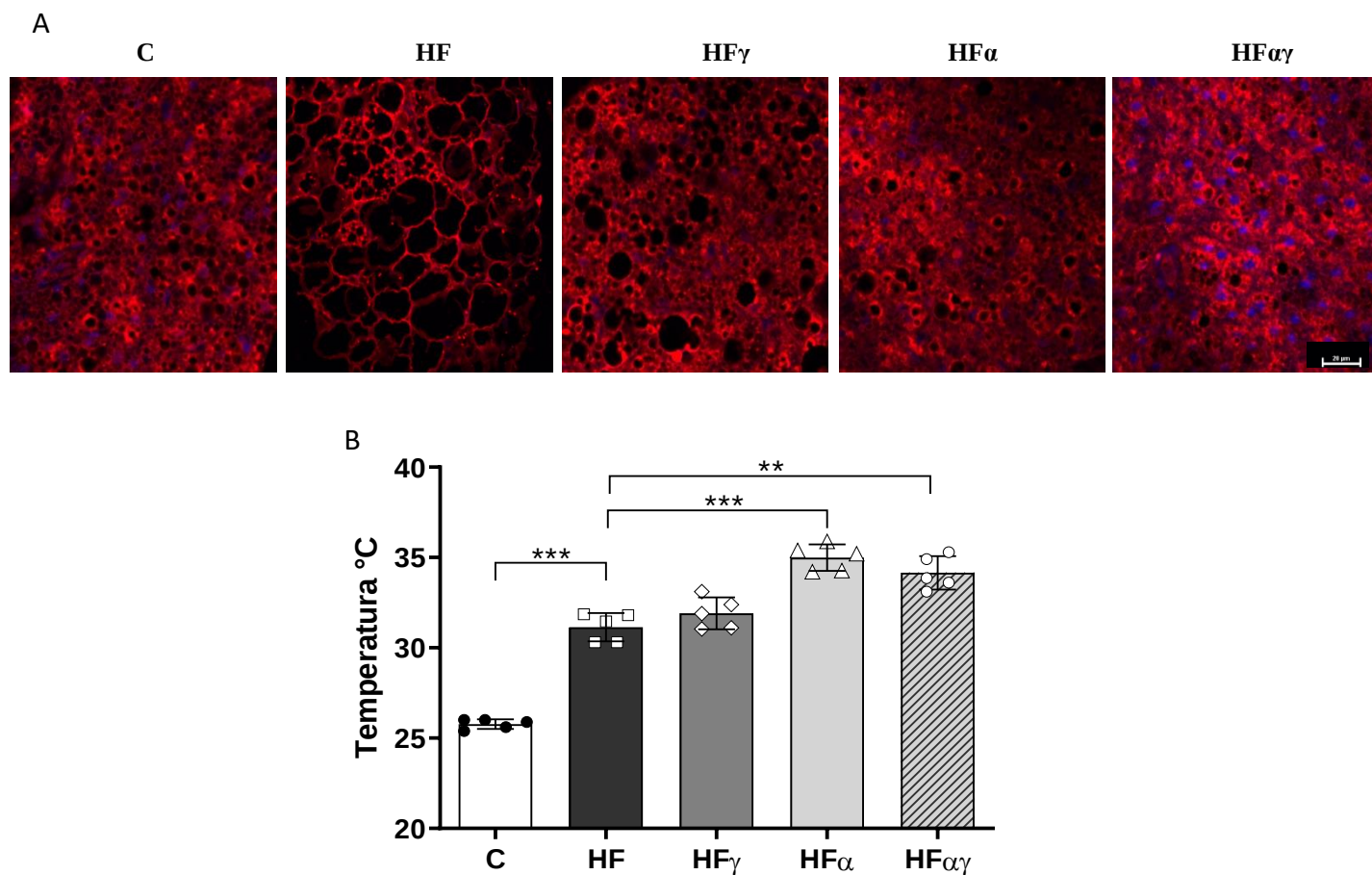
4.3.3 Imunofluorescência e termografia

A expressão proteica de UCP1 avaliada por imunofluorescência corrobora os dados anteriores, visto que após o tratamento com tesaglitazar houve uma marcação positiva para UCP1 quando comparada ao grupo HF.

O percentual de imunodensidade para UCP1 (estimado em lâminas imunomarcadas para UCP1 pelo método de imunoperoxidase) seguiu a expressão gênica, onde o grupo HF mostrou a menor expressão de UCP1 (-39% vs. C), e todos os grupos tratados mostraram expressão aumentada de UCP1 (+77% para HF γ vs. HF; +90% para HF α vs. HF; e +132% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF). Digno de nota, o sinergismo PPAR α/γ produziu a maior expressão de UCP1 no grupo HF $\alpha\gamma$, ultrapassando todos os grupos, até mesmo o grupo HF α (+22%).

A termografia infravermelha mostrou aumento da temperatura corporal nos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ quando comparado ao grupo HF (+12% para HF α vs. HF; +10% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 17B). O grupo tratado com pioglitazona não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo HF. Esses dados sugerem que o tratamento com WY-14643 e Tesaglitazar promoveram um aumento da termogênese adaptativa.

Figura 17 – Imunofluorescência para UCP1 no TAMi e temperatura corporal



Legenda: A: Imunofluorescência do TAMi marcado com dapi (azul, núcleo) e anticorpo anti-UCP1 (vermelho). Mesmo aumento para todas as fotos, barra de calibração = 20 μ m. B: Temperatura corporal. Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

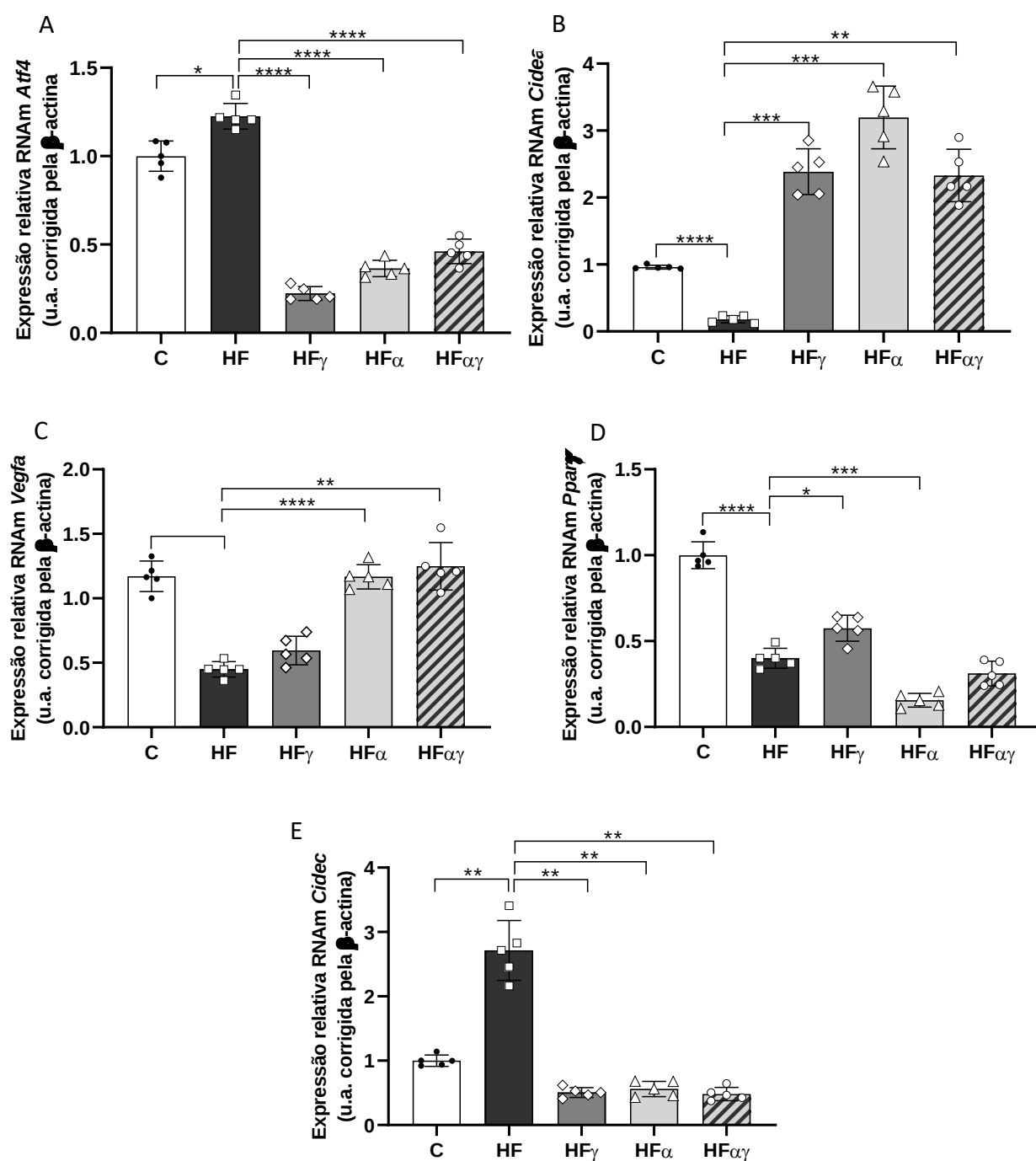
4.3.4 Expressão gênica e proteica relacionada ao metabolismo e atividade endócrina do TAMi

A expressão gênica de *Atf4*, um marcador de morte celular, apresentou aumento no grupo HF (+23% vs. C) e redução nos grupos tratados em comparação com o grupo HF (HF γ : -82%, HF α : -70% e HF $\alpha\gamma$: -62%, Figura 18A). *Cidea*, um marcador de lipólise, foi reduzido no HF (-81% vs. C) e aumentado nos grupos tratados (+1.223% para HF γ

vs. HF, +1.672% para HF α vs. HF, e +1.191% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 18B). *Vegfa*, uma batocina que induz a proliferação de células endoteliais e inibe a apoptose, diminuiu no grupo HF (-62% vs. C, Figura 18C). Os grupos HF α e HF α/γ (que tinham multilocularidade preservada) apresentaram maior expressão de *Vegfa* que o grupo HF (HF α : +160%; e HF $\alpha\gamma$: +178%, Figura 18C). A expressão de *Ppar γ* reduziu no grupo HF (-60% vs. C) e aumentou no grupo HF γ (+44% vs. HF, Figura 18D). Em contraste, o grupo HF α apresentou expressão de *Ppar γ* reduzida (-61% vs. HF, Figura 18D). *Cidec*, um transcrito *Ppar γ* , apresentou a maior expressão no grupo HF (+171% vs. C). Por outro lado, os grupos tratados apresentaram baixa expressão de *Cidec* (-81% para HF γ vs. HF; -79% para HF α vs. HF; e -82% para HF $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 18E).

As imunohistoquímicas para VEGFA (Figura 19) e CIDEA (Figura 19) seguiram os resultados de expressão gênica, onde o *whitening* observado no grupo HF concorda com a menor expressão de VEGFA e a maior expressão de CIDEA. Os grupos tratados com a citoarquitetura multilocular do TAMi mais preservada (HF α e HF $\alpha\gamma$) exibiram as imunomarcações para VEGFA mais expressivas, seguidas por reações CIDEA mais fracas.

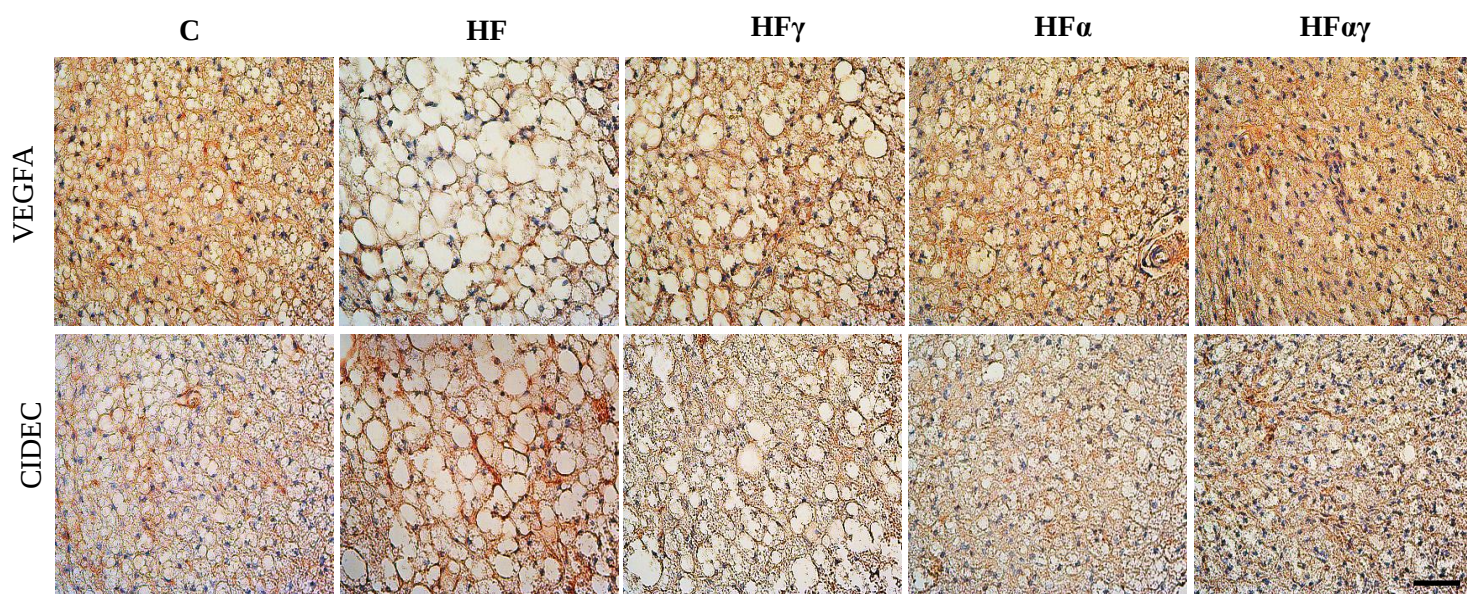
Figura 18 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Atf4*, *Cidea*, *Vegfa*, *Pparγ* e *Cidec* no TAMi



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 19 – Imunohistoquímica para VEGFA e CIDEA no TAMi



Legenda: Imunomarcação para VEGFA e CIDEA no TAMi, barra de calibração = 10μm. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HFγ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HFα); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HFαγ).

Fonte: A autora, 2023.

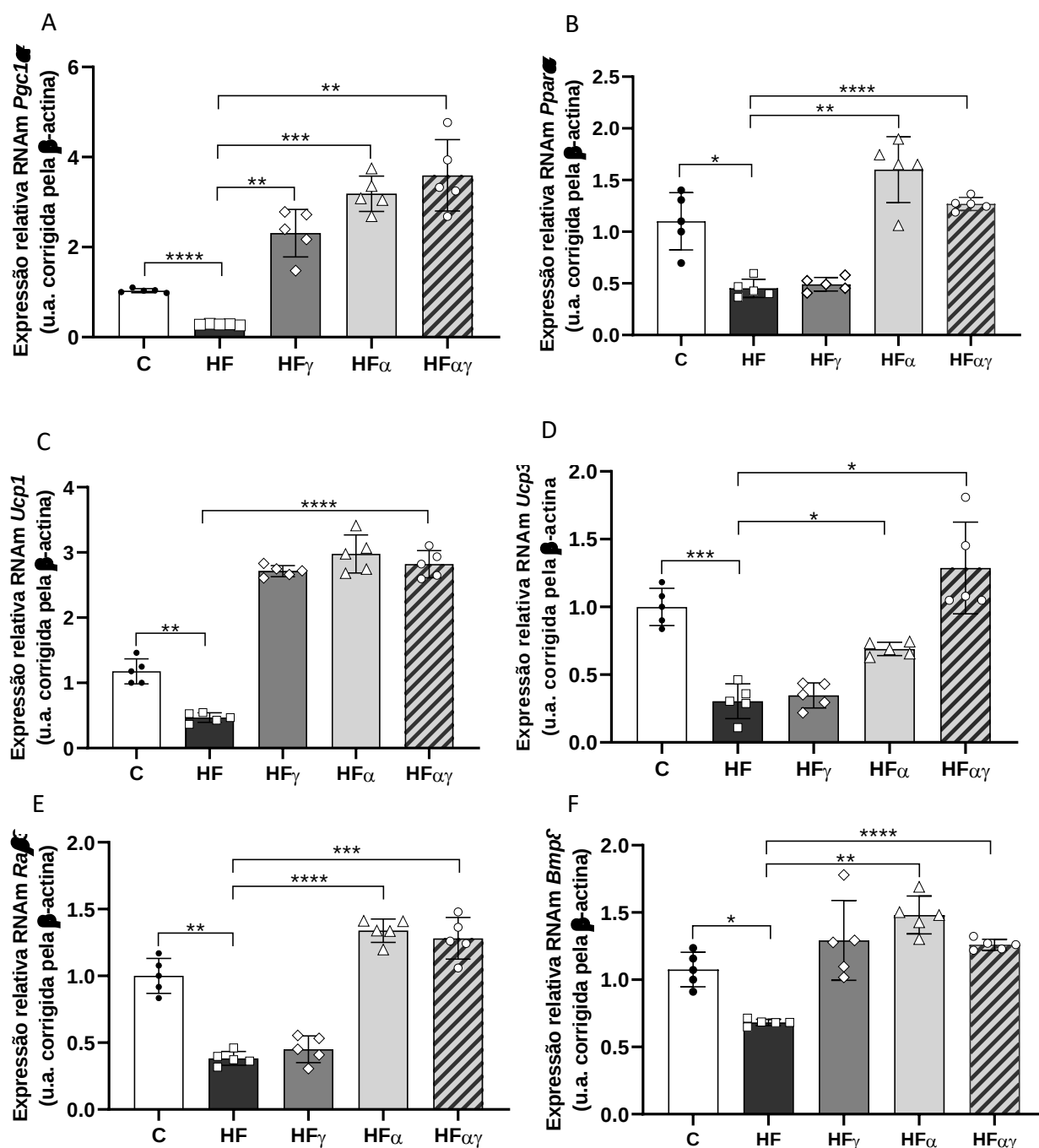
4.3.5 Expressão gênica relacionada à atividade termogênica

O *Pgc1α* é um regulador essencial da biogênese mitocondrial e um regulador transcricional de *Ppara* e *Ucp1*. A expressão gênica de *Pgc1α* reduziu no grupo HF (-73% vs. C) e aumentou nos grupos tratados (+716% para HFγ vs. HF; +1.029% para HFα vs. HF; e +1.173% para HFαγ vs. HF, Figura 20A).

A expressão de *Ppara* apresentou redução no grupo HF (-59% vs. C) e aumento nos grupos HFα e HFαγ em comparação com HF: +254% em HFα, +181% em HFαγ, Figura 20B. *Ucp1*, um transcrito do *Ppara*, e efetor da termogênese diminuiu no grupo HF (-60% vs. C) e aumentou nos grupos tratados (+481% para HFγ vs. HF; +538% para HFα vs. HF; e + 504% para HFαγ vs. HF, Figura 20C). A expressão de *Ucp3* seguiu os resultados de *Ucp1*, com expressão diminuída no grupo HF (-70% vs. C) e valores aumentados nos grupos HFα e HFαγ: +127% em HFα e +323% em HFαγ vs. HF, Figura D.

Da mesma forma, a expressão de *Raβ3*, o iniciador da termogênese sem tremores, também apresentou valores menores no grupo HF do que no grupo C (-62%) e maiores nos grupos HFα e HFαγ do que no grupo HF (+240% para HFα vs. HF e +235% para HFαγ vs. HF, Figura 20E). A expressão de *Bmp8b*, uma batocina que sensibiliza o TAMi à estimulação simpática, diminuiu no grupo HF (-37% vs. C) e aumentou nos grupos tratados (+75% para HFγ vs. HF; +117% para HFα vs. HF; e +85% para HFαγ vs. HF, Figura 20F).

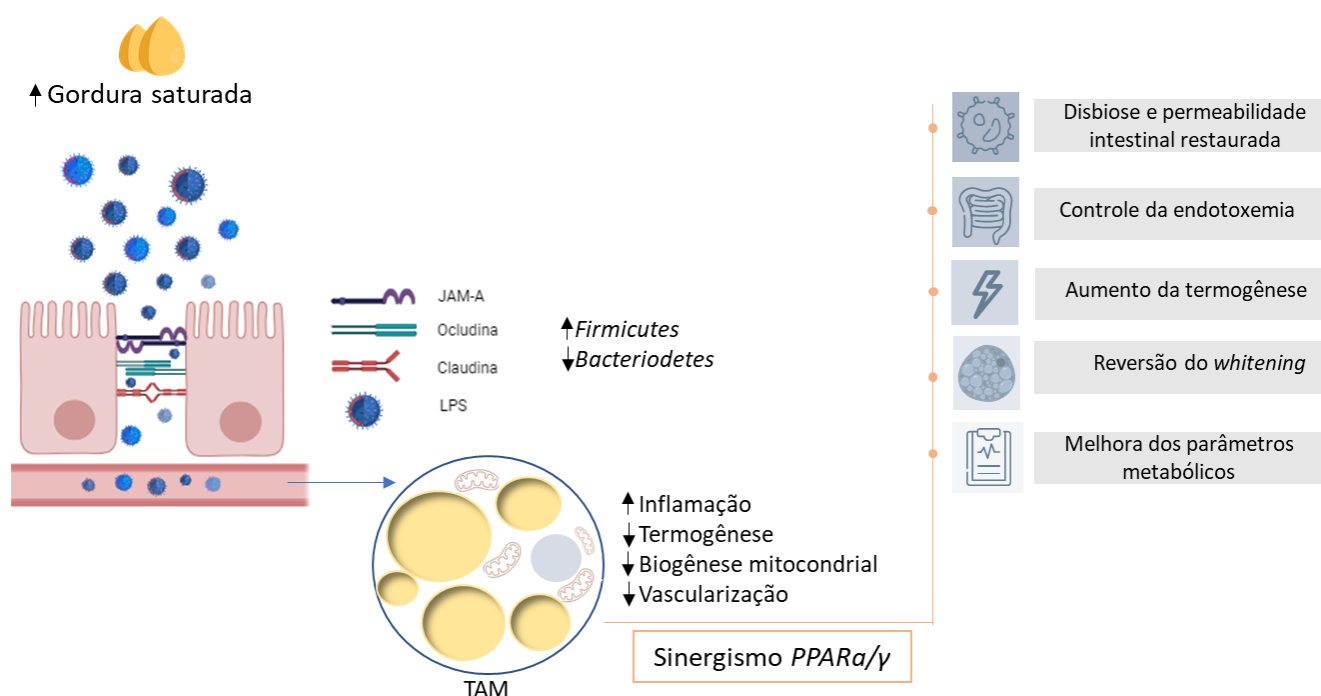
Figura 20 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Pgc1a*, *Ppara*, *Ucp1*, *Ucp3*, *Raβ3* e *Bmp8b* no TAMi



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF_{γ}); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF_{α}); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar ($HF_{\alpha\gamma}$).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 21 – Resumo dos principais achados do intestino e TAMi



Legenda: A dieta HF causou disbiose, reduziu a expressão gênica das junções oclusivas e alterou a ultraestrutura do íleo, levando à endotoxemia que atingiu o TAMi por ativação do eixo *Tlr4-Nlrp3*, potencializando o whitening. O sinergismo $PPAR\alpha/\gamma$ aliviou a disbiose e resgatou a ultraestrutura e expressão gênica das junções oclusivas, diminuindo os sinais pró-inflamatórios para TAMi. Como resultado, os animais $HF\alpha\gamma$ apresentaram adipócitos marrons competentes com estrutura multilocular normalizada, aumento da expressão de marcadores termogênicos e do gasto energético. A ativação dupla $PPAR\alpha/\gamma$ pode tratar a obesidade por modulação do eixo intestino-tecido adiposo.

Fonte: A autora, 2023. Feita com Biorender (www.biorender.com)

4.4 Tecido adiposo branco subcutâneo

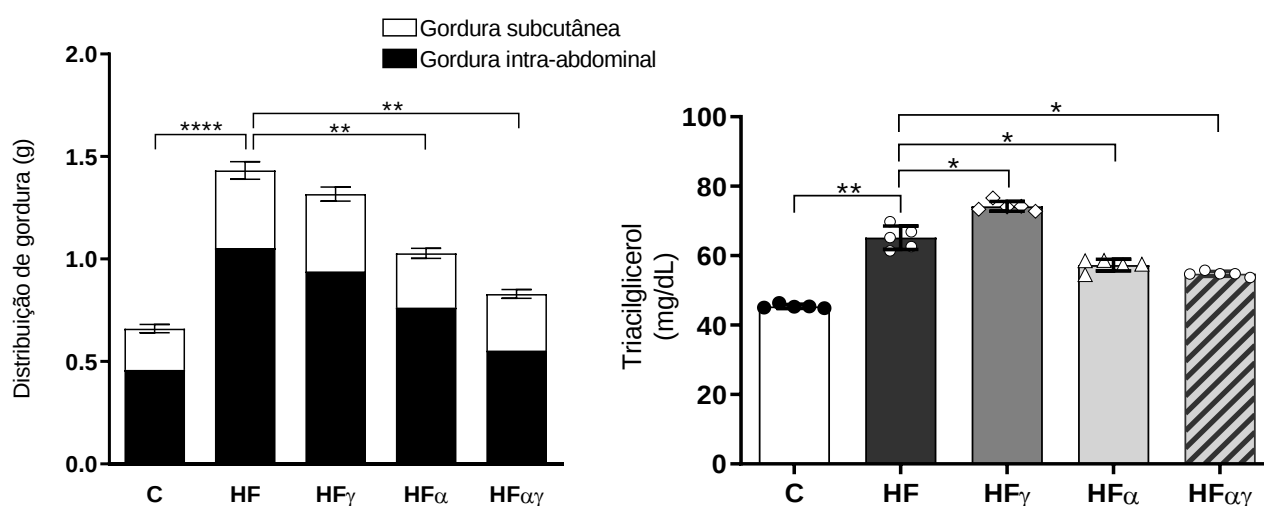
4.4.1 Distribuição de gordura e triacilglicerol plasmático

A distribuição de gordura no compartimento intra-abdominal mostrou que o grupo HF apresentou maior acúmulo de gordura que o grupo C (+129%; Figura 22A). O tratamento com pioglitazona não afetou esse depósito de gordura, mas os grupos $HF\alpha$ e $HF\alpha\gamma$ apresentaram depósitos de gordura intra-abdominal menores do que o grupo HF ($HF\alpha$: -27%; e $HF\alpha\gamma$: -48%; Figura 21A). Da mesma forma, o grupo HF apresentou

maiores depósitos de gordura subcutânea do que o grupo controle (+87%; Figura 22A), e apenas os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram depósitos de gordura subcutânea reduzidas (-29% para HF α vs HF; -27% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 21A).

No que diz respeito aos resultados do TAG plasmático, o grupo HF apresentou hipertrigliceridemia em comparação ao grupo C (+44%, Figura 22B), bem como o grupo HF γ que apresentou um aumento da concentração de TAG comparado ao grupo HF (+14%). Por outro lado, os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram redução desse parâmetro em comparação ao grupo HF (-12%; -16%, respectivamente, Figura 22B).

Figura 22 – Distribuição de gordura e triacilglicerol plasmático



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas a seguir: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

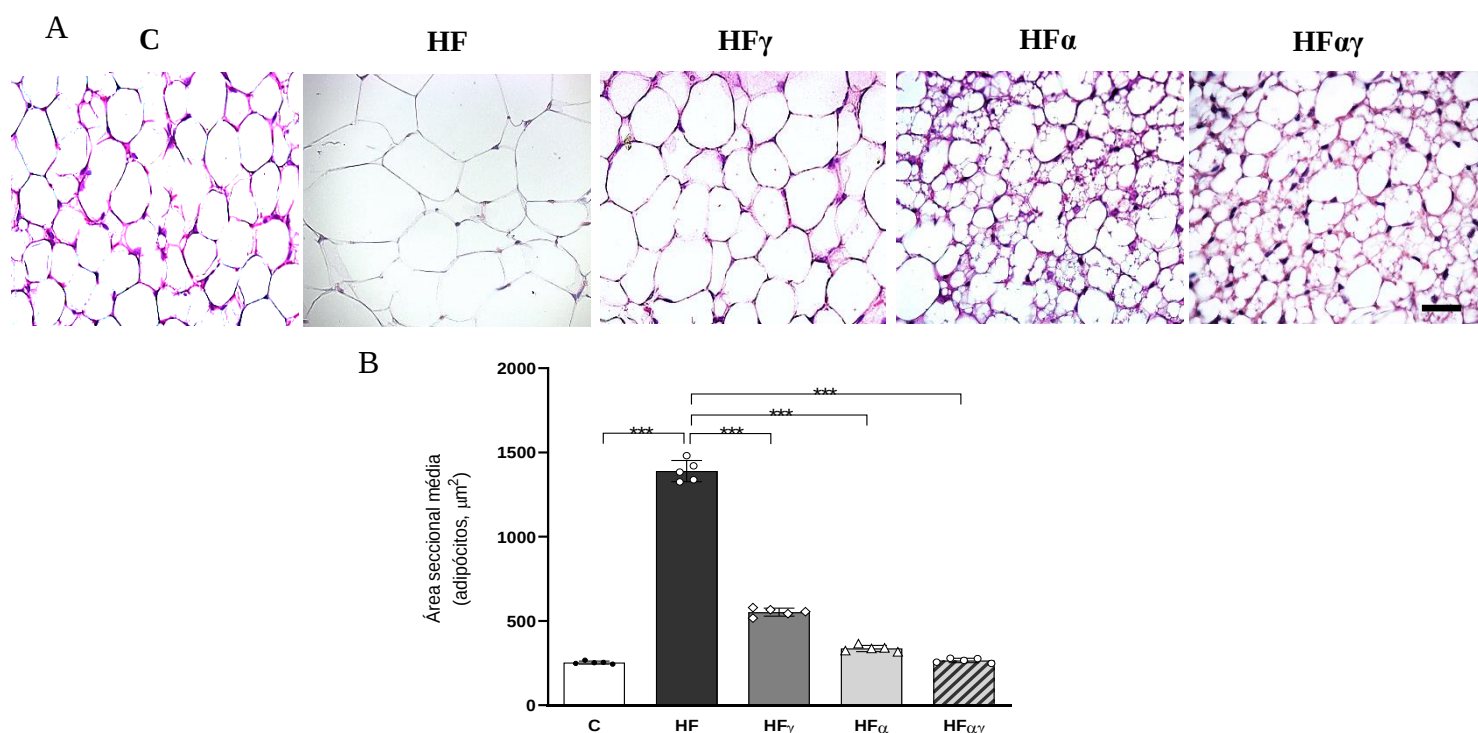
4.4.2 Histologia, estereologia e imunohistoquímica no TABs

O grupo C exibiu adipócitos uniloculares de tamanho normal. Em contraste, o grupo HF apresentou uma área transversal média dos adipócitos aumentada (+448%; Figura 23B), com os adipócitos uniloculares hipertrofiados no TABs (Figura 23A). O

fenômeno de *browning* não ocorreu no grupo HF γ . No entanto, HF α e HF $\alpha\gamma$ exibiram adipócitos beges entremeados com adipócitos brancos uniloculares de tamanho normal (Figura 23A), caracterizando o *browning* do TABs. Portanto, todos grupos tratados mostraram diminuição da área transversal média dos adipócitos (-60% para HF γ vs HF; -76% para HF α vs sus HF; e -81% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; figura 23B).

De acordo com resultados anteriores, a termografia infravermelha mostrou alta temperatura nos grupos com adipócitos multiloculares beges. Os adipócitos multiloculares observados nas lâminas histológicas dos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ foram positivos para UCP1 e PARK2 (Figura 24). A estimativa da imunodensidade revelou diminuição dos valores de UCP1 no grupo HF (-27% para HF vs C; Figura 24) e PARK2 (-19% para HF vs C; Figura 24). Os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ tiveram valores de imunodensidade aumentados (UCP1: +44% para HF α vs HF e +65% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; PARK2: +124% para HF α vs HF e +141% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 25).

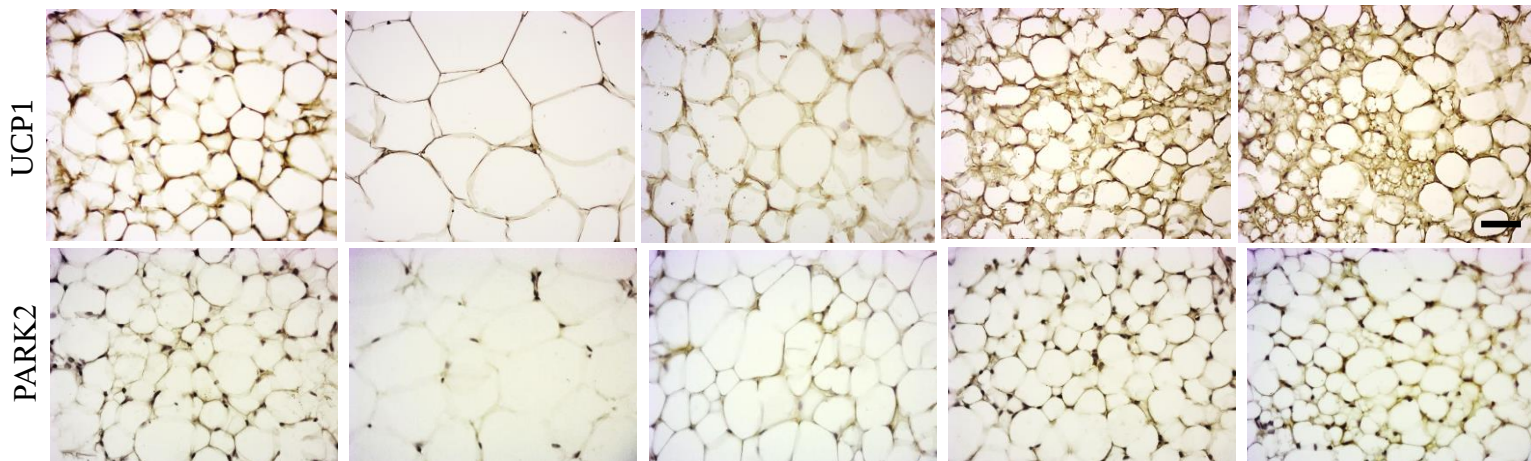
Figura 23 – Histologia do TABs e área seccional média de adipócitos



Legenda: A: Fotomicrografias representativas do TABs dos grupos experimentais corado com hematoxilina-eosina. Objetiva de 40x e barra de calibração = 40 μm . B: Área seccional média de adipócitos. Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

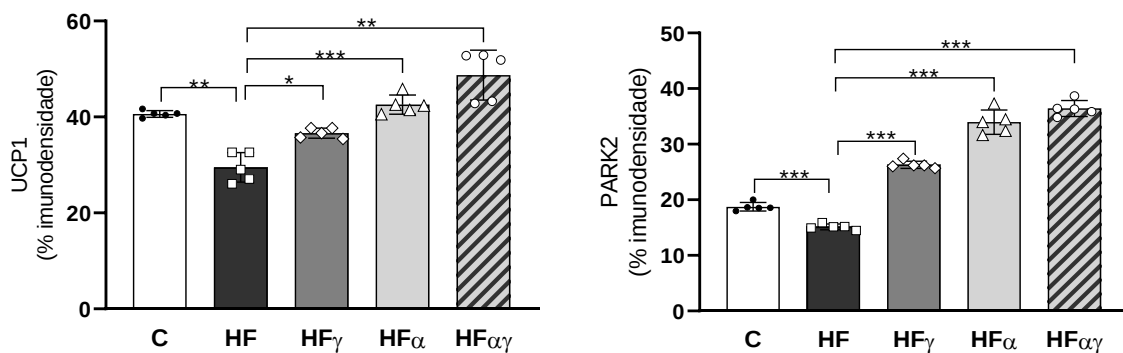
Figura 24 - Imunohistoquímica para UCP1 e PARK2 no TABs



Legenda: Imunohistoquímica do tecido adiposo branco subcutâneo, barra de calibração = 40μm. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 25 - Imunodensidade para UCP1 e PARK2 no TABs



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

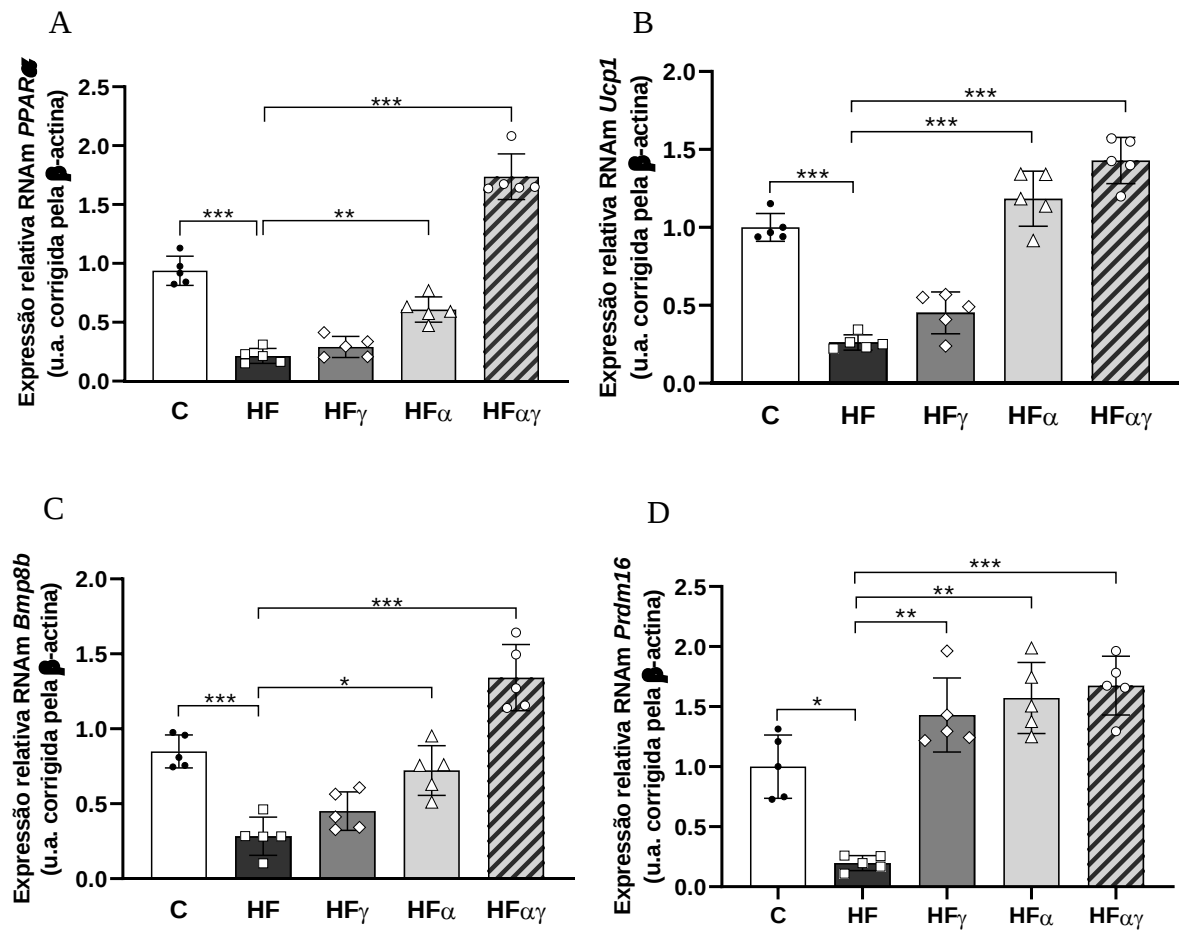
4.4.3 Expressão gênica relacionada à atividade termogênica dependente de UCP1

A expressão gênica de *Ppara*, um fator transcricional que transcreve genes termogênicos, diminuiu no grupo HF (-77% para HF vs C, Figura 26A) e aumentou nos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ (+184% para HF α vs HF; e +710% para HF $\alpha\gamma$ vs HF, Figura 26A). *Ucp1*, um gene alvo do *Ppara*, mostrou comportamento semelhante: diminuição da expressão no grupo HF (-74%, Figura 26B) e aumento nos grupos que exibiram o *browning* TABs (+352% para HF α vs HF; e +710% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 26B). O *Bmp8b* apresentou redução no grupo HF em comparação ao grupo C (67%; Figura 26C) e aumento nos grupos HF α e HF α/γ (+155% para HF α vs HF; e +374% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 26C). O aumento da expressão de *Prdm16* no TABs confirma a manutenção do fenótipo bege nos grupos com adipócitos multiloculares (+696% para HF α vs HF; e +747% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 26D). Em contraste, o grupo HF diminuiu a expressão de *Prdm16* comparado ao grupo C (80%; Figura 26D).

4.4.4 Expressão gênica relacionada à atividade termogênica independente da UCP1

A expressão gênica de *Slc6a8*, um transportador de creatina, foi menor no grupo HF que no grupo C (-36%; Figura 27A). Em contraste, os grupos que exibiram *browning* do TABs apresentaram aumento da expressão de *Slc6a8* (+121% para HF α vs HF; e +120% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 27A). Quanto ao ciclo de Ca²⁺ no adipócito bege, o gene *Serca2b* apresentou maior expressão nos grupos tratados do que no grupo HF (+726% para HF α vs HF; +499% para HF γ vs HF; e +766% para HF $\alpha\gamma$ vs HF; Figura 27B), com expressão reduzida no grupo HF (-80% vs C; Figura 27B). Além disso, a expressão *Ryr2* se assemelhou à *Serca2b*, com aumento no HF α (+128%) e HF $\alpha\gamma$ (+363%) comparado com o grupo HF (Figura 27C). O grupo HF também apresentou expressão reduzida de *Ryr2* (-48% vs C; Figura 27C).

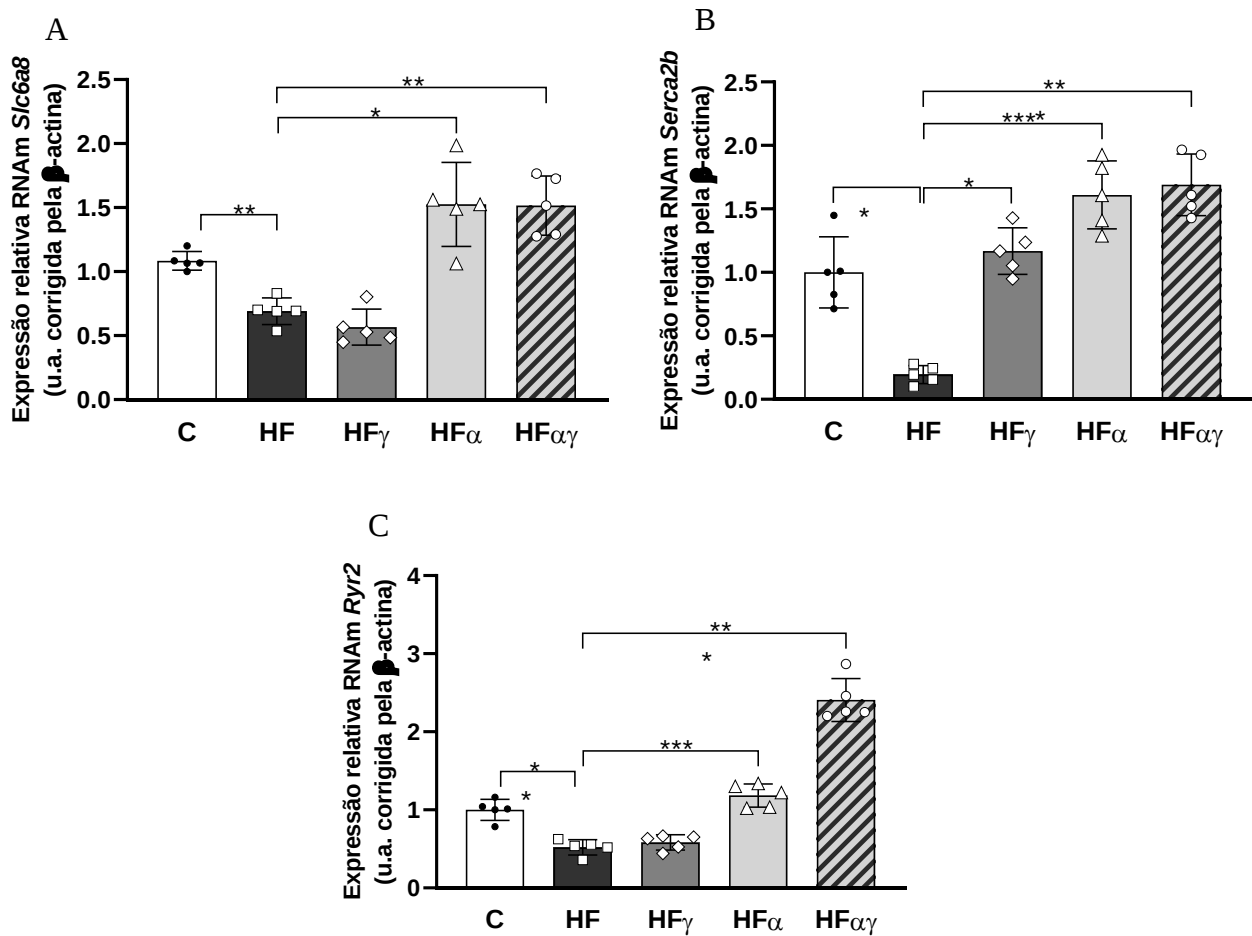
Figura 26 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Ppara*, *Ucp1*, *Bmp8b* e *Prdm16* no TABs



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF_γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF_α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF_{αγ}).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 27 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Slc6a8*, *Serca2b* e *Ryr2* no TABs



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF $_{\gamma}$); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF $_{\alpha}$); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $_{\alpha\gamma}$).

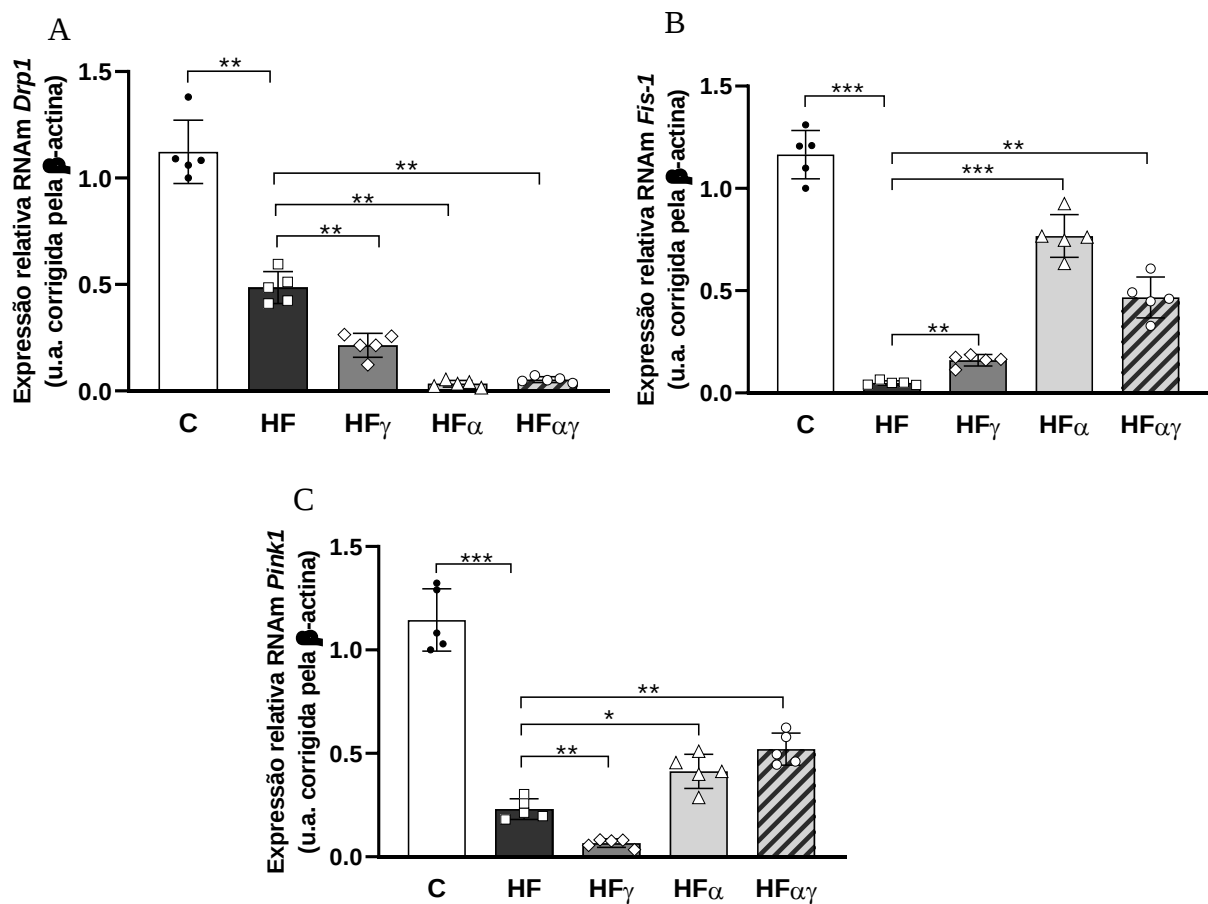
Fonte: A autora, 2023.

4.4.5 Expressão gênica relacionada à disfunção mitocondrial

Em relação à fissão mitocondrial, todos os grupos tratados apresentaram menor expressão de *Drp-1* que o grupo HF (-56% para HF $_{\gamma}$ vs HF; -89% para HF $_{\alpha}$ vs HF; e -89% para HF $_{\alpha\gamma}$ vs HF; Figura 28A). Em contraste, *Fis-1* exibiu maior expressão nos grupos tratados (+227% para HF $_{\gamma}$ vs HF; +1.465% para HF $_{\alpha}$ vs HF; e +858% para HF $_{\alpha\gamma}$ vs HF; Figura 28B). Finalmente, *Pink1*, relacionado à mitofagia, apresentou expressão

reduzida no grupo HF (-80% vs C; Figura 28C) e no HF γ (-71% vs HF, Figura 28C). Em contrapartida, o *Pink1* aumentou nos grupos HF α (+79% vs HF) e HF $\alpha\gamma$ (+126% vs HF; Figura 28C).

Figura 28 - Expressão relativa de RNA mensageiro dos genes *Drp1*, *Fis-1* e *Pink1* no TABs



Legenda: Valores representados como média $\pm$ DP, n=5 por grupo. Conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3, as diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: Controle (C); Hiperlipídico (HF); Hiperlipídico tratado com pioglitazona (HF γ); Hiperlipídico tratado com WY-14643 (HF α); Hiperlipídico tratado com tesaglitazar (HF $\alpha\gamma$).

Fonte: A autora, 2023.

5. DISCUSSÃO

A ingestão excessiva crônica de ácidos graxos saturados levou ao excesso de peso, intolerância oral à glicose, disbiose intestinal e alterações na expressão gênica de proteínas de junções oclusivas. Assim, o grupo HF apresentou endotoxemia, com sinais pró-inflamatórios no TAMi e acúmulo de gordura, levando a um fenótipo de TAB (*whitening*). Os tratamentos com agonistas seletivo PPAR α e duplo PPAR α/γ atenuaram o *whitening*, restaurando a capacidade termogênica do TAMi. Esses efeitos benéficos podem estar relacionados à modulação do eixo intestino-tecido adiposo pelos PPARs, onde a melhora da disbiose intestinal controlou a endotoxemia e os sinais pró-inflamatórios que desencadeiam o *whitening* e o agravamento da obesidade.

Já foi observado que a ingestão crônica de uma dieta rica em gordura saturada aumenta a MC e prejudica o metabolismo da glicose e dos lipídios (22). Da mesma forma, o grupo HF γ não apresentou diferença em relação ao grupo HF, principalmente porque o PPAR γ é um regulador mestre da adipogênese (256), e um estudo observou que após o tratamento com pioglitazona houve um aumento da MC em camundongos (257). Por outro lado, os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram MC reduzida, concordando com relatos anteriores (24, 254).

Notavelmente, os grupos tratados não mostraram diferença na ingestão alimentar em comparação com o grupo HF não tratado, reforçando que a redução da MC estava diretamente relacionada à ativação do PPAR α e ao sinergismo PPAR α/γ , excluindo a necessidade de grupos de alimentação em pares.

Os camundongos alimentados com dieta HF desenvolveram um fenótipo de obesidade, com aumento dos depósitos de gordura no compartimento intra-abdominal (5), além de gotículas lipídicas aumentadas no TAMi. O agonista PPAR α WY-14643 reduziu a adiposidade em camundongos (5, 254). De acordo, a ativação do PPAR α por ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa n-3 reduz a MC por meio da beta-oxidação aumentada (258). No entanto, o sinergismo PPAR α/γ superou o agonista PPAR α , exibindo a menor MC entre os grupos tratados.

Embora o tesaglitazar (agonista duplo de PPAR α/γ) tenha apresentado alguns efeitos colaterais cardíacos (259), seus efeitos marcantes no metabolismo de lipídios e glicose justificam seu uso em estudos pré-clínicos, onde detém importância como potente agente indutor de *browning* (24) e efeito anti-inflamatório proeminente (260).

Recentemente, a administração de tesaglitazar mediada por GLP1 suplantou os efeitos do agonista do receptor GLP1 na MC e no metabolismo da glicose em camundongos com obesidade induzida por dieta, reabrindo um caminho para o uso futuro do tesaglitazar em ensaios clínicos (261).

O grupo HF, além do sobrepeso, apresentaram intolerância à glicose oral, atestada pela dificuldade de restabelecer os níveis glicêmicos basais após sobrecarga glicêmica, acompanhada de hiperinsulinemia e aumento de TAG plasmático (254). O agonista total do PPAR γ , pioglitazona, melhorou o metabolismo da glicose no grupo HF γ pela modulação previamente descrita da secreção de adiponectina e ativação da transcrição de *Glut4* em adipócitos (262). O agonista duplo PPAR α/γ tesaglitazar mostrou os efeitos benéficos da ativação do PPAR α no metabolismo lipídico e do PPAR γ no metabolismo da glicose, sem causar os efeitos colaterais da ativação total do PPAR γ (ganho de MC e retenção de líquidos) (263, 264).

Um agonista parcial do PPAR γ ativa esse fator de transcrição em 21-50% do nível máximo de ativação da pioglitazona (265). No presente estudo, percebemos que o grupo HF α/γ manteve o efeito benéfico na tolerância oral à glicose, com resultados semelhantes ao grupo HF γ no manejo da glicose, mas com uma demanda de concentração plasmática de insulina reduzida, sugerindo efeitos benéficos maximizados do sinergismo PPAR α/γ sobre metabolismo da glicose.

Essas alterações metabólicas no grupo HF foram concomitantes à disbiose intestinal, confirmando a hipótese de que os padrões alimentares interferem no eixo intestino-tecido adiposo, favorecendo o *whitening* do TAMi. A integridade intestinal está relacionada com a composição da microbiota intestinal e com a estrutura e função da barreira intestinal (266, 267). Normalmente, uma proporção mais alta de *Firmicutes/Bacterioidetes* é um desencadeador da disbiose intestinal encontrada em indivíduos com obesidade em comparação com indivíduos saudáveis (268, 269). Nossos resultados concordam com essa relação *Firmicutes/Bacterioidetes* alterada e sua melhora nos grupos tratados, principalmente no grupo HF $\alpha\gamma$.

Além de causar disbiose, a ingestão crônica da dieta HF alterou a ultraestrutura do íleo, com comprometimento das junções oclusivas presentes no epitélio intestinal, um preditor de aumento da permeabilidade e, conseqüentemente, maior susceptibilidade à translocação de microrganismos e toxinas para a circulação sistêmica, a endotoxemia (266, 267). A endotoxemia no grupo HF foi confirmada pelas concentrações plasmáticas

aumentadas de LPS e inflamação de baixo grau (15), a qual foi concomitante à expressão intestinal reduzida de *Ocludina* e *Claudina-12*.

Ocludina e Claudina são as principais proteínas das junções oclusivas, as quais são encontradas na região apical do complexo juncional e regulam a via paracelular. Constituem uma barreira semipermeável pela qual íons, moléculas e nutrientes podem passar através do epitélio intestinal. A expressão reduzida das principais proteínas das junções oclusivas possibilita a difusão de moléculas como LPS (88).

Pelo contrário, a melhora da disbiose intestinal nos grupos HF α e HF α/γ foi acompanhada pela restauração da permeabilidade intestinal devido a um aumento acentuado na expressão dos genes das junções oclusivas e da proteína Ocludina. A restauração da expressão da *Ocludina* resgata a via paracelular acoplada à *Claudina-12*, uma pequena proteína transmembrana que atua como um poro seletivo de carga no íleo (88, 270).

Vale ressaltar que apenas a ativação isolada do PPAR α e o sinergismo PPAR α/γ aumentou a expressão de *Jam-a*, relacionada ao tamanho da molécula que passa pelo epitélio intestinal. Portanto, o aumento da expressão de *Jam-a* combate o intestino permeável, pois reduz a permeabilidade a macromoléculas encontrada em estados inflamatórios como a obesidade (271).

O LPS derivado do intestino pode aumentar o transporte lipídico para o tecido adiposo, facilitando a transcitose através do endotélio capilar (272). Além disso, os níveis plasmáticos de LPS mostram uma correlação mais forte com o volume de gordura intra-abdominal do que com o subcutâneo (273). Assim, o grupo HF apresentou aumento do LPS plasmático em relação ao grupo C, enquanto os grupos tratados apresentaram redução acentuada desse parâmetro.

O LPS livre no plasma liga-se rapidamente ao CD14 solúvel (sCD14) ou à proteína de ligação ao LPS (LBP) (274). A LBP catalisa a transferência de LPS para lipoproteínas (275). A superalimentação em homens saudáveis aumentou os níveis plasmáticos de LPS e diminuiu a relação LBP:sCD14 (276), sugerindo o sequestro preferencial de LPS em lipoproteínas que podem facilitar seu transporte para o tecido adiposo.

O LPS ativa respostas de PAMPs, agindo como um agonista do TLR4, aumentando a secreção de citocinas inflamatórias (277). Além disso, os inflamassomas são importantes complexos multiproteicos intracelulares que reconhecem vários sinais de perigo (278). O inflamassoma NLRP3 é o principal contribuinte para o aumento dos

níveis de IL-1 β na obesidade. Camundongos *knockout* para *Nlrp3* exibem redução da MC, melhora da homeostase da glicose e sensibilidade à insulina (279). No presente estudo, os agonistas de PPAR exerceram efeitos benéficos no eixo intestino-tecido adiposo, diminuindo a expressão de *Lbp-Tlr4* em TAMi, culminando na menor expressão de *Nlrp3* nos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$.

Sinais inflamatórios (como o *Nlrp3*) e suprimento neurovascular danificado para o TAMi são os principais gatilhos do *whitening* (11, 280). As avaliações histológicas e estereológicas realizadas neste estudo concluíram que a dieta HF causou disfunção (*whitening*) do TAMi, com aumento do tamanho das inclusões lipídicas dos adipócitos marrons, resultando em diminuição do Q_A [núcleos] no TAMi. O *whitening* do TAMi envolve hipóxia, levando à perda mitocondrial e redução da função termogênica do TAM (172).

A monoterapia com PPAR α aumentou a densidade numérica de núcleos por área do TAMi. No entanto, o sinergismo PPAR α/γ resgatou esse parâmetro, sem diferença em relação ao grupo C. Esses resultados são consistentes com a presença de adipócitos marrons multiloculares e a restauração de sua competência para realizar a termogênese. Apenas os grupos HF α e HF $\alpha\gamma$ apresentaram expressão aumentada gênica e proteica da batocina VEGFA, implicando em maior vascularização TAMi, concordando com a preservação do conteúdo mitocondrial e a capacidade de realizar termogênese devido à estimulação beta-adrenérgica aumentada (10).

Embora o grupo PPAR γ tenha melhorado a expressão do gene *Claudina-12* e da proteína Ocludina, aliviando a endotoxemia por meio de sinais anti-inflamatórios para o TAMi, não foi suficiente para resgatar a ultraestrutura do íleo, a vascularização do TAMi e o estímulo adrenérgico, resultando em pronunciado *whitening* e termogênese sem tremores prejudicada no grupo HF γ .

A literatura aponta efeitos protetores da ativação do PPAR γ no cólon (reduzindo a inflamação) e na microbiota (inibindo a expansão das patogênicas *Escherichia* e *Salmonella*) (281), concordando com melhora da disbiose e inflamação induzida por endotoxemia no grupo HF γ . No entanto, a pioglitazona, agonista total do PPAR γ , não conseguiu ativar o programa termogênico no TAMi neste estudo. O PPAR α parece ser essencial para as interações termogênese-microbiota intestinal, como recentemente sugerido por um estudo em que a zingerona foi suplementada em camundongos com obesidade induzida por dieta por 16 semanas, combinando termogênese favorecida com mitigação da disbiose através da ativação do PPAR α (282).

A termogênese sem tremores no TAMi depende da estimulação do *Raβ3* (283). Em seguida, a batocina *Bmp8b* acopla a sinalização adrenérgica à termogênese eficiente, cuja efetora é a UCP1 (284). Recentemente, nosso grupo mostrou que a expressão de *Bmp8b* diminui gradativamente à medida que o *whitening* se agrava.

Após 12 semanas em uma dieta HF, os camundongos exibiram expressão inalterada da proteína UCP1 e aumento de *Bmp8b* em comparação com camundongos magros. Na semana 16, camundongos alimentados com HF apresentaram baixa expressão de UCP1 e um declínio em *Bmp8b*, valores que se tornaram ainda mais baixos após 20 semanas de administração de dieta HF, quando o TAMi expressa o fenótipo branco na sua totalidade (*whitening*), confirmando a importância da *Bmp8b* na eficiência de UCP1 (280).

Nossos resultados sugerem um papel principal para o PPARα na termogênese adrenérgica, uma vez que apenas os grupos HFα e HFαγ mostraram expressão aumentada dos genes *Raβ3* e *Bmp8b*. A UCP1 é responsável pela termogênese sem tremores, que compreende 60% da termogênese do corpo inteiro. O PPARα regula o metabolismo lipídico, a biogênese mitocondrial e a expressão de UCP1 (285, 286). A ativação isolada do PPARα e o sinergismo PPARα/γ aumentaram a expressão de *Ppara*, refletida em um aumento proteico e gênico da UCP1 (5, 24).

Considerando que os grupos HFα e HFαγ também exibiram as temperaturas corporais mais pronunciadas, os dados aqui apresentados indicam aumento da atividade termogênica em ambos os grupos. No entanto, a termogênese aumentou o gasto energético exclusivamente no grupo HFαγ, concordando com a normalização da MC e da ultraestrutura intestinal. A expressão aumentada de *Ucp3* exclusivamente no grupo HFα/γ explica e confirma a termogênese favorecida, pois a UCP3 é complementar à ação termogênica de UCP1, não como desacoplador, mas como transportador de soluto (287).

O Tesaglitazar produz a ativação de PPARα mais potente quando comparado a outros agonistas duplos PPARα/γ como muraglitazar e aleglitazar (263), destacando a importância da ativação de PPARα para estímulo adrenérgico-acoplamento da UCP1 na termogênese sem tremores, além de sugerir efeito termogênico benéfico adicional advindo do sinergismo PPARα/γ. A termogênese depende diretamente do conteúdo mitocondrial, regulado por *Pgc1α*, um regulador mestre da biogênese mitocondrial por meio da transcrição do *Nrf1* (288).

O *Atf4* possui uma gama de genes-alvo envolvidos na apoptose, metabolismo lipídico e obesidade (289, 290), emergindo como um regulador negativo da expressão de

Pgc1 α (114). Os grupos tratados apresentaram um aumento da expressão de *Pgc1 α* , concordando com a termogênese melhorada, em contraste com a expressão reduzida de *Atf4* no TAMi. A perda de *Atf4* celular leva a uma respiração dependente de ATP melhorada (291), conforme observado no grupo HF $\alpha\gamma$, enquanto a regulação negativa de *Atf4* pelos tratamentos implica no alívio do estresse do retículo endoplasmático e redução do estresse oxidativo, observado em outro estudo com agonista PPAR α (292).

Os adipócitos marrons competentes para realizar a termogênese também exibem um metabolismo celular melhorado. O *Cidea* é regulado positivamente em adipócitos marrons termogênicos ativos, pois impulsiona a transcrição de *Ucp1* mediando a ligação de PPAR γ a um elemento intensificador de *Ucp1* em adipócitos bege humanos (293).

Por outro lado, o Cidec promove o desenvolvimento unilocular de inclusões lipídicas e estimula a deposição intracelular de lipídios, exibindo a maior expressão no TAMi do grupo HF (294). Os tratamentos aumentaram o *Cidea* e diminuíram o *Cidec*, confirmando a capacidade de realizar termogênese nos adipócitos marrons e multilocularidade preservada nos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$.

Com relação ao TABs, os resultados mostraram evidências confiáveis de que os agonistas PPAR α e PPAR α/γ induziram o *browning* com redução relevante da MC. O aumento da termogênese dependente e independente de UCP1, além de efeitos benéficos na dinâmica mitocondrial, foram observados no TABs dos grupos HF α e HF $\alpha\gamma$, acompanhados por um perfil anti-inflamatório de adipocinas e redução significativa da gordura corporal. A redução da MC nesses grupos pode ser atribuída à termogênese aumentada, como já mencionado ao longo da discussão.

O aumento da MC no grupo HF foi paralelo ao incremento dos depósitos de gordura intra-abdominal e subcutâneo, conforme relatado em estudos anteriores (20, 254). Os agonistas PPAR α e PPAR α/γ reduziram significativamente ambos os depósitos de gordura. Um estudo anterior mostrou que o ácido docosahexaenóico (um ligante PPAR α) combateu a inflamação causada pela obesidade, resultando na predominância de adipócitos brancos menores e sensíveis à insulina (292).

A adiponectina e a leptina são secretadas pelo TAB e regulam a sensibilidade à insulina e o metabolismo energético (295). Os níveis séricos de leptina se correlacionam com a massa gorda e massa corporal (296). A hiperleptinemia apresentada pelo grupo HF concorda com os adipócitos hipertrofiados no TABs (254). Em contraste, todos os grupos tratados apresentaram redução nas concentrações da leptina e da área transversal média

dos adipócitos no TABs, confirmando as propriedades anti-inflamatórias dos agonistas PPARs e sugerindo melhora do metabolismo mitocondrial.

A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, diminuindo a gordura intracelular através do aumento da oxidação de AGs via ativação do PPAR α e sinalização do substrato do receptor de insulina no músculo esquelético e fígado (297, 298). O aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina nos grupos tratados corrobora o FIRI reduzido, indicando a melhora da resistência à insulina. Embora o tratamento com pioglitazona tenha melhorado metabolismo da glicose, não foi capaz de induzir o *browning* do TABs.

Por outro lado, os agonistas PPAR α e PPAR α/γ , além de resgatarem as concentrações plasmáticas de leptina, produziram adipócitos brancos de tamanho normal e *browning* do TABs, este último associado à homeostase da glicose (299). A ativação do PPAR α favorece a oxidação lipídica, permitindo a entrada mitocondrial de AGs para o metabolismo. Portanto, a ativação dupla de PPAR α/γ , induziu o *browning* e aumento do gasto de energia podendo ter o PPAR α como protagonista devido ao aumento metabolização lipídica e grande atividade simpática (24, 53).

Quanto à via termogênica dependente de UCP1, o PPAR α tem *Ucp1* como gene alvo e regula o metabolismo lipídico e a biogênese mitocondrial (286). A UCP1 é um canal alternativo para o retorno do gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial, desacoplando a utilização de energia da síntese de ATP e liberando energia como calor, a termogênese sem tremores (146). Os agonistas PPAR α e PPAR α/γ regularam positivamente os genes *PPAR α* e *Ucp1*.

A termogênese sem tremores depende da estimulação adrenérgica para iniciar. A presença de adipócitos multiloculares beges associados ao aumento da expressão de *Bmp8b* indica maior capacidade para resposta termogênica no TABs sob estimulação adrenérgica (300). A alta expressão do *Prdm16* sinaliza a manutenção do fenótipo bege, uma vez que o *browning* é um fenômeno reversível (301). As temperaturas corporais aumentadas em animais dos grupos HF α e HF α/γ , juntamente com o aumento da imunodensidade de UCP1, expressão gênica de *Bmp8b*, *Ucp1* e *Prdm16* confirma a indução de adipócitos bege competentes para realizar a termogênese no TABs (14).

Embora os animais não foram acondicionados em termoneutralidade, a temperatura utilizada no presente estudo não pode induzir *browning* nesta linhagem de camundongos (122). A homeostase da glicose nos grupos que exibiram o *browning* do

TABs pode resultar da termogênese independente da UCP1. A depleção de creatina nos adipócitos beges reduz sua capacidade termogênica e induz a obesidade (302). Neste contexto, a expressão aumentada de *Slc6a8*, um transportador de creatina, nos grupos HF α e HF α/γ aponta aumento da respiração mitocondrial e capacidade termogênica (303).

Uma via termogênica independente de UCP1, seletiva para adipócitos beges, é o ciclo de Ca^{2+} dependente de ATP na SERCA (Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático) (304). A *Serca2b* é dominante em adipócitos beges e sua expressão aumenta em exposição ao frio, indicando um papel na termogênese (305, 306). A *Serca2b* desacopla o transporte de cálcio da hidrólise do ATP e usa carboidratos como combustível.

O aumento da expressão de *Serca2b-Ryr2* nos grupos tratados sugere um aumento da oxidação da glicose, justificando a atenuação da resistência à insulina e a normalização da glicemia de jejum, atribuída à presença de gordura bege independentemente da perda de MC (307). O quociente respiratório de 0,8 implica que o grupo HF α/γ possivelmente usou uma mistura de lipídios e carboidratos como combustível para termogênese dependente e independente de UCP1.

A obesidade acarreta disfunção mitocondrial e resistência à insulina (307). As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e se renovam a cada 2 a 4 semanas (308). O *Drp1* é responsável pela fissão mitocondrial e aumenta em camundongos ob/ob, juntamente com a diminuição da fusão mitocondrial, resultando em mitocôndrias fragmentadas com menor capacidade oxidativa (125).

A leptina ativa inibe a fissão mitocondrial (reduz o *Drp1*). Isso induz o *browning* no TABs, observado nos grupos HF α e HF α/γ , com cristas longas, laminares e curvas nas mitocôndrias dos adipócitos beges, favorecendo a termogênese (125) e emerge como um alvo potente para o tratamento do DM2 e obesidade (307).

A mitofagia elimina as mitocôndrias danificadas, controlando a quantidade e a qualidade do conteúdo mitocondrial celular (309). É concebível que a biogênese mitocondrial seja responsável pelo aumento conteúdo mitocondrial nos adipócitos beges. No entanto, a depuração mitocondrial é fundamental para a manutenção do fenótipo bege (128).

Evidências pré-clínicas e clínicas caracterizam o *Park2* como um gene crucial para a homeostase mitocondrial (equilíbrio adequado de biogênese mitocondrial e mitofagia) em adipócitos brancos (310, 311). A imunodensidade diminuída de PARK2 e a expressão reduzida de *Pink1* nos camundongos do grupo HF sugere mitofagia

comprometida e estresse metabólico (312). No entanto, os agonistas PPAR α e PPAR α/γ aumentaram *Pink1* e PARK2, sugerindo função mitocondrial protegida e morte celular mitigada (312, 313).

O *Fis1* também tem um papel na mitofagia, e seus resultados espelharam os de *Pink1*, propondo que os animais HF tinham remoção prejudicada de mitocôndrias danificadas, caracterizando disfunção de adipócitos brancos subcutâneos (314). Por outro lado, os grupos HF α e HF α/γ podem apresentar conteúdo mitocondrial mais saudável que o grupo HF, facilitando o recrutamento e manutenção de adipócitos bege, colaborando com a perda da MC e homeostase glicêmica. O quadro 4 resume os principais achados e compara os tratamentos propostos nesse estudo.

Quadro 4 – Resumo dos principais resultados

Parâmetro	pioglitazona	WY-14643	tesaglitazar
MC	Sem diferença	Reduziu MC	Reduziu MC
TOTG	Atenuou a intolerância oral à glicose	Atenuou a intolerância oral à glicose	Reverteu a intolerância oral à glicose
FIRI	Reduziu a resistência à insulina	Reduziu a resistência à insulina	Reduziu a resistência à insulina
Gasto energético	Sem diferença	Sem diferença	Aumentou o gasto energético
Genes junções oclusivas	Sem diferença	Restaurou a expressão	Restaurou a expressão
Endotoxemia	Reduziu	Reduziu	Reduziu
Q _A núcleo TAM	Sem diferença	Atenuou o <i>whitening</i>	Reverteu o <i>whitening</i>
Genes termogênicos	Sem diferença	Aumentou a expressão	Aumentou a expressão
Genes e proteína da vascularização do TAM	Sem diferença	Aumentou a expressão	Aumentou a expressão
Browning do TABs	Sem diferença	Promoveu o <i>browning</i> do TABs	Promoveu o <i>browning</i> do TABs
Genes da termogênese dependente da UCP1 no TABs	Sem diferença	Aumentou a expressão	Aumentou a expressão
Genes da termogênese independente da UCP1 no TABs	Sem diferença	Aumentou a expressão	Aumentou a expressão

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Em conclusão, os agonistas PPARs aliviaram a disbiose intestinal e a endotoxemia causada pela ingestão crônica da dieta HF em camundongos. Digno de nota, os genes relacionados às junções oclusivas foram modulados por PPARs neste estudo, sugerindo a restauração da permeabilidade intestinal, o que cessou os sinais pró-inflamatórios que desencadeiam o *whitening* do TAMi. No entanto, a ativação do PPAR γ não conseguiu resgatar o suprimento neurovascular dos adipócitos marrons (avaliado pela expressão de *Vegfa*). Assim, o sinergismo PPAR α/γ parece necessário para acoplar os efeitos benéficos do controle da disbiose com a ativação termogênica, com efeitos aditivos em comparação com a ativação única do PPAR α na modulação do eixo intestino-tecido adiposo. Além da recuperação da multilocularização de adipócitos marrons, regulação positiva de marcadores termogênicos e aumento da temperatura corporal, apenas o sinergismo HF $\alpha\gamma$ aumentou o gasto energético, tratando a obesidade ao acoplar disbiose intestinal melhorada com sinais anti-inflamatórios e pró-termogênicos ao TAMi em camundongos.

No tecido adiposo branco subcutâneo, a dieta HF causou hipertrofia de adipócitos com perfil pró-inflamatório de adipocinas, comprometendo a termogênese e o metabolismo mitocondrial. O agonista PPAR γ mitigou a resistência à insulina e hipertrofia de adipócitos brancos, mas não induziu o *browning* no TABs. A ativação de PPAR α e PPAR α/γ recrutaram adipócitos bege positivos para UCP1 e favoreceram a termogênese independente de UCP1. Dessa forma, o sinergismo PPAR α/γ deve ser considerado como estratégia promissora no combate da obesidade e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS

1. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorsson TI, Riserus U, Uusitupa M, et al. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. 2014;58(1):25145.
2. Raatz SK, Conrad Z, Johnson LK, Picklo MJ, Jahns L. Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. *Nutrients*. 2017;9(5).
3. Piers L, Walker K, Stoney R, Soares M, O'dea KJ. The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). 2002;26(6):814-21.
4. Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaff MJ, Wehkamp J, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *The Journal of nutrition*. 2017;147(5):770-80.
5. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-alpha activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition*. 2020;78:110791.
6. Gustafson B, Smith UJA. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. 2015;241(1):27-35.
7. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
8. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. 2001;1504(1):82-106.
9. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & development*. 2013;27(3):234-50.
10. Shimizu I, Walsh K. The whitening of brown fat and its implications for weight management in obesity. 2015;4(2):224-9.
11. Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2099-112.
12. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. 2008;454(7203):455-62.
13. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? 2013;27(3):234-50.
14. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013;62(6):1774-82.
15. Matsushita N, Osaka T, Haruta I, Ueshiba H, Yanagisawa N, Omori-Miyake M, et al. Effect of Lipopolysaccharide on the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Caloric Diet-Fed Mice. 2016;83(2):109-18.
16. Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C, et al. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. 2014;9(12):e115148.
17. Okla M, Zaher W, Alfayez M, Chung SJ. Inhibitory effects of toll-like receptor 4, NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β on white adipocyte browning. 2018;41(2):626-42.
18. Altman N, Krzywinski M. Simple linear regression. *Nat Methods*. 2015;12(11):999-1000.
19. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. 2015;7(8):1012.

20. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Brighenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello VJM, et al. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. 2015;402:86-94.
21. Manoharan I, Suryawanshi A, Hong Y, Ranganathan P, Shanmugam A, Ahmad S, et al. Homeostatic PPAR α signaling limits inflammatory responses to commensal microbiota in the intestine. 2016;196(11):4739-49.
22. Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CAJCs. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. 2012;123(4):259-70.
23. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, Marinho Tde S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. Life Sci. 2015;127:73-81.
24. Kroon T, Harms M, Maurer S, Bonnet L, Alexandersson I, Lindblom A, et al. PPAR γ and PPAR α synergize to induce robust browning of white fat in vivo. 2020;36:100964.
25. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. 2017;8:563.
26. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(6):1654-63.
27. Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. Obes Rev. 2009;10 Suppl 1:24-33.
28. Bray GA. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. J Nutr. 2002;132(11 Suppl):3451S-5S.
29. Narkiewicz K. Obesity and hypertension--the issue is more complex than we thought. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(2):264-7.
30. Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. Annals of nutrition & metabolism. 2015;66 Suppl 2:7-12.
31. Vigilância MdSSdVeSeADdAEe, Transmissíveis. dDN. Vigitel Brasil 2023:. In: Transmissíveis DdAEeVdDN, editor. Brasília2023. p. 131.
32. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. Arch Med Sci. 2017;13(4):851-63.
33. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci. 2011;12(5):3117-32.
34. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 2017;127(1):1-4.
35. Duren DL, Sherwood RJ, Czerwinski SA, Lee M, Choh AC, Siervogel RM, et al. Body composition methods: comparisons and interpretation. J Diabetes Sci Technol. 2008;2(6):1139-46.
36. Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. Archives of disease in childhood. 2006;91(7):612-7.
37. Lo K, Wong M, Khalechelvam P, Tam W. Waist-to-height ratio, body mass index and waist circumference for screening paediatric cardio-metabolic risk factors: a meta-analysis. Obes Rev. 2016;17(12):1258-75.
38. ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO In: Metabólica ABpoEdOedS, editor. 4 ed. ed. São Paulo2016.
39. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. Free radical biology & medicine. 2013;65:1229-37.
40. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature. 2000;404(6778):652-60.

41. Haslam D. Weight management in obesity - past and present. *International journal of clinical practice*. 2016;70(3):206-17.
42. Klein S, Sheard NF, Pi-Sunyer X, Daly A, Wylie-Rosett J, Kulkarni K, et al. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies: a statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *Diabetes care*. 2004;27(8):2067-73.
43. Wadden TA, McGuckin BG, Rothman RA, Sargent SL. Lifestyle modification in the management of obesity. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2003;7(4):452-63.
44. Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(1):12-24.
45. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Valles V, Rios-Torres JM, Franco A, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Arch Med Res*. 2004;35(1):76-81.
46. De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5239-49.
47. Mosca PRF, Silveira PP, Werlang ICR, Goldani MZJRHPAV, n. 3 , p. 318-331. *Obesidade e genética*. 2012.
48. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808.
49. White PA, Cercato LM, Araujo JM, Souza LA, Soares AF, Barbosa AP, et al. [Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(5):339-45.
50. Buettner R, Parhofer K, Woenckhaus M, Wrede C, Kunz-Schughart L, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. 2006;36(3):485-501.
51. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, de Souza Marinho T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CAJLs. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. 2015;127:73-81.
52. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie*. 2017;140:106-16.
53. Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential actions of PPAR-alpha and PPAR-beta/delta on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191365.
54. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature cell biology*. 2003;5(9):781-92.
55. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(7):412-25.
56. Xiao H, Kang S. The Role of the Gut Microbiome in Energy Balance With a Focus on the Gut-Adipose Tissue Axis. *Frontiers in genetics*. 2020;11:297.
57. OVALLE WKN, P. C. *Netter Bases da Histologia*. 2008;Elsevier.
58. Brito RBOGAdC. *HISTOLOGIA DO TUBO DIGESTÓRIO*. Ltda. EB, editor. São Paulo 2016. 836 p.
59. Funk MC, Zhou J, Boutros MJEr. Ageing, metabolism and the intestine. 2020;21(7):e50047.
60. Gray H. *Gray Anatomia Charles Mayo Goss Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*; 1988.
61. Ham A, Cormack DH. *Histologia*. 1983. p. 906-.
62. Ross MH, Pawlina W. *Histology: Lippincott Williams & Wilkins*; 2006.

63. Junqueira LC, Carneiro JJRdJ. *Histologia básica*. 10ª edição. 2004.
64. Lowe JS, Anderson PG, Anderson SI. Stevens y Lowe. *Histología humana*: Elsevier Health Sciences; 2020.
65. Gartner LP, Hiatt JL. *Color atlas and text of histology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
66. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight RJs. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. 2009;326(5960):1694-7.
67. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SHJNrG, hepatology. The role of the gut microbiota in nutrition and health. 2012;9(10):577-89.
68. Paixão LA, dos Santos Castro FFJUCdS. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. 2016;14(1):85-96.
69. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WMJG, nutrition. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. 2011;6:209-40.
70. Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. 2010;30(10):3826-30.
71. Hall A, Versalovic JJJopg, nutrition. Microbial metabolism in the mammalian gut: molecular mechanisms and clinical implications. 2018;66:S72-S9.
72. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. 2004;101(44):15718-23.
73. Bin P, Liu S, Chen S, Zeng Z, Huang R, Yin Y, et al. The effect of aspartate supplementation on the microbial composition and innate immunity on mice. 2017;49:2045-51.
74. Motta AS, Cannavan FS, Tsai S-M, Brandelli AJAoM. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. 2007;188:367-75.
75. Turnbaugh PJ, Gordon JJTJop. The core gut microbiome, energy balance and obesity. 2009;587(17):4153-8.
76. Rastmanesh RJC-bi. High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. 2011;189(1-2):1-8.
77. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. 2017;17(1):1-6.
78. Duncan SH, Lobley G, Holtrop G, Ince J, Johnstone A, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. 2008;32(11):1720-4.
79. Reinhardt C, Reigstad CS, Bäckhed FJJopg, nutrition. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. 2009;48(3):249-56.
80. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE, editors. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo clinic proceedings*; 2008: Elsevier.
81. Menconi A, Bielke LR, Hargis BM, Tellez GJJMRR. Immuno-modulation and anti-inflammatory effects of antibiotic growth promoters versus probiotics in the intestinal tract. 2014;2:62-7.
82. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel FJTVJ. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. 2011;187(2):182-8.
83. Huff G, Huff W, Balog J, Rath NJPs. The effects of dexamethasone immunosuppression on turkey osteomyelitis complex in an experimental *Escherichia coli* respiratory infection. 1998;77(5):654-61.
84. Teirlynck E, Bjerrum L, Eeckhaut V, Huygebaert G, Pasmans F, Haesebrouck F, et al. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. 2009;102(10):1453-61.

85. Yegani M, Korver DJPs. Factors affecting intestinal health in poultry. 2008;87(10):2052-63.
86. Barreau F, Hugot JJCoim. Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. 2014;17:91-8.
87. Suzuki TJASJ. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. 2020;91(1):e13357.
88. Otani T, Furuse MJTicb. Tight junction structure and function revisited. 2020;30(10):805-17.
89. Miller RR, Gardy JL, Tang P, Patrick DMJFB, Health, Behavior. A metagenomic approach to investigate the microbial causes of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: moving beyond XMRV. Taylor & Francis; 2013. p. 185-9.
90. Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley REJS. Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. 2016;352(6285):532-5.
91. Santana-Oliveira DA, Souza-Tavares H, Fernandes-da-Silva A, Silva-Veiga FM, Casimiro-Lopes G, Lisboa PC, et al. Exercise prevents obesity by reducing gut-derived inflammatory signals to brown adipocytes in mice. 2023;259(1).
92. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Martins FF, Daleprane JB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello VJJoE. Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linagliptin. 2020;247(1):11-24.
93. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Fernandes-da-Silva A, Guimaraes Pereira VR, Martins BC, Daleprane JB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity. Mol Cell Endocrinol. 2023;562:111839.
94. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2000;11(8):327-32.
95. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015;309(8):E691-714.
96. Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. Nutrition. 2000;16(10):903-8.
97. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. J Clin Invest. 2002;110(9):1243-50.
98. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. Jornal de pediatria. 2007;83(5 Suppl):S192-203.
99. Lidell ME, Betz MJ, Enerback S. Two types of brown adipose tissue in humans. Adipocyte. 2014;3(1):63-6.
100. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;293(2):E444-52.
101. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MAJJoP-E, Metabolism. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. 2001;280(6):E827-E47.
102. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Three years with adult human brown adipose tissue. Ann N Y Acad Sci. 2010;1212:E20-36.
103. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. Acta Physiol (Oxf). 2012;205(2):194-208.
104. Divoux A, Clement K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. Obes Rev. 2011;12(5):e494-503.
105. Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. Biochim Biophys Acta. 2015;1851(4):503-18.
106. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev. 2010;11(1):11-8.

107. Castro-Chavez F, Yechoor VK, Saha PK, Martinez-Botas J, Wooten EC, Sharma S, et al. Coordinated upregulation of oxidative pathways and downregulation of lipid biosynthesis underlie obesity resistance in perilipin knockout mice: a microarray gene expression profile. *Diabetes*. 2003;52(11):2666-74.
108. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10(1):51-8.
109. Grousse A, Langin D. Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(4):581-94.
110. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2547-59.
111. Guyenet SJ, Schwartz MW. Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):745-55.
112. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(9):351-6.
113. Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(5):555-9.
114. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19(10):1338-44.
115. Lolmede K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bouloumie A. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*. 2011;37(4):283-90.
116. Cao Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2013;18(4):478-89.
117. Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013;18(4):470-7.
118. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772-83.
119. Wintour EM, Henry BA. Glycerol transport: an additional target for obesity therapy? *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(3):77-8.
120. Concha F, Prado G, Quezada J, Ramirez A, Bravo N, Flores C, et al. Nutritional and non-nutritional agents that stimulate white adipose tissue browning. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019;20(2):161-71.
121. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
122. Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard JJB. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. 2017;134:127-37.
123. Yau WW, Singh BK, Lesmana R, Zhou J, Sinha RA, Wong KA, et al. Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. 2019;15(1):131-50.
124. Pérez-Martí A, Garcia-Guasch M, Tresserra-Rimbau A, Carrilho-Do-Rosário A, Estruch R, Salas-Salvadó J, et al. A low-protein diet induces body weight loss and browning of subcutaneous white adipose tissue through enhanced expression of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21). 2017;61(8):1600725.
125. Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab*. 2016;5(5):352-65.
126. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2014;19(1):25-37.

127. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. 2010;298(6):E1244-E53.
128. Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, et al. Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance. 2016;24(3):402-19.
129. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. The Journal of biological chemistry. 2010;285(10):7153-64.
130. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. PLoS One. 2012;7(11):e49452.
131. Cannon B, de Jong JM, Fischer AW, Nedergaard J, Petrovic NJEP. Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? 2020;105(8):1191-200.
132. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360(15):1509-17.
133. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. N Engl J Med. 2009;360(15):1518-25.
134. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. Nat Med. 2013;19(5):635-9.
135. Abdullahi A, Jeschke MG. Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. Endocr Rev. 2017;38(6):538-49.
136. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiological reviews. 2004;84(1):277-359.
137. Truong MT, Erasmus JJ, Munden RF, Marom EM, Sabloff BS, Gladish GW, et al. Focal FDG uptake in mediastinal brown fat mimicking malignancy: a potential pitfall resolved on PET/CT. AJR Am J Roentgenol. 2004;183(4):1127-32.
138. Chiba S, Shimada T, Kaneko K, Tomonari K, Shimada T, Satoh Y, et al., editors. Evaluation of human brown adipose tissue using positron emission tomography, computerized tomography and histochemical studies in association with glucose metabolism. ENDOCRINE JOURNAL; 2010: JAPAN ENDOCRINE SOC 75 YANAGINOBANBA NISHIRU-MASUYA-CHO, SANJOU-DORI
139. Bar-Shalom R, Gaitini D, Keidar Z, Israel O. Non-malignant FDG uptake in infradiaphragmatic adipose tissue: a new site of physiological tracer biodistribution characterised by PET/CT. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004;31(8):1105-13.
140. Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, et al. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. 2015;243(2):638-44.
141. Nedergaard J, Wang Y, Cannon B. Cell proliferation and apoptosis inhibition: essential processes for recruitment of the full thermogenic capacity of brown adipose tissue. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2019;1864(1):51-8.
142. Heaton JMJJoa. The distribution of brown adipose tissue in the human. 1972;112(Pt 1):35.
143. Sanchez-Gurmaches J, Tang Y, Jespersen NZ, Wallace M, Martinez Calejman C, Gujja S, et al. Brown Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Storage and Thermogenesis. Cell Metab. 2018;27(1):195-209 e6.
144. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? Biochimica et biophysica acta. 2010;1801(3):372-6.
145. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. J Physiol. 2000;529 Pt 1:3-10.

146. Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*. 2017;134:3-8.
147. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(1).
148. Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(4):E617-26.
149. Bournat JC, Brown CWJCoie, diabetes,, obesity. Mitochondrial dysfunction in obesity. 2010;17(5):446.
150. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis NJCD, Differentiation. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. 2015;22(9):1399-401.
151. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011;17(2):200-5.
152. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2013;123(1):215-23.
153. Berbée JF, Boon MR, Khedoe PP, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature communications*. 2015;6:6356.
154. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbée JFP, Worthmann A, Cherradi ML, et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nature communications*. 2017;8:15010.
155. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
156. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*. 2014;516(7531):395-9.
157. Haraida S, Nerlich AG, Wiest I, Schleicher E, Löhrs U. Distribution of basement membrane components in normal adipose tissue and in benign and malignant tumors of lipomatous origin. *Mod Pathol*. 1996;9(2):137-44.
158. Lee SH, Park HS, Lee JA, Song YS, Jang YJ, Kim JH, et al. Fibronectin gene expression in human adipose tissue and its associations with obesity-related genes and metabolic parameters. *Obesity surgery*. 2013;23(4):554-60.
159. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, et al. Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(13):9210-3.
160. Yamashita H, Kizaki T, Ookawara T, Sato Y, Yamamoto M, Ohira Y, et al. Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sci*. 1994;55(2):141-8.
161. Gomez-Hernandez A, Beneit N, Diaz-Castroverde S, Escribano O. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1216783.
162. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(5):E567-72.
163. Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2002;34(11-12):629-34.
164. Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 2:S59-66.
165. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.

166. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism*. 2007;6(1):38-54.
167. Smith RE, Hock RJ. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science (New York, NY)*. 1963;140(3563):199-200.
168. Smith RE. THERMOREGULATORY AND ADAPTIVE BEHAVIOR OF BROWN ADIPOSE TISSUE. *Science (New York, NY)*. 1964;146(3652):1686-9.
169. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
170. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*. 2012;15(3):395-404.
171. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):943-9.
172. Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. 2014;124(5):2099-112.
173. Smith CE, Ordovas JM. Update on perilipin polymorphisms and obesity. *Nutr Rev*. 2012;70(10):611-21.
174. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of lipid research*. 2012;53(4):619-29.
175. Sbarbati A, Morroni M, Zancanaro C, Cinti S. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *International journal of obesity*. 1991;15(9):581-7.
176. Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology*. 1997;138(2):797-804.
177. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell metabolism*. 2010;11(4):253-6.
178. Bartness TJ, Wade GN. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behavioral neuroscience*. 1984;98(4):674-85.
179. Dulloo AG, Miller DS. Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1984;62(2):235-40.
180. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5774):734-7.
181. Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M, et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism*. 2011;13(6):739-48.
182. Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, et al. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell metabolism*. 2009;9(1):99-109.
183. Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, Nedergaard J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta -adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13802-11.
184. Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5874-9.
185. Sung HK, Doh KO, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab*. 2013;17(1):61-72.

186. Kolonin MG, Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med*. 2004;10(6):625-32.
187. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10730-5.
188. Brakenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, et al. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res*. 2004;94(12):1579-88.
189. Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012;61(7):1801-13.
190. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(8):2476-81.
191. Lazar MA, Tjebk. Maturing of the nuclear receptor family. 2017;127(4):1123-5.
192. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. 1985;318(6047):635-41.
193. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. 1986;320(6058):134-9.
194. Harrington WW, C SB, J GW, N OM, J GB, D CL, et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR research*. 2007;2007:97125.
195. Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels BJTJoci. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. 2017;127(4):1202-14.
196. Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez GJJJoMS. PPARs and metabolic disorders associated with challenged adipose tissue plasticity. 2018;19(7):2124.
197. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPARalpha. *Mol Metab*. 2014;3(4):354-71.
198. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol*. 2006;536(1-2):182-91.
199. Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition*. 2009;25(7-8):818-27.
200. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad HJJoMC. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. 2019;166:502-13.
201. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;110(3):371-85.
202. Souza-Tavares H, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Sandoval C, Santana-Oliveira DA, Silva-Veiga FM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas. 2023;29(26):4136.
203. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(13):4699-707.
204. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(45):32048-54.
205. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993;32(21):5598-604.

206. Braissant O, Foulle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
207. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*. 1999;354(9173):141-8.
208. Brady PS, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR. Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs. *The Biochemical journal*. 1989;260(1):93-100.
209. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol*. 2005;4:14.
210. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999;103(11):1489-98.
211. Contreras AV, Torres N, Tovar ARJAin. PPAR- α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. 2013;4(4):439-52.
212. Rösch S, Ramer R, Brune K, Hinz BJB, communications br. Prostaglandin E2 induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. 2005;338(2):1171-8.
213. Kimura R, Takahashi N, Goto T, Murota K, Kawada TJOR, Practice C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) in proximal intestine improves postprandial lipidemia in obese diabetic KK-Ay mice. 2013;7(5):e353-e60.
214. Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, et al. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- α increases high-density lipoprotein production. 2013;34(32):2566-74.
215. Corsini A, Bellosa S, Davidson MH. Pharmacokinetic interactions between statins and fibrates. *The American journal of cardiology*. 2005;96(9A):44K-9K; discussion 34K-5K.
216. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SAJJoBC. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ)*. 1995;270(22):12953-6.
217. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. 2013;19(5):557-66.
218. Stuhlmeier KM, Kao JJ, Bach FHJJoBC. Arachidonic acid influences proinflammatory gene induction by stabilizing the inhibitor- κ B α /nuclear factor- κ B (NF- κ B) complex, thus suppressing the nuclear translocation of NF- κ B. 1997;272(39):24679-83.
219. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek DJABP. Cyclooxygenase pathways. 2014;61(4).
220. Lawrence T, Natoli GJNri. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. 2011;11(11):750-61.
221. Inagaki T, Sakai J, Kajimura SJNrMcb. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. 2016;17(8):480-95.
222. Consoli A, Devangelio EJJ. Thiazolidinediones and inflammation. 2005;14(9):794-7.
223. Staels B, Fruchart J-CJD. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. 2005;54(8):2460-70.
224. Fritsche KJARN. Fatty acids as modulators of the immune response. 2006;26:45-73.
225. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. 2006;355(23):2427-43.
226. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels BJNRE. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. 2017;13(1):36-49.
227. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup SJTiE, Metabolism. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. 2014;25(6):293-302.

228. Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang TJPotNAoS. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor γ blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. 2005;102(26):9406-11.
229. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. 2005;54(8):2305-13.
230. Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon BJBBeBA-MBoD. PPAR γ in the control of brown adipocyte differentiation. 2005;1740(2):293-304.
231. Nissen SE, Wolski KJNEJoM. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. 2007;356(24):2457-71.
232. Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, et al. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. 2009;94(11):4619-23.
233. Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RNJJoBC. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor γ transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. 2005;280(14):13600-5.
234. Trostchansky A, Bonilla L, Thomas CP, O'Donnell VB, Marnett LJ, Radi R, et al. Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. 2011;286(15):12891-900.
235. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. 2000;278(3):704-11.
236. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. 2005;366(9493):1279-89.
237. Kernan WN, Viscoli CM, Furie KL, Young LH, Inzucchi SE, Gorman M, et al. Pioglitazone after ischemic stroke or transient ischemic attack. 2016;374:1321-31.
238. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. 2009;373(9681):2125-35.
239. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinielli C, Boccuzzi G, et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. 2010;160(8):1892-902.
240. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BRJJomc. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. 2000;43(4):527-50.
241. Wallenius K, Kjellstedt A, Thalén P, Löfgren L, Oakes NDJPr. The PPAR α/γ agonist, tesaglitazar, improves insulin mediated switching of tissue glucose and free fatty acid utilization in vivo in the obese Zucker rat. 2013;2013.
242. Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh MJPR. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? 2007;56(2):91-8.
243. Nissen SE, Wolski K, Topol EJJ. Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. 2005;294(20):2581-6.
244. Conlon DJTbjod, disease v. Goodbye glitazars? 2006;6(3):135-7.
245. Ratner RE, Parikh S, Tou CJD, Research VD. Efficacy, safety and tolerability of tesaglitazar when added to the therapeutic regimen of poorly controlled insulin-treated patients with type 2 diabetes. 2007;4(3):214-21.
246. Joshi SRJEOoP. Saroglitazar for the treatment of dyslipidemia in diabetic patients. 2015;16(4):597-606.

247. Zhang B-C, Li W-M, Li X-K, Zhu M-Y, Che WL, Xu Y-WJE, et al. Tesaglitazar ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development in diabetic low-density lipoprotein receptor-deficient mice. 2012;4(6):987-92.
248. Fagerberg B, Edwards S, Halmos T, Lopatynski J, Schuster H, Stender S, et al. Tesaglitazar, a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor α/γ agonist, dose-dependently improves the metabolic abnormalities associated with insulin resistance in a non-diabetic population. 2005;48(9):1716-25.
249. Wilding JP, Gause-Nilsson I, Persson AJD, Research VD. Tesaglitazar, as add-on therapy to sulphonylurea, dose-dependently improves glucose and lipid abnormalities in patients with type 2 diabetes. 2007;4(3):194-203.
250. Goto T, Lee J-Y, Teraminami A, Kim Y-I, Hirai S, Uemura T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes [S]. 2011;52(5):873-84.
251. Fruchart J-CJA. Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. 2009;205(1):1-8.
252. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. The Journal of nutrition. 1993;123(11):1939-51.
253. Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverría F, Soto-Alarcon S, Ortiz M, et al. Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR- γ and NF- κ B. 2019;109:2472-81.
254. Santana-Oliveira DA, Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello VJJoME. A PPAR- α agonist and DPP-4 inhibitor mitigate adipocyte dysfunction in obese mice. 2022;68(4):225-41.
255. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry. 2009;55(4):611-22.
256. Desvergne B, Wahli WJEr. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. 1999;20(5):649-88.
257. Quaresma PG, Reencober N, Zanotto TM, Santos AC, Weissmann L, de Matos AH, et al. Pioglitazone treatment increases food intake and decreases energy expenditure partially via hypothalamic adiponectin/adipoR1/AMPK pathway. International journal of obesity (2005). 2016;40(1):138-46.
258. Echeverria F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2016;114:28-34.
259. Kalliora C, Kyriazis ID, Oka SI, Lieu MJ, Yue Y, Area-Gomez E, et al. Dual peroxisome-proliferator-activated-receptor- α /gamma activation inhibits SIRT1-PGC1 α axis and causes cardiac dysfunction. JCI insight. 2019;5.
260. Osinski V, Bauknight DK, Dasa SSK, Harms MJ, Kroon T, Marshall MA, et al. In vivo liposomal delivery of PPAR α /gamma dual agonist tesaglitazar in a model of obesity enriches macrophage targeting and limits liver and kidney drug effects. Theranostics. 2020;10(2):585-601.
261. Quarta C, Stemmer K, Novikoff A, Yang B, Klingelhuber F, Harger A, et al. GLP-1-mediated delivery of tesaglitazar improves obesity and glucose metabolism in male mice. Nat Metab. 2022;4(8):1071-83.
262. DeFronzo RA, Inzucchi S, Abdul-Ghani M, Nissen SEJD, Research VD. Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. 2019;16(2):133-43.
263. Dietz M, Mohr P, Kuhn B, Maerki HP, Hartman P, Ruf A, et al. Comparative molecular profiling of the PPAR α /gamma activator aleglitazar: PPAR selectivity, activity and interaction with cofactors. ChemMedChem. 2012;7(6):1101-11.

264. Capelli D, Cerchia C, Montanari R, Loiodice F, Tortorella P, Laghezza A, et al. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci Rep*. 2016;6:34792.
265. Zanchi A, Dulloo AG, Perregaux C, Montani JP, Burnier M. Telmisartan prevents the glitazone-induced weight gain without interfering with its insulin-sensitizing properties. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(1):E91-5.
266. Schoeler M, Caesar RJRiE, Disorders M. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. 2019;20(4):461-72.
267. Ortigao R, Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Libanio D. Gastrointestinal Microbiome - What We Need to Know in Clinical Practice. *GE Port J Gastroenterol*. 2020;27(5):336-51.
268. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. 2010;59(12):3049-57.
269. Louis S, Tappu R-M, Damms-Machado A, Huson DH, Bischoff SCJPO. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing. 2016;11(2):e0149564.
270. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(8):933-44.
271. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbin BA, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*. 2007;204(13):3067-76.
272. Hersoug LG, Møller P, Loft SJOR. Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. 2016;17(4):297-312.
273. Milinovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwerkerk D, et al. Erratum: Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *The ISME Journal*. 2008;2(11):1169-.
274. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SDJTJoem. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. 1994;180(3):1025-35.
275. Wurfel MM, Wright SDJTJoI. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. 1997;158(8):3925-34.
276. Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, Draï J, Chanséaume E, Lambert-Porcheron S, et al. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. 2014;58(7):1513-8.
277. Medzhitov R, Horng TJNRI. Transcriptional control of the inflammatory response. 2009;9(10):692-703.
278. Schroder K, Tschopp JJC. The inflammasomes. 2010;140(6):821-32.
279. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR research*. 2007;2007:95974.
280. Rangel-Azevedo C, Santana-Oliveira DA, Miranda CS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello VJTJoNB. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. 2022;105:109002.
281. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chavez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR-gamma signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science (New York, NY)*. 2017;357(6351):570-5.
282. Li X, Yao Y, Yu C, Wei T, Xi Q, Li J, et al. Modulation of PPARalpha-thermogenesis gut microbiota interactions in obese mice administrated with zingerone. *J Sci Food Agric*. 2022.
283. Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E350-7.

284. Pellegrinelli V, Peirce VJ, Howard L, Virtue S, Türei D, Senzacqua M, et al. Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. *Nature communications*. 2018;9(1):4974.
285. Hondares E, Rosell M, Diaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(50):43112-22.
286. Barberá MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt MJJoBC. Peroxisome proliferator-activated receptor α activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene: a link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. 2001;276(2):1486-93.
287. Riley CL, Mills EM. The role of UCP3 in brown adipose tissue mitochondrial bioenergetics is complementary to that of UCP1. *bioRxiv*. 2020.
288. Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrugge M, Proenza AM, Gianotti M, Llado I. Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Mol Cell Biochem*. 2013;373(1-2):125-35.
289. Seo J, Fortuno III ES, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, et al. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. 2009;58(11):2565-73.
290. Quirós PM, Prado MA, Zamboni N, D'Amico D, Williams RW, Finley D, et al. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. 2017;216(7):2027-45.
291. Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, et al. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. 2002;157(7):1151-60.
292. Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverria F, Soto-Alarcon S, Ortiz M, et al. The metabolic dysfunction of white adipose tissue induced in mice by a high-fat diet is abrogated by co-administration of docosahexaenoic acid and hydroxytyrosol. *Food Funct*. 2020;11(10):9086-102.
293. Jash S, Banerjee S, Lee MJ, Farmer SR, Puri V. CIDEA Transcriptionally Regulates UCP1 for Britening and Thermogenesis in Human Fat Cells. *iScience*. 2019;20:73-89.
294. Li Y, Kang H, Chu Y, Jin Y, Zhang L, Yang R, et al. Cidec differentially regulates lipid deposition and secretion through two tissue-specific isoforms. 2018;641:265-71.
295. Klaus SJCdt. Adipose tissue as a regulator of energy balance. 2004;5(3):241-50.
296. Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, et al. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. 2000;24(6):782-8.
297. Berendoncks AMV, Stensvold D, Garnier A, Fortin D, Sente T, Vrints CJ, et al. Disturbed adiponectin-AMPK system in skeletal muscle of patients with metabolic syndrome. 2015;22(2):203-5.
298. Schindler M, Pendzialek M, Grybel KJ, Seeling T, Gürke J, Fischer B, et al. Adiponectin stimulates lipid metabolism via AMPK in rabbit blastocysts. 2017;32(7):1382-92.
299. Min SY, Kady J, Nam M, Rojas-Rodriguez R, Berkenwald A, Kim JH, et al. Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med*. 2016;22(3):312-8.
300. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012;149(4):871-85.
301. Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell metabolism*. 2014;19(4):593-604.

302. Kazak L, Rahbani JF, Samborska B, Lu GZ, Jedrychowski MP, Lajoie M, et al. Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nat Metab.* 2019;1(3):360-70.
303. Peleli M, Ferreira DMS, Tarnawski L, McCann Haworth S, Xuechen L, Zhuge Z, et al. Dietary nitrate attenuates high-fat diet-induced obesity via mechanisms involving higher adipocyte respiration and alterations in inflammatory status. *Redox Biol.* 2020;28:101387.
304. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:498.
305. Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017;23(12):1454-65.
306. Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, et al. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat Med.* 2015;21(4):389-94.
307. Finocchietto P, Perez H, Blanco G, Miksztowicz V, Marotte C, Morales C, et al. Inhibition of mitochondrial fission by Drp-1 blockade by short-term leptin and Mdivi-1 treatment improves white adipose tissue abnormalities in obesity and diabetes. *Pharmacological research.* 2022;178:106028.
308. Kotiadis VN, Duchon MR, Osellame LD. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochimica et biophysica acta.* 2014;1840(4):1254-65.
309. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008;27(2):433-46.
310. Chella Krishnan K, Vergnes L, Acin-Perez R, Stiles L, Shum M, Ma L, et al. Sex-specific genetic regulation of adipose mitochondria and metabolic syndrome by Ndufv2. *Nat Metab.* 2021;3(11):1552-68.
311. Moore TM, Cheng L, Wolf DM, Ngo J, Segawa M, Zhu X, et al. Parkin regulates adiposity by coordinating mitophagy with mitochondrial biogenesis in white adipocytes. *Nature communications.* 2022;13(1):6661.
312. Cui C, Chen S, Qiao J, Qing L, Wang L, He T, et al. PINK1-Parkin alleviates metabolic stress induced by obesity in adipose tissue and in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* 2018;498(3):445-52.
313. Ko MS, Yun JY, Baek IJ, Jang JE, Hwang JJ, Lee SE, et al. Mitophagy deficiency increases NLRP3 to induce brown fat dysfunction in mice. *Autophagy.* 2021;17(5):1205-21.
314. Chen D, Li X, Zhang L, Zhu M, Gao L. A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues. *J Cell Biochem.* 2018;119(11):9602.

ANEXO A – Comitê de ética

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 "**Ativação PPAR alfa/gama no eixo intestino-adiposo: modulação da microbiota, browning e whitening em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**", registrado com o nº 017/2021, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, 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), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)/IBRAG/UERJ, em reunião de 01/06/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2025
Espécie / linhagem / raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	100
Peso / Idade	20 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

A aprovação pela CEUA/IBRAG/UERJ é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2021.

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

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

ANEXO B – Publicações de artigos científicos referentes aos resultados do doutorado

Nutrition 117 (2024) 112253



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjournal.com

Applied nutritional investigation

PPAR α / γ synergism activates UCP1-dependent and -independent thermogenesis and improves mitochondrial dynamics in the beige adipocytes of high-fat fed miceCarolline Santos Miranda^a, Flávia Maria Silva-Veiga^a, Daiana Araujo Santana-Oliveira^a, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro^a, Julio Beltrame Daleprane^b, Vanessa Souza-Mello^{a,*}^a Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil^b Laboratory for Studies of Interactions Between Nutrition and Genetics (LEING), Institute of Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 24 July 2023

Received in revised form 11 September 2023

Accepted 29 September 2023

Keywords:

UCP1

Thermogenesis

Browning

PPAR

Obesity

Mitochondria

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activation (single PPAR α or PPAR γ , and dual PPAR α / γ) on UCP1-dependent and -independent thermogenic pathways and mitochondrial metabolism in the subcutaneous white adipose tissue of mice fed a high-fat diet.

Methods: Male C57BL/6 mice received either a control diet (10% lipids) or a high-fat diet (HF; 50% lipids) for 12 wk. The HF group was divided to receive the treatments for 4 wk: HF γ (pioglitazone, 10 mg/kg), HF α (WY-14643, 3.5 mg/kg), and HF α / γ (tesaglitazar, 4 mg/kg).

Results: The HF group was overweight, insulin resistant, and had subcutaneous white adipocyte dysfunction. Treatment with PPAR α and PPAR α / γ reduced body mass, mitigated insulin resistance, and induced browning with increased UCP1-dependent and -independent thermogenesis activation and improved mitochondrial metabolism to support the beige adipocyte phenotype.

Conclusion: PPAR α and dual PPAR α / γ activation recruited UCP1⁺ beige adipocytes and favored UCP1-independent thermogenesis, yielding body mass and insulin sensitivity normalization. Preserved mitochondrial metabolism emerges as a potential target for obesity treatment using PPAR agonists, with possible clinical applications.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Molecular and Cellular Endocrinology 562 (2023) 111839



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity

Carolline Santos Miranda^a, Flávia Maria Silva-Veiga^a, Aline Fernandes-da-Silva^a, Vitória Regina Guimarães Pereira^a, Bruna Cadete Martins^b, Julio Beltrame Daleprane^b, Fabiane Ferreira Martins^a, Vanessa Souza-Mello^{a,*}^a Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil^b Laboratory for Studies of Interactions Between Nutrition and Genetics (LEING), Institute of Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Carolyn M. Klinge

Keywords:

brown adipose tissue

Whitening

PPAR

Gut dysbiosis

Endotoxemia

Obesity

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effects of single PPAR α or PPAR γ activation, and their synergism (combined PPAR α / γ activation) upon the gut-adipose tissue axis, focusing on the endotoxemia and upstream interscapular brown adipose tissue (IBAT) function in high-saturated fat-fed mice. **Methods:** Male C57BL/6 mice received a control diet (C, 10% lipids) or a high-fat diet (HF, 50% lipids) for 12 weeks. Then, the HF group was divided to receive the treatments for four weeks: HF γ (pioglitazone, 10 mg/kg), HF α (WY-14643, 3.5 mg/kg), and HF α / γ (tesaglitazar, 4 mg/kg). **Results:** The HF group exhibited overweight, oral glucose intolerance, gut dysbiosis, altered gut permeability, and endotoxemia, culminating in IBAT whitening. The downregulation of LPS-Tlr4 signaling underpinned reduced inflammation and improved lipid metabolism in IBAT in the HF α / γ group, the unique to show normalized body mass and increased energy expenditure. **Conclusion:** PPAR α / γ synergism treated obesity by ameliorating the gut-adipose tissue axis, where restored gut microbiota and permeability controlled endotoxemia and rescued IBAT whitening through favored thermogenesis.

ANEXO C – Publicação e submissão de artigo científico de primeira autoria durante o doutorado



Journal of the American Nutrition Association



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/uacn21>

Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice

Carolline Santos Miranda, Flávia Maria Silva-Veiga, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Gabrielle Carvalho Brito, Fabiane Ferreira Martins & Vanessa Souza-Mello

To cite this article: Carolline Santos Miranda, Flávia Maria Silva-Veiga, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Gabrielle Carvalho Brito, Fabiane Ferreira Martins & Vanessa Souza-Mello (2023) Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice, Journal of the American Nutrition Association, 42:5, 435-444, DOI: [10.1080/07315724.2022.2062686](https://doi.org/10.1080/07315724.2022.2062686)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07315724.2022.2062686>



Published online: 13 Jul 2022.

F6Publishing is an online manuscript submission, peer review, modification, production, and release system

F6Publishing

Home Resources Blog Help Desk Themes Logout

Manuscript Query

Name of Journal: Manuscript Title: Manuscript ID:

Status: Date of Submit: -

Manuscript List

	Manuscript Review	#	Email Records	Files Download	Manuscript ID	Manuscript Title	Name of Journal	Date of Submit	Time to Article Published Processes	Status	Article Published
View Detail	Reviews completed: 2 Review invitations accepted: 2 Review invitations sent: 125				89723	Time-dependent impact of a high-fat diet on the intestinal barrier of male mice	World Journal of Methodology	2023-11-10 13:01		Re-reviewed	

ANEXO D - Publicações de artigos científicos em colaboração durante o período do doutorado



An Acad Bras Cienc (2023) 95(Suppl. 2): e20220784 DOI 10.1590/0001-3765202320220784
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

BIOMEDICAL SCIENCES

Long-term hepatic damage in high-fructose-fed C57BL/6 mice: hepatic fibrogenesis, endoplasmic reticulum stress markers, and fibrosis

BRENDA OLIVEIRA-CORDEIRO, ALINE FERNANDES-DA-SILVA, FLAVIA MARIA SILVA-VEIGA, CAROLLINE S. MIRANDA, FABIANE F. MARTINS & VANESSA SOUZA-MELLO



World Journal of Gastroenterology

Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2023 July 14; 29(26): 4136-4155

DOI: [10.3748/wjg.v29.i26.4136](https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i26.4136)

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

REVIEW

Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas

Henrique Souza-Tavares, Caroline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Cristian Sandoval, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Flavia Maria Silva-Veiga, Aline Fernandes-da-Silva, Vanessa Souza-Mello



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 105 (2022) 109002

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

RESEARCH PAPER

Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications

Camilla Rangel-Azevedo, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Caroline Santos Miranda, Fabiane Ferreira Martins, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello*

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

Received 31 July 2021; received in revised form 23 November 2021; accepted 22 February 2022

**Journal of Molecular
Endocrinology**

D A Santana-Oliveira,
A Fernandes-da-Silva et al.

Anti-obesity PPAR-alpha and
DPP-4i effects

68:4

225–241

RESEARCH

A PPAR-alpha agonist and DPP-4 inhibitor mitigate adipocyte dysfunction in obese mice

Daiana Araujo Santana-Oliveira*, Aline Fernandes-da-Silva*, Caroline Santos Miranda, Fabiane Ferreira Martins, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda and Vanessa Souza-Mello

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

Correspondence should be addressed to V Souza-Mello: souzamello.uerj@gmail.com

*(D A Santana-Oliveira and A Fernandes-da-Silva contributed equally to this work)



*World Journal of
Gastroenterology*

Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2022 May 7; 28(17): 1814-1829

DOI: [10.3748/wjg.v28.i17.1814](https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i17.1814)

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and dipeptidyl peptidase-4 inhibition target dysbiosis to treat fatty liver in obese mice

Flavia Maria Silva-Veiga, Caroline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Henrique Souza-Tavares, Fabiane Ferreira Martins, Julio Beltrame Daleprane, Vanessa Souza-Mello



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/NTR

Original Research

A rise in Proteobacteria is an indicator of gut-liver axis-mediated nonalcoholic fatty liver disease in high-fructose-fed adult mice [☆]



Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro^{a,b}, Flávia Maria Silva-Veiga^a,
Carolline Santos Miranda^a, Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves^b,
Julio Beltrame Daleprane^c, Vanessa Souza-Mello^{a,*}

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

^bLaboratory of bioactive compounds, LABBIO, School of Nutrition, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^cLaboratory for Studies of Interactions Between Nutrition and Genetics, LEING, Institute of Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

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

REVIEW



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

Aline Fernandes-da-Silva¹ · Carolline Santos Miranda¹ · Daiana Araujo Santana-Oliveira¹ ·
Brenda Oliveira-Cordeiro¹ · Camilla Rangel-Azevedo¹ · Flávia Maria Silva-Veiga¹ · Fabiane Ferreira Martins¹ ·
Vanessa Souza-Mello¹

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

Journal of
Endocrinology

F M Silva-Veiga et al.

Treatments to NAFLD by
microbiota modulation

247:1

11–24

RESEARCH

Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linagliptin

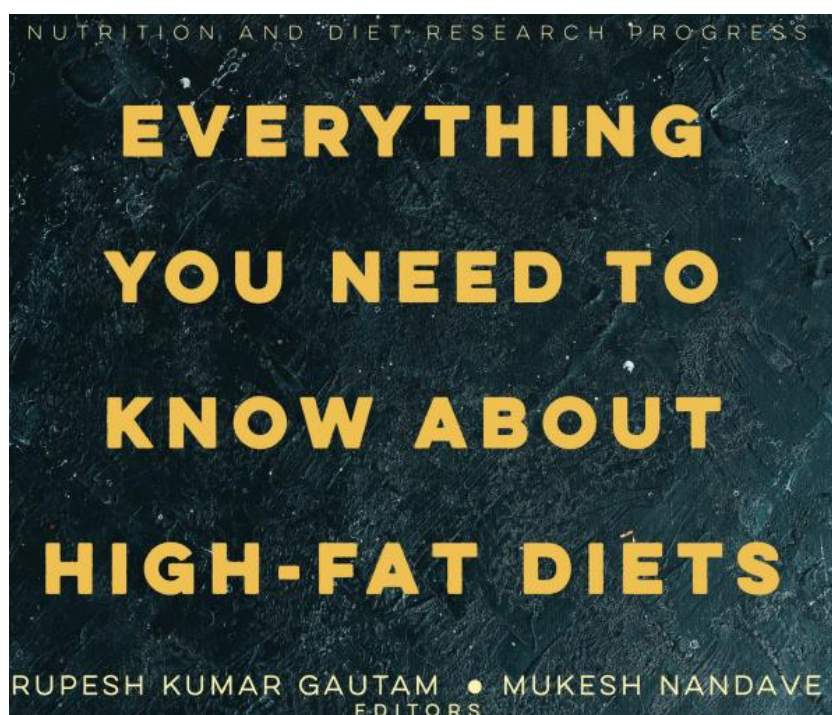
Flávia Maria Silva-Veiga¹, Carolline Santos Miranda¹, Fabiane Ferreira Martins¹, Julio Beltrame Daleprane²,
Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda¹ and Vanessa Souza-Mello¹

¹Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory for Studies of Interactions between Nutrition and Genetics, LEING, Institute of Nutrition, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to V Souza-Mello: souzamello.uerj@gmail.com

ANEXO E – Participação da elaboração de um capítulo de livro



Chapter 6	High-Fat Diets and Cardiometabolic Diseases	89
	Vanessa Souza-Mello, Tamiris Ingrid Petito-da-Silva, Carolline Santos Miranda, Flávia Maria da Silva-Veiga, Grazielle V. B. Huguenin and Sandra Barbosa-da-Silva	
Chapter 7	A Retrospective Study on the Impact of High-Fat Diets on Human Health Related to Metabolic Associated Diseases	123
	Rajat Goyal, Isha Rani and Rupesh K. Gautam	
Chapter 8	Diagnostic and Prognostic Markers for High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome	135
	Jayesh V. Beladiya and Anita A. Mehta	