



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

JORGE LUIS SANTOS CARLOS

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPOSIÇÃO AO FRIO E ESTIMULAÇÃO
BETA-3 ADRENÉRGICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

BRASÍLIA
2021

JORGE LUIS SANTOS CARLOS	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPOSIÇÃO AO FRIO E ESTIMULAÇÃO BETA-3 ADRENÉRGICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6	BRASÍLIA 2021
-----------------------------	---	------------------

JORGE LUIS SANTOS CARLOS

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPOSIÇÃO AO FRIO E ESTIMULAÇÃO
BETA-3 ADRENÉRGICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Um volume

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Co-orientadora: Andreza Fabro de Bem

BRASÍLIA

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica

Jorge Luis Santos Carlos

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPOSIÇÃO AO FRIO E ESTIMULAÇÃO
BETA-3 ADRENÉRGICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 25 de junho de 2021.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra – Universidade de Brasília

Dra. Fernanda Cerqueira Barroso Oliveira – Centro Universitário Estácio

Dra. Carolina Martins Ribeiro – Ministério da Saúde (via Fiotec)

Dedicatória.

A memória do meu avô Carlos Augusto, que amava esta Universidade e amava as pessoas de forma única.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Annalu, que fez o possível e o impossível para me apoiar, sempre dedicada e carinhosa me puxando para o que realmente importa na vida.

À Professora Dra. Angélica Amorim Amato, além de uma orientadora fantástica, uma pessoa sem igual, de bondade única e uma paciência sem precedentes, só tenho a agradecer muito. Sem dúvida um exemplo de profissional e pessoa a ser seguido.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) – UnB, em especial as queridas Carol, Nady, Louise, Paula e Fernandinha. Aos PIBICS Pedro, Paulo e Malu. Um agradecimento mais que especial também ao amigo Sidney que contribuiu demais com esse trabalho, me ensinou muito, especialmente sobre humildade e simplicidade, OBRIGADO!

À minha família que torceu muito por mim e me apoiou nos momentos mais difíceis que ocorreram nesse período que certamente não foram fáceis. Mamãe Anaires, Bia e Gabrielzinho, esse trabalho também tem um pouquinho de vocês.

A minha filha Ana Luísa que está chegando e a quem pedi muito para que esperasse a conclusão desse trabalho e sua defesa para chegar e nos brindar com essa felicidade sem fim. Obrigado por me dar forças, filha. Sem dúvidas você foi a pessoa que me deu forças para concluir esse trabalho quando estava mais difícil de seguir.

RESUMO

SANTOS CARLOS, Jorge Luis. **Avaliação comparativa da exposição ao frio e estimulação β 3-adrenérgica em camundongos C57BL/6. Brasília, 2021.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

A obesidade e outras doenças metabólicas tem se apresentado atualmente como doenças em pandemia, dessa forma, estabelecer alvos terapêuticos e novas estratégias de controle se faz urgente. Nesse contexto algumas abordagens para identificar novos alvos terapêuticos utilizam modelos tais como a exposição ao frio como fator fisiológico para a termogênese e o uso de agonistas β 3-adrenérgico como estímulo farmacológico. Uma série de trabalhos correlacionam essas duas abordagens, dessa forma, esse trabalho se propôs a realizar uma avaliação comparativa entre os diferentes estímulos. Os resultados de massa corporal, temperatura corporal e características histológicas corroboram com essa percepção.

Palavras-chave: Termogênese, exposição ao frio, agonista β 3-adrenérgico.

ABSTRACT

SANTOS CARLOS, Jorge Luis. **Comparative evaluation of cold exposure and β 3-adrenergic agonist in C57BL/6 mice.** Brasília, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

Obesity and other metabolic diseases are presented currently as pandemic diseases, thus establishing therapeutic targets and new control strategies is urgent. In this context, some approaches to identify new therapeutic targets use such as cold exposure as a physiological factor for thermogenesis and the use of β 3-adrenergic agonists as a pharmacological stimulus. A series of works correlates these two approaches, thus this work proposed to obtain a comparative evaluation between the different stimuli. The results of body mass, body temperature and histological characteristics corroborate this perception.

Keyword: Thermogenesis, cold exposure, β 3-adrenergic agonist.

LISTA DE FIGURAS

Figuras Capítulo 1

- Figura 1 – Localização do TAB e TAM em murinos e alguns locais em humanos... **14**
- Figura 2 – Linhagem evolutiva dos adipócitos. Adipócitos marrons derivam de células Pax7+/Myf5+ e adipócitos brancos e bege derivam de células Pax7-/Myf5-. A ativação dos adipócitos bege ocorre pelo frio ou outros indutores..... **15**
- Figura 3 – Funções e regulações do tecido adiposo..... **16**
- Figura 4 – mecanismo clássico de produção de ATP via ATP sintase na membrana interna da mitocôndria..... **20**
- Figura 5 – Localização e função da UCP1 na cadeia respiratória mitocondrial..... **21**
- Figura 6 – Adaptação neuro-humoral e metabólica (A) exposição ao frio e (B) jejum. **23**
- Figura 7 – Representação esquemática da ativação fisiológica da termogênese adaptativa em condições específicas..... **25**
- Figura 8 – Ativação do receptor β -3 adrenérgico por norepinefrina..... **27**
- Figura 9 – Estufa da marca eletrolab modelo EL202/3..... **30**

Figuras Capítulo 2

- Figura 1 – (A) Avaliação da massa corporal entre a 5^a e a 14^a semanas (B) do ganho médio de massa corporal de cada grupo entre a 5^a e a 14^a semanas. Os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica a partir da 5^a semana de vida e individualizados a partir da 13^a semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM, n = 8/grupo. * grupo apresenta diferença estatística dos outros grupos p=0,0023..... **46**
- Figura 2 - (A) Massa corporal entre a 13^a e 15^a semanas e (B) variação de massa corporal no decorrer da intervenção na 15^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM, n = 4 a 8/grupo, e analisados por one-way ANOVA; p=0,0064 (grupos frio e agonista B3 versus controle)..... **47**
- Figura 3 – Massa relativa do (A) tecido adiposo branco epididimal, (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marrom interescapular dos grupos de estudo. Dados apresentados como média \pm EPM (n = 4 a 8/grupo) e analisados por análise de variância One-Way ANOVA..... **48**
- Figura 4 – Temperatura dos camundongos durante a intervenção. Temperatura aferida com termômetro do tipo laser, na região abdominal. Dados apresentados como média \pm EPM (n = 4 a 8/grupo)..... **49**

Figura 5 – Imagens termográficas dos animais em estudo durante o período de tratamento, separados por grupos.....**50**

Figura 6 – Características histológicas do tecido adiposo marrom (TAM) interescapular e tecido adiposo branco (TAB) inguinal e epididimal. Coloração com Hematoxilina-Eosina com uso de resolução para visualização a 100 µm.....**51**

LISTA DE TABELAS

Figuras Capítulo 1

Tabela 1 – Classificação do IMC12

Figuras Capítulo 2

Tabela 1 – Número de animais por grupo e número de animais ao final do estudo.....45

Tabela 2 – Massa absoluta e relativa de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, conforme o grupo de tratamento.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FS – Faculdade de Saúde

UnB – Universidade de Brasília

HFD – *High Fat Diet*

HT – Hormônios tireoidianos

IMC – Índice de Massa Corpórea

OMS – Organização Mundial de Saúde

T3 – Triiodotironina

T4 – Tetraiodotironina ou tiroxina

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

TR – Receptor do hormônio da tireoide

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

TSH – Hormônio estimulante da tireoide (TSH).

UCP1 – Proteína desacopladora tipo 1 ou termogenina

SUMÁRIO

PREFÁCIO	8
CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. OBESIDADE.....	11
2.2. TECIDO ADIPOSO E ADIPÓCITOS.....	12
2.3. TERMOGÊNESE.....	19
2.4. ATIVAÇÃO DA TERMOGÊNESE: EXPOSIÇÃO AO FRIO E AGONISTAS	
BETA-3 ADRENÉRGICOS.....	24
3. OBJETIVOS	28
3.1. <i>Objetivo geral</i>	28
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. <i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	29
4.2. <i>ANÁLISE HISTOLÓGICA</i>	31
4.2.1. Preparo das lâminas histológicas	31
4.2.1.1. Fixação de tecidos	31
4.2.1.2. Desidratação e inclusão em parafina.....	31
4.2.1.3. Corte no micrótomo.....	31
4.2.1.4. Coloração com corante hematoxilina-eosina.....	31
4.2.1.5. Captação de imagens das lâminas	32
4.3. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	32
5. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2	39
RESUMO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS	42
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO 1	63
ANEXO 2.....	63

PREFÁCIO

Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa amplo, intitulado “Metabolismo do colesterol e termogênese: estudo da termogênese no tecido adiposo em animais com nocaute do receptor de LDL”, que visa avaliar os efeitos de alterações do metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) sobre a termogênese adaptativa, por abordagem genética, com emprego de animais nocaute para receptores LDL estimulados por meio de exposição ao frio ou agonista do receptor β 3-adrenérgico. O objetivo do presente estudo foi comparar os dois estímulos à termogênese, a exposição ao frio e a estimulação β 3-adrenérgica, sobre a massa corporal, temperatura corporal, massa de tecido adiposo e características morfológicas do tecido adiposo.

Este trabalho foi estruturado dividindo em dois blocos gerais, nomeados capítulos, o primeiro correspondendo a uma introdução ao trabalho e apresentando elementos textuais exigidos pelo programa, e uma revisão de literatura buscando contextualizar o trabalho e facilitar sua compreensão, servindo como ponto de partida para aprofundamento no tema. O segundo bloco se apresenta em formato de artigo científico apresentando os resultados, discutindo esses achados e apresentando as conclusões.

Esse prefácio também se faz importante para contextualizar o momento histórico em que o estudo foi conduzido e apresentar algumas limitações devido a esse momento. No ano de 2020 o mundo foi apresentado a uma pandemia por um tipo de coronavírus, SARS-COV-2. Esse fato levou a diversas incertezas, levou ao fechamento de espaços importantes da Universidade, tal como o biotério, onde ainda gostaríamos de ter conduzido um outro grupo em uso de dieta normolipídica. Enfrentamos ainda o desafio de realizar o primeiro experimento de exposição de camundongos ao frio em nosso laboratório. Embora seja uma abordagem corriqueira, requer uma série de cuidados para garantir o bem-estar dos animais. Assim, o estudo foi considerado um piloto e há a perspectiva de conduzi-lo novamente, com ajuste de algumas condições. Há, também, perspectiva de realizar os testes moleculares para avaliar a expressão de mRNA de alguns marcadores de termogênese. E por fim todo o contexto da pandemia causou diversos desconfortos e transtornos psicológicos no autor principal do trabalho e em muitas pessoas durante esse período.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma epidemia global com morbidade e mortalidade significativas que afeta adultos e crianças. A resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão são frequentemente encontradas em pacientes obesos. Estas condições podem, ainda, aparecer em conjunto, caracterizando a síndrome metabólica, que aumenta o risco de diabetes e doenças cardiovasculares (CROWLEY, 2008; LEDE et al. 2016).

O tecido adiposo é composto por adipócitos distintos: o tecido adiposo branco (TAB) é composto de adipócitos brancos e adipócitos bege, já o tecido adiposo marrom (TAM) é composto por adipócitos marrons. Cada adipócito possui características distintas e em relação ao adipócito marrom e o adipócito branco por exemplo, a quantidade de mitocôndrias encontradas nos adipócitos marrons são superiores das encontradas em adipócitos brancos, além de outras características principalmente referente as funções celulares (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

A ativação das vias termogênicas por meio da atividade simpática aumenta a atividade do TAM e, conseqüentemente, da proteína desacopladora 1 (UCP1), gerando produção de calor. A termogênese no TAM é totalmente dependente da UCP1, expressa seletivamente na mitocôndria dos adipócitos, que tem atividade de desacoplar a fosforilação oxidativa de síntese de ATP, dissipando assim energia na forma de calor (HENRY et al. 2011; SAITO, 2014). Aglomerados de adipócitos que expressam UCP1, com capacidade termogênica, também se desenvolvem no TAB em resposta a vários estímulos, e são denominados adipócitos bege.

Recentemente, foi caracterizado um novo tipo de adipócito, o adipócito bege, que possui impacto positivo sobre o metabolismo sistêmico, resultado de sua atividade termogênica (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014) em resposta ao frio ou ativação da sinalização β 3-adrenérgica. Himms-Hagen e colaboradores (1994) mostraram o efeito de um novo agonista β 3-adrenérgico altamente seletivo, CL-316,243 (CL), sobre o balanço energético e nos tecidos adiposos marrom e branco de camundongos jovens com obesidade induzida pela dieta. O tratamento crônico com o CL aumentou a temperatura corporal e o gasto energético, principalmente pelo aumento da taxa metabólica de repouso. A ingestão de alimentos não foi alterada, mas a quantidade de tecido adiposo foi reduzida. Os animais apresentaram também alterações favoráveis nas características dos tecidos adiposos branco e marrom, sugerindo que esta via de sinalização pode ser um auxiliar no tratamento da obesidade.

Apesar da capacidade comum de executar termogênese, adipócitos bege e marrons têm muitas características diferentes. Os adipócitos marrons expressam altos níveis de UCP1 e de outros genes relacionados à termogênese sob condições basais, enquanto os adipócitos bege expressam estes genes apenas em resposta a ativadores, tais como agonistas do receptor β 3-adrenérgico ou receptor ativado por proliferadores peroxisomais γ (PPAR γ) (HARMS e SEALE, 2013).

O frio é o principal estímulo fisiológico para a termogênese nos adipócitos marrons e bege. A atividade termogênica é promovida, em modelos animais, por abordagens genéticas, que envolvem superexpressão da maquinaria termogênica, abordagens farmacológicas, como o uso de agonistas β 3-adrenérgicos, e pela própria exposição ao frio. As duas últimas abordagens são as mais simples e, assim, mais comumente empregadas (SON'KIN; KIRDIN; ANDREEV; AKIMOV, 2010). Entretanto, não está claro se o efeito dessas abordagens é comparável quando se consideram os diversos desfechos relacionados à homeostase metabólica, inclusive a termogênese. Pretende-se com esse trabalho avaliar de forma comparativa os efeitos desses diferentes estímulos sobre o tecido adiposo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OBESIDADE

A obesidade é hoje uma doença pandêmica, as preocupações relacionadas a ela são decorrentes em boa parte de suas altas taxas de morbidade e mortalidade. Por vezes os óbitos ocasionados por essa doença são prematuros e frequentemente associados com diversas disfunções metabólicas (MARTÍNEZ-GARCIA et al, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 1975 até o momento o quantitativo de pessoas com obesidade praticamente triplicou. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, sendo que destes 650 milhões eram obesos. A obesidade infantil também é um desafio a ser enfrentado. Em 2016, 340 milhões de crianças e adolescentes (idades entre 5 e 19 anos) se encontravam com sobrepeso ou obesos (WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A obesidade é uma forma de adaptação do organismo humano para balancear a conta de alta ingestão de nutrientes associada a um gasto energético baixo frente ao volume de nutrientes ingeridos. Claramente outros fatores também contribuem para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações, é possível citar fatores ambientais, genéticos e epigenéticos dentre outros (RANGEL-HUERTA; PASTOR-VILLAESCUSA; GIL, 2019).

O diagnóstico da obesidade é realizado pela avaliação do índice de massa corpórea (IMC). O cálculo do IMC permite classificar um indivíduo entre os graus de desnutrição até obesidade mórbida. No entanto, esse índice não consegue mensurar e avaliar as alterações e disfunções metabólicas associadas à obesidade, tais como o processo inflamatório que ocorre no tecido adiposo ou ainda resistência à insulina. Assim, estabelecer protocolos para uma avaliação ampla do metabolismo se faz uma tarefa árdua e desafiadora (RANGEL-HUERTA; PASTOR-VILLAESCUSA; GIL, 2019).

Tabela 1: Classificação do IMC Segundo a OMS

Classificação do IMC	
> 18,5	Abaixo do peso
Entre 18,5 e 24,9	Normal
Entre 25,0 e 29,9	Sobrepeso
≥ 30,0	Obesidade

Um dos principais mecanismos que explica a associação entre a obesidade e eventos metabólicos desfavoráveis é a inflamação crônica do tecido adiposo. Nessa situação, há liberação de diversas interleucinas e adipocinas, entre outros fatores, sendo todos esses envolvidos também em várias vias metabólicas e sistêmicas, em que podemos citar a angiogênese, metabolismo de glicose e lipídeos, produção de hormônios sexuais, imunidade em vias gerais, saciedade e microbiota gastrointestinal (GOMEZ-LLORENTE, et al., 2017).

2.2. TECIDO ADIPOSEO E ADIPÓCITOS

O tecido adiposo possui diversas funções, uma fisiologia complexa. Por muitos anos o tecido adiposo foi considerado apenas um tecido que armazenava lipídeos. As informações a respeito desse tecido se ampliaram e se aprofundaram em meados dos anos 80 e 90. Foram identificados como originários do tecido adiposo alguns fatores encontrados no soro de humanos, tais como adipsina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e leptina. Dessa forma o tecido adiposo foi caracterizado também como um órgão endócrino, o que mudou completamente a compreensão a respeito de seu papel fisiológico e o enfoque dos estudos a seu respeito (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

O tecido adiposo surgiu como uma adaptação em mamíferos obtida no intuito de armazenar energia obtida e não utilizada imediatamente, o que em longos períodos de escassez de alimentos garantiria a manutenção da energia e metabolismo do animal. O fato de não necessitar de água como solventes, uma vez que as moléculas de lipídeos são hidrofóbicas, faz com que seja possível armazenar grandes quantidades destes compostos. Estes, por sua vez, contêm grande quantidade de energia armazenada com um peso menor, reduzindo o espaço necessário para armazenamento de energia e tornando o tecido adiposo o principal reservatório de energia presente em mamíferos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

São descritos dois tipos distintos de tecido adiposo, o TAB e o TAM. Ambos são capazes de armazenar energia na forma de triaciglicerol e hidrolisá-los em forma de ácidos graxos e glicerol. A distinção entre os dois tipos de tecidos adiposos se baseia desde a localização anatômica dos mesmos (Figura 1), passando por diferenças morfológicas, funcionais e a regulação metabólica de cada um deles. A primeira e mais óbvia diferença é relacionada à sua coloração, diferença essa que nomeia os tecidos, mas claramente com tipos celulares diferentes, ou seja, tipos distintos de adipócitos (PÉNICAUD et al., 2000).

O TAM é especializado na termogênese e, dessa forma, participa ativamente da manutenção da temperatura corporal. Os adipócitos marrons que compõem o TAM possuem tamanho muito menor, de aproximadamente 60 μm , que o adipócito branco, cujo tamanho é de aproximadamente 100 μm . Os adipócitos marrons possuem uma quantidade maior de mitocôndrias em comparação com os adipócitos brancos e a termogênese ocorre marcadamente ligada à atividade da termogenina ou proteína desacopladora tipo 1 (UCP1), que desacopla a cadeia transportadora de elétrons da síntese de ATP (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O TAB é encontrado em diversos sítios anatômicos e, além das funções metabólicas, o TAB também possui importante função estrutural, oferecendo proteção de vísceras contra traumatismos, e auxiliando a ocorrência de um deslizamento adequado entre as vísceras e feixes musculares, sem que haja comprometimento da integridade e funcionalidade dos mesmos. Com relação ao metabolismo, possui função marcante de armazenamento energético, além de função endócrina muito importante, influenciando processos como a função reprodutiva, regulação do apetite, insulina, entre outras (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

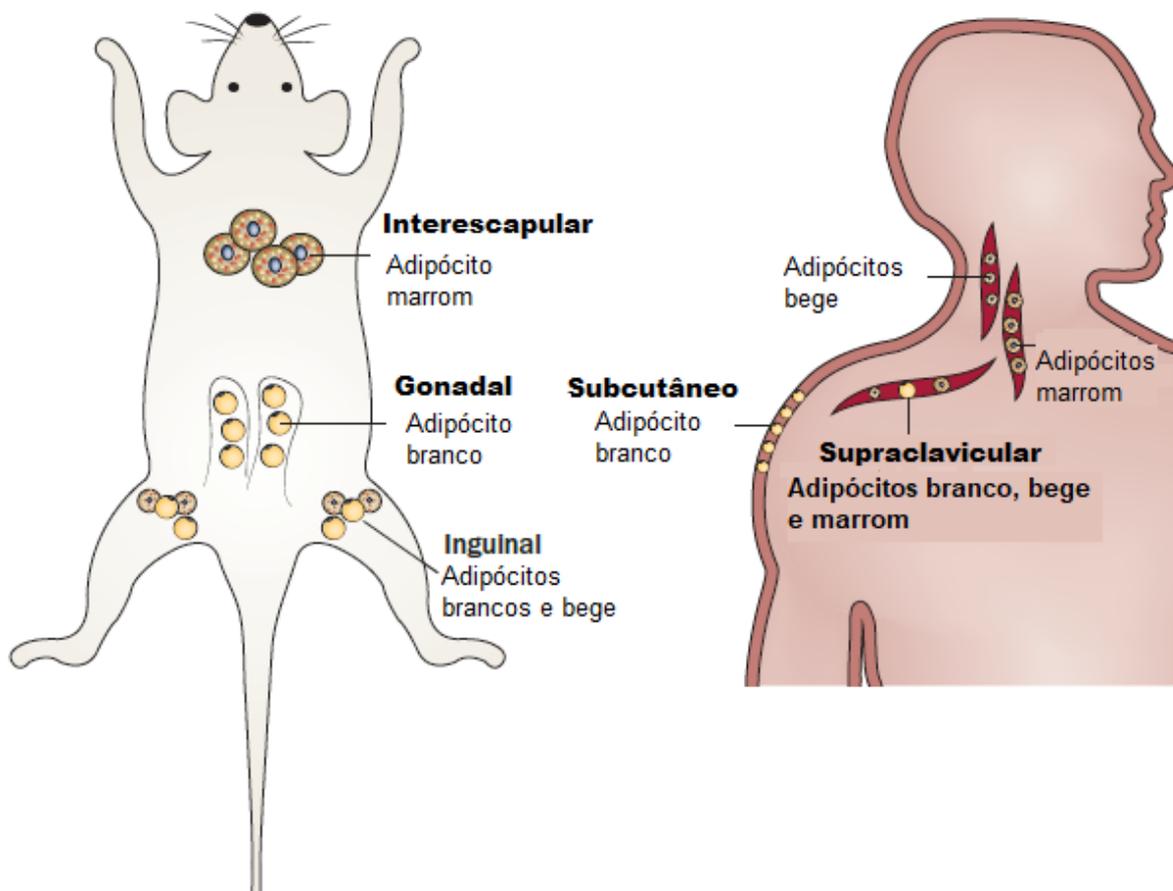


Figura 1: Localização do TAB e TAM em murinos e alguns locais em humanos. Adaptado de Bartelt, 2013.

Temos tipos distintos de adipócitos (Figura 2), os adipócitos por definição clássica foram subdivididos apenas entre os adipócitos brancos e os adipócitos marrons, aqueles especializados no armazenamento de gordura, se tratava basicamente de células para armazenamento de energia em certo grau e que constavam em maior número no organismo de mamíferos, por outro lado, os adipócitos marrons, apresentam características diferentes e são especializados em gastar a energia na forma de calor, por meio da termogênese. São, também, menos numerosos que os brancos (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

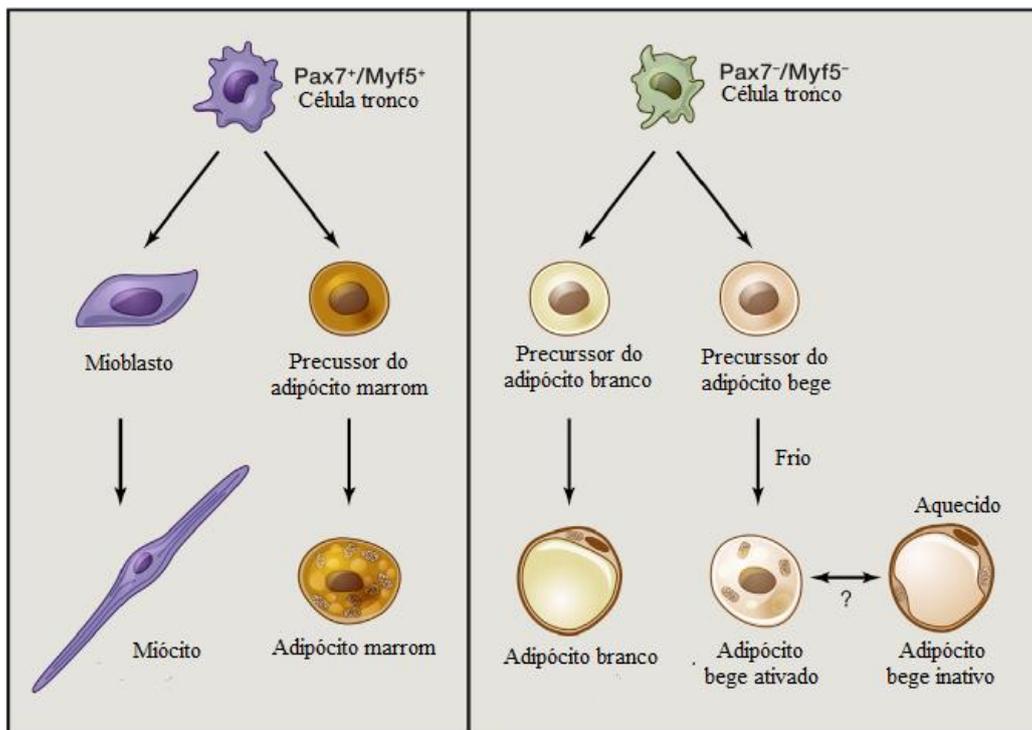


Figura 2: Linhagem evolutiva dos adipócitos. Adipócitos marrons derivam de células Pax7⁺/Myf5⁺ e adipócitos brancos e bege derivam de células Pax7⁻/Myf5⁻. A ativação dos adipócitos bege ocorre pelo frio ou outros indutores. Adaptado de Rosen e Spiegelman, 2014.

Os adipócitos brancos compõem de modo geral o TAB, armazenando lipídios e, fisiologicamente, em situação de demanda energética não contemplada pela alimentação, liberam ácidos graxos por meio da lipólise, ofertando fonte de energia para o organismo. Entretanto, o acúmulo anormal de lipídios no TAB, em diversos casos com hipertrofia tecidual característica, caracteriza a obesidade. O armazenamento e utilização desses nutrientes armazenados está diretamente associado a ciclos de fartura e escassez de alimentos de modo geral (BARTELT, 2013).

Adipócitos brancos atuam em uma função protetora contra danos lipotóxicos de outros tecidos através de sua capacidade de armazenamento de lipídeos, esses adipócitos também participam da regulação energética exercendo uma função secretora, sendo essa correlacionada com a função regulatória fisiológica e metabólica geral do tecido adiposo (Figura 3). Foram observados entre os fatores secretados pelos adipócitos brancos alguns que exercem funções autócrinas e parácrinas locais, o que afeta principalmente o remodelamento do tecido adiposo, adipogênese e angiogênese (WANG; MARIMAN; RENES; KEIJER, 2008).

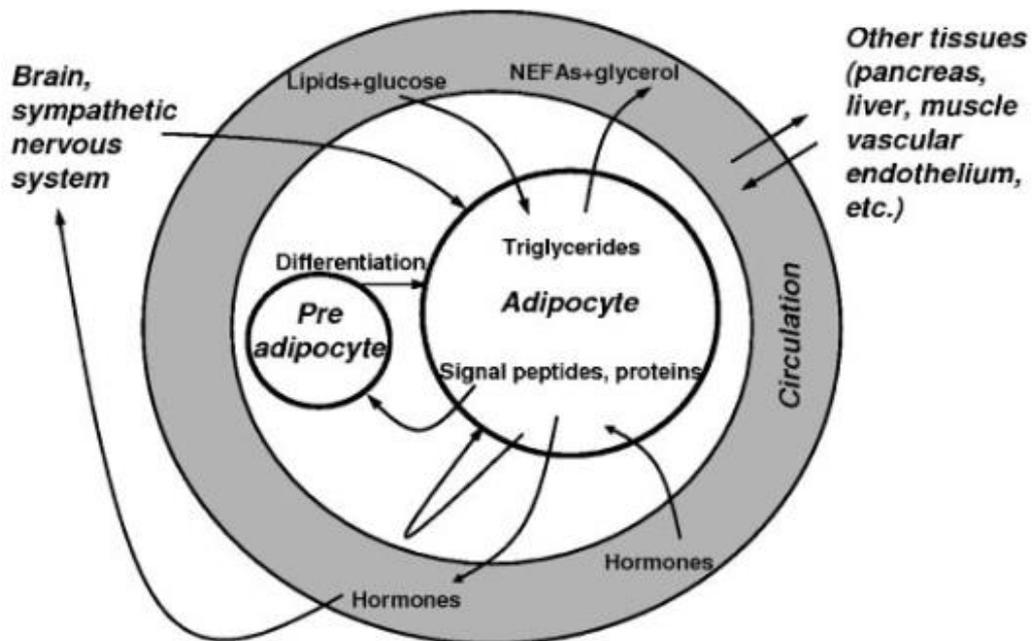


Figura 3: Funções e regulações do tecido adiposo adaptado de WANG; MARIMAN; RENES; KEIJER, 2008.

Durante a gestação e a lactação são formadas estruturas que produzem o leite materno, alvéolos, essas estruturas não são identificadas em fêmeas não gestantes ou lactantes, nesses casos a região é preenchida por tecido adiposo, cerca de 90% do volume composto por adipócitos. Diversos trabalhos apontam para que os alvéolos formados no período da gestação derivam da conversão direta de adipócitos em células produtoras de leite e que após o período de lactação essas mesmas estruturas são revertidas em adipócitos. Em algumas observações foram identificados que a estrutura alveolar é rica em células lipídicas e esses possuem notória função endócrina e com isso essa organização celular atende os requisitos para caracterizar órgão e em seguida essas células também atenderam aos requisitos para serem caracterizadas como adipócitos. Devido ao tecido adiposo encontrado em fêmeas gestantes e lactantes possuir coloração visivelmente rosa esses adipócitos são nomeados como adipócitos rosa e foram caracterizados a pouco tempo (CINTI, 2019).

Os adipócitos bege são uma espécie de forma intermediária entre os adipócitos brancos e adipócitos marrom, esses são imunorreativos para UCP1, entretanto essa imunorreação é frequentemente menos intensa que a dos adipócitos marrons. A denominação bege para esses adipócitos foi devido a ser uma célula que se coloca entre as características dos adipócitos brancos e adipócitos marrons, características essas que dependendo do estímulo levam essas células a estarem mais próximas de um tipo de adipócito ou outro, assumindo também as funções metabólicas e estruturais desses adipócitos (CINTI, 2019).

Os adipócitos marrons possuem uma estrutura rica em mitocôndrias em contraponto a um número menor nos adipócitos brancos, a função dessa característica é a geração contínua de energia armazenada através do desacoplamento de prótons e geração de ATP com liberação térmica, conhecida por uma termogênese não oriunda de tremores, o que dissipa a energia acumulada no tecido em energia térmica mantendo os mamíferos, que possuem esses tecidos em locais chave, aquecidos. Esse mecanismo é essencial para mamíferos em hibernação e filhotes, ou mesmo crianças humanas, devido ao seu volume versus superfície corporal (KAJIMURA; SAITO, 2014).

A exposição prolongada ao frio ou exposição prolongada a sinalização adrenérgica promove um aumento na expressão de UCP1 em adipócitos com características similares aos adipócitos marrons em TAB, mais adiante essas células seriam denominadas adipócitos bege. Por muitos anos essas células não foram mais bem caracterizadas e apenas denominadas como adipócitos marrons, no entanto ao observar melhor essas células estudos mostraram que as mesmas apesar de várias características semelhantes aos adipócitos marrons possuíam uma expressão genica que se sobrepõe, no entanto distinta aos adipócitos marrons. Ambas expressam de forma semelhante genes termogênicos e mitocondriais, inclusive UCP1, contudo em murinos por exemplo há expressão de marcadores de superfície como Cd137 e Tmem26 que são presentes apenas em adipócitos bege e não em adipócitos marrons (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

2.3. TERMOGÊNESE

A temperatura corporal em mamíferos é em geral de aproximadamente 37°C, quando em ambientes com temperaturas mais baixas a resposta gerada libera energia térmica para manter a temperatura corporal, esse processo é denominado termogênese e tem relação direta com o gasto energético (TRAYHURN, 2003).

Podemos subdividir a termogênese em duas classificações: obrigatória, ocorrendo em temperatura ambiente e em estado de vigília e repouso, não realizando processos digestivos (em jejum mínimo de 12 horas), e a termogênese facultativa ou adaptativa onde ocorre uma modulação metabólica visando uma adaptação ambiental, essa podendo ser devida a alterações na temperatura do ambiente ou ainda sobre a ingestão de alimentos fazendo com que haja aumento do gasto energético em repouso, é importante salientar que a ocorrência de termogênese adaptativa como forma de perda de massa corporal não ocorre de forma situacional mas de forma sustentada com relação a exposição ao cenário que corrobora com a necessidade adaptativa (BIANCO, 2000; UETA, 2009; MULLËR; BOSY-WESTPHAL, 2013).

A regulação da temperatura corporal advém de mecanismos evolutivos e é importante para homeostase metabólica. Em ambientes em termoneutralidade a termogênese obrigatória é suficiente para manter a homeotermia, contudo a manutenção da temperatura corporal em ambientes frios, é regulada pela termogênese adaptativa, uma vez que a geração de calor basal não é suficiente para manter a temperatura corporal em ambientes como esse. A homeotermia é essencial para a homeostase, uma vez que as reações metabólicas em um organismo homeotérmico dependem da manutenção de uma temperatura adequada para que ocorram, dessa forma há a ativação de mecanismos metabólicos para a manutenção da temperatura corporal e esses têm relação direta com a termogênese adaptativa (SILVA, 2006).

Há dois tipos distintos de mecanismos termorregulatórios que visam a produção de calor e, conseqüentemente a manutenção da temperatura corporal, eles são a termogênese com tremor e sem tremor (TRAYHURN, 2003).

A termogênese com tremores geralmente envolve pequenas contrações musculares gerando calor, ocorre em geral em ambientes frios. Contudo é desvantajoso frente a termogênese sem tremores. A termogênese com tremores se trata de uma resposta inicial ao estímulo do frio e é o que ocorre mais inicialmente durante uma curta exposição ao frio ou ainda em um primeiro momento de exposição prolongada a esse estímulo (TRAYHURN, 2003).

Já a termogênese sem tremores, que é a resposta de longo prazo na termogênese adaptativa, está relacionada a produção de calor sem as contrações musculares envolvidas no outro tipo de termogênese citado anteriormente. O mecanismo melhor documentado e mais reconhecido para termogênese sem tremores é o da alteração na síntese e hidrólise de ATP realizada pela UCP1, na cadeia respiratória mitocondrial realizada na mitocôndria dos adipócitos, especialmente em adipócitos marrom e bege que expressam quantidades superiores de UCP1. O que ocorre nesse processo é o desacoplamento do gradiente de prótons na mitocôndria da síntese de ATP, pela UCP1, gerando dissipação de energia na forma de calor e não é utilizado para a síntese de ATP, diferente do que normalmente ocorreria em outros tecidos (Figura 4) (TRAYHURN, 2003; CANNON; NEDERGAARD, 2004; SILVA, 2006).

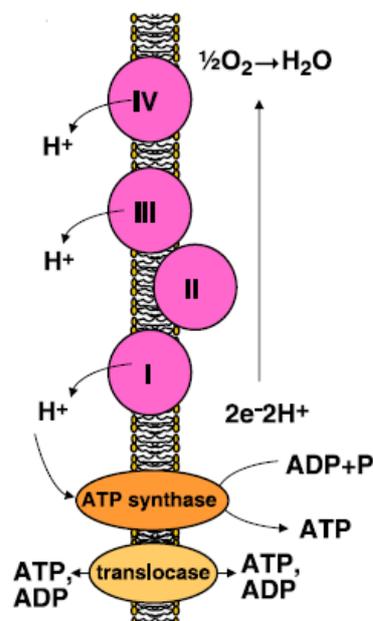


Figura 4: mecanismo clássico de produção de ATP via ATP sintase na membrana interna da mitocôndria. Adaptado de Silva, 2006.

A produção e dissipação do calor gerado pelo organismo, seja ele por termogênese obrigatória ou adaptativa é essencial para a homeostase. Nos casos de ressíntese de ATP e outros compostos macro energéticos ou hidrólise de ATP e outras moléculas de armazenamento energético a geração de energia é algo inerente ao processo da reação química para formação das moléculas energéticas ou ainda do seu uso e essas são características de reações envolvidas na termogênese obrigatória. Ocorrem reações mitocondriais na cadeia de transporte de elétrons sem a formação de compostos macroenergéticos que dissipam calor, essa forma de gasto energético está associada diretamente a termogênese adaptativa. Foram observados em diversos estudos a ativação de termogênese adaptativa por dietas hipercalóricas e tendo papel de regulação na homeostase, ou seja, por vezes esses mecanismos colaboram com a manutenção de níveis adequados de nutrientes e hormônios em distribuição pelo organismo (SON'KIN; KIRDIN; ANDREEV; AKIMOV, 2010).

A UCP1 é membro da família das proteínas carreadores de ânions, que conta ainda com as UCPs 2, 3, 4 e 5, e é expressa nas cristas mitocondriais de adipócitos. Outras UCPs são distribuídas em outros tecidos, o que faz com que a UCP1 seja interessante na perspectiva do controle de peso e gasto energético por seu sítio de expressão, o TAM e os adipócitos bege no TAB. Ao desacoplar da cadeia respiratória mitocondrial um próton e gerar energia térmica, a UCP1 (Figura 5) efetiva a resposta. Este processo é estimulado pela sinalização beta-adrenérgica, que pode se dar pelo uso de β 3-adrenérgicos ou ainda fisiologicamente pela exposição ao frio (BRONDANI et al, 2012).

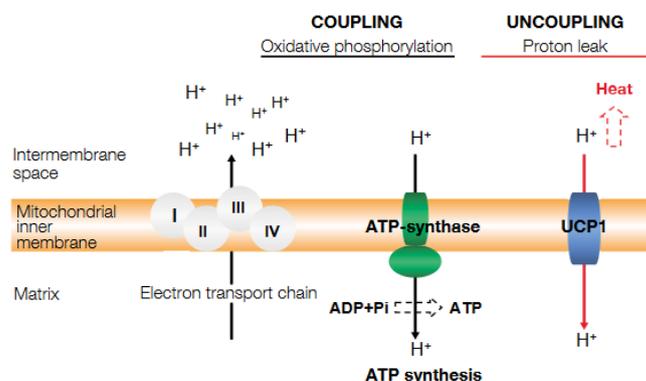


Figura 5: Localização e função da UCP1 na cadeia respiratória mitocondrial. Adaptado de BRONDANI, 2012.

O uso de camundongos, *mus musculus*, como modelos experimentais de metabolismo, imunidade, fisiologia cardiovascular e algumas patologias humanas é corriqueiro devido a correlação entre os genes de camundongos e humanos além da possibilidade de fácil manipulação de genes dos camundongos, através das diversas ferramentas desenvolvidas recentemente que facilitaram esse uso, para atender a demandas específicas e auxiliar na resposta sobre nossa biologia. Dessa forma podemos assumir que as informações obtidas com os estudos em camundongos podem nos trazer informações importantes sobre a biologia humana, embora isso seja verdadeiro há em todo caso uma diferença considerável entre as duas fisiologias que podem gerar vieses em resultados pré-clínicos, mas as respostas até então obtidas são importantes e auxiliam de forma significativa em respostas sobre a biologia humana (BASTÍAS-PÉREZ; ZAGMUTT; SOLER-VÁZQUEZ; SERRA; MERA; HERRERO, 2020).

Os camundongos são animais homeotérmicos, dessa forma realizam termogênese no intuito de manter a temperatura corporal. Devido as características dos camundongos enquanto mamíferos e com relação a homeotermia também são observados neles adipócitos com as mesmas características encontradas em humanos (BASTÍAS-PÉREZ; ZAGMUTT; SOLER-VÁZQUEZ; SERRA; MERA; HERRERO, 2020).

A termogênese pode ser evidenciada em situações específicas ou com estímulos específicos que estão diretamente relacionados a vias metabólicas, homeostase metabólica e homeotermia. A exposição ao frio ativa mecanismos físicos, tais como reações vasomotoras e pilomotoras, e mecanismos metabólicos, relacionados a ativação do sistema nervoso simpático e adrenal, esse em especial pela norepinefrina, esses mecanismos estimulam os receptores β -adrenérgicos, que induzem a termogênese, o amarronzamento de adipócitos bege e o recrutamento de novas células para o TAM (SON'KIN; KIRDIN; ANDREEV; AKIMOV, 2010).

Uma vez que estudos sugerem a ativação de receptores β -adrenérgicos geram uma sinalização que ativa a termogênese em alvos periféricos, dessa forma testes com o estímulo farmacológico de agonistas β -adrenérgicos seletivos mostram um potente estímulo da termogênese. Entre os receptores β -adrenérgicos um em específico se mostrou mais efetivo e sendo assim passou a ser mais utilizado como modelo, se trata dos receptores β_3 -adrenérgicos (LOWELL; BACHMAN, 2003).

Os hormônios tireoidianos (HT) são de vital importância para a termogênese, homeostase energética e metabolismo. A mediação do ciclo de feedback do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é efetuada pela ativação direta da isoforma β do receptor do hormônio da tireoide (TR) que sinaliza para reduzir a secreção de TRH e do hormônio estimulante da tireoide (TSH). Após exposição ao frio, neurônios TRH são ativados e induzem um aumento no processamento de TRH, liberação de TRH e uma estimulação subsequente da tireoide com níveis mais elevados de HT (Figura 6). Os HT ativam a gliconeogênese hepática, termogênese, lipólise e aumenta a absorção de glicose pelos músculos, elevando assim o gasto energético (ROSENBAUM; LEILBEL, 2010; IWEN; OELKRUG; BRABANT, 2018).

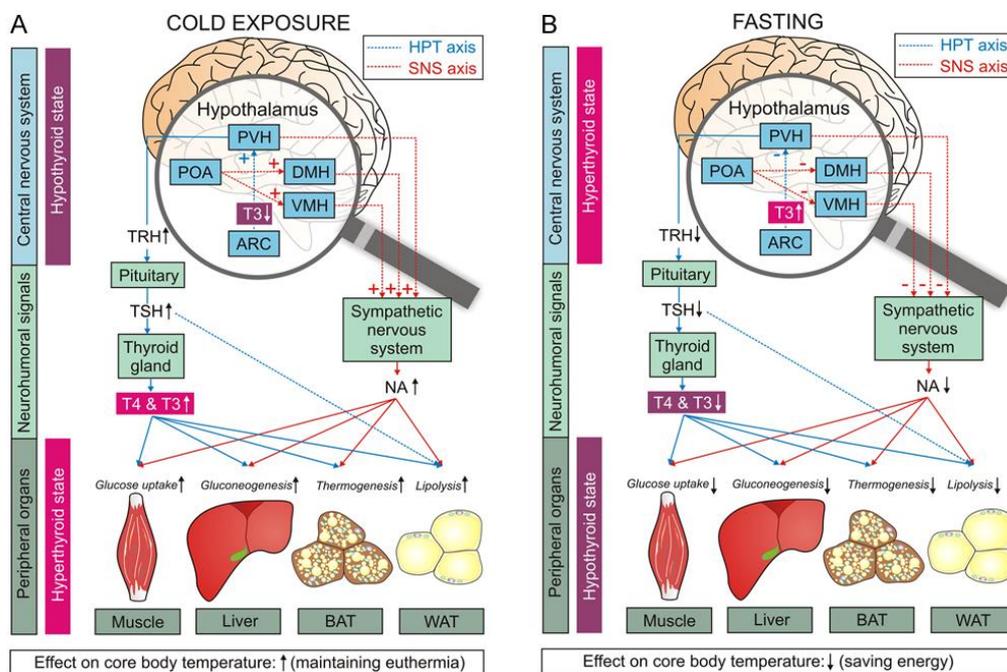


Figura 6: Adaptação neuro-humoral e metabólica (A) exposição ao frio e (B) jejum adaptado de (IWEN; OELKRUG; BRABANT, 2018).

2.4. ATIVAÇÃO DA TERMOGÊNESE: EXPOSIÇÃO AO FRIO E AGONISTAS BETA-3 ADRENÉRGICOS

Em uma exposição aguda ao frio há a ativação da termogênese adaptativa sem tremores alguns segundos após o início dessa, e sua resposta máxima ativada após 1 a 2 minutos de exposição. O mecanismo de resposta ao frio foi evidenciado como o principal mecanismo fisiológico para a termogênese (SON'KIN; KIRDIN; ANDREEV; AKIMOV, 2010).

Em situações de exposição ao frio há uma ativação dos termocetores que sinalizam para a região ventromedial do núcleo hipotalâmico e então esse ativa o sistema nervoso simpático com a liberação de norepinefrina, essa sinalização desencadeia a degradação de triglicerídeos nos adipócitos marrons. Essa sinalização ocorre pela ativação dos receptores β 3-adrenérgicos pela norepinefrina. Um sinal intracelular é transmitido por AMP cíclico e proteína kinase A, levando assim a liberação de triglicerídeos e ácidos graxos, sendo esses substratos para a termogênese. A degradação de ácidos graxos na cadeia respiratória mitocondrial leva a extrusão de íons H^+ através da ação da UCP1, essa reação libera energia térmica e ao invés do que ocorreria em outras células, devido a esse mecanismo não há formação de ATP (Figura 7). Esse mecanismo termogênico gasta quantidades significativas de energia (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

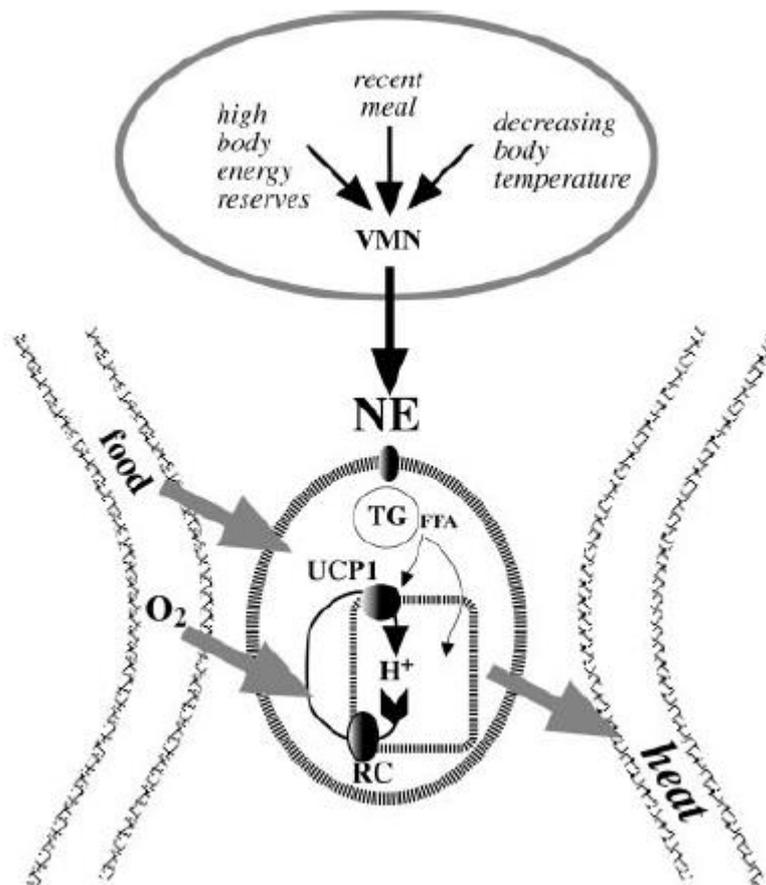


Figura 7: Representação esquemática da ativação fisiológica da termogênese adaptativa em condições específicas. Adaptado de CANNON; NEDERGAARD, 2004.

Os HT possuem um importante papel de modulação de UCP1. A transcrição da UCP1 é regulada positivamente por elementos de resposta aos HT, o que, portanto, envolve os HT nesta atividade de consumo energético. A concentração intracelular de triiodotironina (T3) é relativamente independente dos níveis circulantes de HT, e é regulada pela desidinase tipo 2. A DIO2 é conduzido pela cascata de sinalização do AMP cíclico β -adrenérgico (cAMP), que promove um aumento na conversão intracelular do pró-hormônio T4 em T3, o ligante do TR. E então a ativação β -adrenérgica e a regulação transcricional de UCP1 são uma outra via de ativação da termogênese (VAITKUS; FARRAR; CELI, 2015).

Em adipócitos marrom e bege encontramos grande quantidade de UCP1 que irão desacoplar íons da cadeia de transporte de elétrons e que ao fim da libera energia térmica ao invés de geração de ATP, ou seja, ocorre através da ativação dessa via metabólica a termogênese. A expressão de UCP1 é um fator chave para que essas células desempenhem um importante papel na homeostase e na manutenção da temperatura corporal (CANNON; NEDERGAARD, 2004; HERZ; KIEFER, 2019).

Adipócitos bege se apresentam em diferentes estados dependendo de diversos estímulos possíveis, tais como, temperatura, genética ou uso de determinados fármacos. Os adipócitos bege podem apresentar fenótipos tanto de adipócitos brancos quanto de adipócitos marrom, a expressão desses fenótipos dependerá dos fatores anteriormente citados, essa estimulação a diferenciação dos adipócitos bege localizados no TAB é conhecida como amarronzamento do tecido ou em inglês "*browning*". Um dos fatores que induzem de forma importante fisiologicamente o amarronzamento do tecido, aumentando presença de adipócitos bege com características de adipócitos marrom, é a exposição ao frio. Baixas temperaturas identificadas pelas terminações nervosas da pele geram sinal central que libera norepinefrina por sinalização simpática (HERZ; KIEFER, 2019).

Em adipócitos marrons maduros, a norepinefrina atua por meio de sua ligação com os receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β , expressos na membrana desta célula. A ativação destes receptores, por sua vez diferentes vias de sinalização celular (Figura 8). A ativação dos receptores β_3 -adrenérgicos, especificamente, caracterizar a sinalização mais detalhadamente nos adipócitos marrons leva a estimulação da termogênese (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

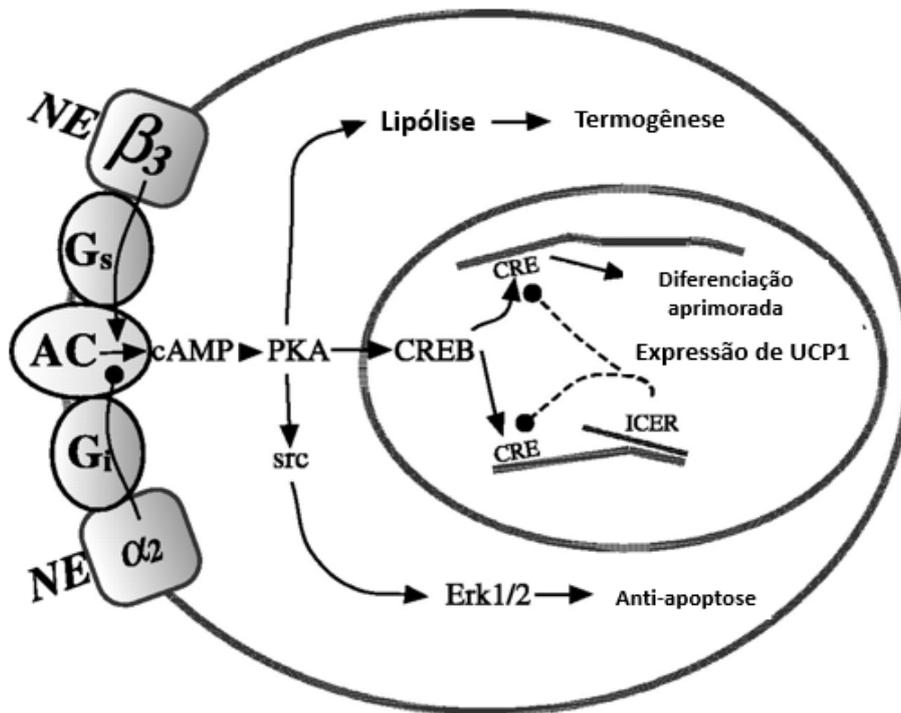


Figura 8: Ativação do receptor β_3 -adrenérgico por norepinefrina. Adaptado de Cannon e Nedergaard (2004).

Apesar de possuir quantidades significativas de mitocôndrias os adipócitos marrons contam com uma baixa capacidade de produção de ATP, entretanto expressam uma quantidade significativa de UCP1. Nas mitocôndrias dos adipócitos marrons devido aos baixos níveis de ATP sintase e níveis mais elevados de UCP1 o estímulo a termogênese ocorre, isso se dá através do desacoplamento dos prótons na respiração celular pela UCP1 gerando calor ao invés de ATP (KAJIMURA; SAITO, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o efeito do estímulo da termogênese no tecido adiposo *in vivo* em resposta à sinalização β 3-adrenérgica e por exposição ao frio.

3.2. Objetivos específicos

Investigar o efeito do tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL-316,243 e exposição ao frio, em camundongos C57BL/6 e alimentados com dieta normo ou hiperlipídica de forma comparativa, sobre:

- Massa corporal e ingestão de energia.
- Temperatura corporal.
- Massa dos depósitos de TAM interescapular, branco epididimal e inguinal.
- Estrutura histológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (parecer número 27/2019, ANEXO I). Os procedimentos a que foram submetidos os animais seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, 2011*) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA 2013).

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 4 semanas de idade, obtidos do biotério central da Universidade Católica de Brasília. Após sua chegada ao biotério da Faculdade de Medicina da UnB, os animais passaram por um período de adaptação ao novo ambiente antes de sua utilização, com duração de 1 semana, em que receberam dieta padrão (normolipídica), na forma de *pellet*. A partir da 5ª semana, foram alimentados com dieta hiperlipídica (60% de lipídeos), também fornecida na forma de *pellet*. O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum* e os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura de 24°C com ciclos claro-escuros fixos de 12/12 horas.

Aos 35 dias de vida, os animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com os tratamentos:

(1) Grupo controle: receberam dieta hiperlipídica da 5ª semana até a 15ª semana de vida e foram mantidos a 24°C durante todo o experimento (n = 8);

(2) Agonista β 3-adrenérgico: receberam dieta hiperlipídica da 5ª semana até a 15ª semana de vida e foram mantidos a 24°C durante todo o experimento e tratados com o agonista β 3-adrenérgico CL 316,243 durante a última semana de experimentação (n = 8);

(3) Exposição ao frio: receberam dieta hiperlipídica da 5ª semana até a 15ª semana de vida e foram expostos ao frio (temperatura de 6°C) durante a última semana de experimentação (n = 8).

Entre a 5^a e a 13^a semanas de vida, foram avaliados a massa corporal, o consumo de dieta e a ingestão hídrica, uma vez por semana. Entre a 14^a e 15^a semanas, a massa corporal e o consumo de dieta foram avaliados diariamente.

O agonista β 3-adrenérgico utilizado foi o CL316,243, na dose de 1 mg/kg/dia, diluído em cloreto de sódio a 0,9% e administrado por via intraperitoneal 1 vez ao dia, durante 5 dias (entre a 14^a e a 15^a semanas de vida) (SANCHEZ-GURMACHES et al., 2012).

Os animais foram colocados em uma câmara de exposição durante a última semana do experimento com temperatura controlada entre 4 e 6 °C (Figura 9) por um período de cinco dias, dentro da câmara as luzes eram ligadas as seis horas da manhã e desligadas as dezoito horas, no intuito de emular o ciclo de claro e escuro, diariamente os animais eram retirados para terem sua massa corporal, temperatura e consumo de ração aferidos.



Figura 9: Estufa da marca eletrolab modelo EL202/3

Entre a 14^a e a 15^a semanas de vida, uma semana antes das intervenções, todos os grupos foram individualizados, tendo em vista que este procedimento é necessário para proceder a exposição a frio, conforme recomendação para este tipo de intervenção (LIM; HONEK; XUE; SEKI; CAO; ANDERSSON; YANG; HOSAKA; CAO, 2012).

Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes sugeridas pela Associação Americana de Medicina Veterinária. Foram coletados o TAM interescapular, TAB inguinal e epididimal. Os tecidos foram divididos após coletados e parte dos tecidos coletados foram armazenados em microtubos e congelados a -80 °C, para extração de mRNA e outra parte foi armazenada em microtubos contendo solução de paraformaldeído 10% v/v e após um mês transferidas para solução de formalina tamponada, para a realização dos cortes e análises histológicas.

4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.2.1. Preparo das lâminas histológicas

4.2.1.1. *Fixação de tecidos*

Fragmentos de tecidos adiposo marrom, branco epidídimal e inguinal e do fígado coletados e separados após a eutanásia foram armazenados em tubos contendo solução para fixação (paraformaldeído 10% v/v, em água obtida de purificador MiliQ) e após um período de um mês foi trocado para formalina tamponada para não haver riscos de danos aos tecidos fixados.

4.2.1.2. *Desidratação e inclusão em parafina*

As amostras passaram pelo processo de clareamento com xilol, impregnação em parafina.

4.2.1.3. *Coloração com corante hematoxilina-eosina*

A etapa de coloração foi realizada utilizando o corante hematoxilina-eosina, para análise das amostras teciduais em relação a suas características morfológicas.

4.2.1.4. *Captação de imagens das lâminas*

Foi utilizado o aparelho Aperio AT Turbo (Copyright © 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc) no aumento de 20x para digitalização das imagens histológicas. As imagens histológicas digitalizadas foram visualizadas utilizando o programa de leitura de imagens Aperio ImageScope (Copyright © Aperio Technologies, Inc. 2003 2014. All Rights Reserved).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e erro-padrão da média. Para comparação entre os grupos, foi utilizada análise de variância de um fator (oneway-ANOVA) seguida do pós-teste Newman-Keuls. Para comparar os grupos ao longo do tempo, foi empregada a análise de variância de dois fatores (Two-Way ANOVA). O nível de significância foi considerado $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism versão 8.0.2 (263) (GraphPad Prism Software, EUA).

5. REFERÊNCIAS

BASTÍAS-PÉREZ, Marianela; ZAGMUTT, Sebastián; SOLER-VÁZQUEZ, M Carmen; SERRA, Dolors; MERA, Paula; HERRERO, Laura. Impact of Adaptive Thermogenesis in Mice on the Treatment of Obesity. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 316-336, 28 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020316>.

BIANCO, Antonio C.. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 281-289, ago. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302000000400003>.

BRONDANI, Letícia de Almeida; ASSMANN, Taís Silveira; DUARTE, Guilherme Coutinho Kullmann; GROSS, Jorge Luiz; CANANI, Luís Henrique; CRISPIM, Daisy. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 215-225, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302012000400001>.

CANNON, Barbara; NEDERGAARD, Jan. Brown Adipose Tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 84, n. 1, p. 277-359, jan. 2004. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>.

CINTI, Saverio. White, brown, beige and pink: a rainbow in the adipose organ. **Current Opinion In Endocrine And Metabolic Research**, [S.L.], v. 4, p. 29-36, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coemr.2018.07.003>.

CROWLEY VE. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann ClinBiochem*. 2008;45(Pt 3):245–55. Epub 2008/05/17. doi: 10.1258/acb.2007.007193. pmid:18482911

FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ALONSI-VALE, M.I.C., LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Endocrinol Metab.* v. 50, n. 2, Abr. 2006

GOMEZ-LLORENTE, M^a; ROMERO, Raquel; CHUECA, Natalia; MARTINEZ-CAÑAVATE, Ana; GOMEZ-LLORENTE, Carolina. Obesity and Asthma: a missing link. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 1490-1502, 11 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071490>.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v.19, n.10, p.1252-1263, 2013.

HENRY, Belinda A.; ANDREWS, Zane B.; RAO, Alexandra; CLARKE, Iain J.. Central Leptin Activates Mitochondrial Function and Increases Heat Production in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, [s.l.], v. 152, n. 7, p. 2609-2618, 10 maio 2011. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-0143>.

HERZ, Carsten T; KIEFER, Florian W. Adipose tissue browning in mice and humans. **Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 241, n. 3, p. 97-109, jun. 2019. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/joe-18-0598>.

HIMMS-HAGEN, J.; CUI, J.; DANFORTH, E.; TAATJES, D. J.; LANG, S. S.; WATERS, B. L.; CLAUS, T. H.. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 266, n. 4, p. R1371-R1382, 1 abr. 1994. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.4.r1371>

IWEN, K Alexander; OELKRUG, Rebecca; BRABANT, Georg. Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. **Journal Of Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 157-170, abr. 2018. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/jme-17-0319>.

KAJIMURA, Shingo; SAITO, Masayuki. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 225-249, 10 fev. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170252>.

LEDE, Vera; FRANKE, Christin; MEUSEL, Andrej; TEUPSER, Daniel; RICKEN, Albert; THIERY, Joachim; SCHILLER, Jürgen; HUSTER, Daniel; SCHÖNEBERG, Torsten; SCHULZ, Angela. Severe Atherosclerosis and Hypercholesterolemia in Mice Lacking Both the Melanocortin Type 4 Receptor and Low Density Lipoprotein Receptor. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 12, p. e0167888, 28 dez. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0167888>.

LIM, Sharon; HONEK, Jennifer; XUE, Yuan; SEKI, Takahiro; CAO, Ziquan; ANDERSSON, Patrik; YANG, Xiaojuan; HOSAKA, Kayoko; CAO, Yihai. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 606-615, mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.013>.

LOWELL, Bradford B.; BACHMAN, Eric S.. β -Adrenergic Receptors, Diet-induced Thermogenesis, and Obesity. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 278, n. 32, p. 29385-29388, ago. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r300011200>.

MARTÍNEZ-GARCÍA, Fernando; MANSEGO, María L; ROJO-MARTÍNEZ, Gemma; MARCO-SOLAR, Griselda de; MORCILLO, Sonsoles; SORIGUER, Federico; REDÓN, Josep; ALONSO, Monica Pineda; MARTÍN-ESCUADERO, Juan C; COOPER, Richard s. Impact of obesity-related genes in Spanish population. **Bmc Genetics**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 111-124, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-14-111>.

MÜLLER, M.J.; BOSY-WESTPHAL, A.. Adaptive thermogenesis with weight loss in humans. **Obesity**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 218-228, fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20027>.

RANGEL-HUERTA, Oscar Daniel; PASTOR-VILLAESCUSA, Belén; GIL, Angel. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. **Metabolomics**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 1-31, jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-019-1553-y>.

REYNÉS, Bàrbara; VAN SCHOTHORST, Evert M.; KEIJER, Jaap; CERESI, Enzo; OLIVER, Paula; PALOU, Andreu. Cold Induced Depot-Specific Browning in Ferret Aortic Perivascular Adipose Tissue. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, n. 1171, p. 1-13, 18 set. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01171>.

ROSEN, Evan d.; SPIEGELMAN, Bruce m. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, [s.l.], v. 156, n. 1-2, p.20-44, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>.

ROSENBAUM, M; LEIBEL, R L. Adaptive thermogenesis in humans. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 47-55, out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.184>.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O.. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. **Physiology**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 283-293, jul. 2016. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00041.2015>.

SAITO, Masayuki. Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential [Review], *Endocrine Journal*, 2014, Volume 61, Issue 5, Pages 409-416, Released May 31, 2014, [Advance publication] Released January 09, 2014, Online ISSN 1348-4540, Print ISSN 0918-8959, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0527>

SILVA, J. Enrique. Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 435-464, abr. 2006. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00009.2005>.

SON'KIN, V. D.; KIRDIN, A. A.; ANDREEV, R. S.; AKIMOV, E. B.. Homeostatic non-shivering thermogenesis in humans facts and hypotheses. **Human Physiology**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 599-614, set. 2010. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0362119710050129>.

TRAYHURN, P.. THERMOGENESIS. **Encyclopedia Of Food Sciences And Nutrition**, [S.L.], p. 5762-5767, 2003. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01188-3>.

UETA, Cintia Bagne. **Papel dos receptores adrenérgicos β 1 e β 2 na termogênese facultativa**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. São Paulo, 2009.

VAITKUS, Janina; FARRAR, Jared; CELI, Francesco. Thyroid Hormone Mediated Modulation of Energy Expenditure. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 16158-16175, 16 jul. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160716158>.

WANG, Ping; MARIMAN, Edwin; RENES, Johan; KEIJER, Jaap. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 216, n. 1, p. 3-13, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21386>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 01 abr. 2020.

ZHANG. Y, R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD, J.M. FRIEDMAN. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (1994), pp. 425–432

CAPÍTULO 2

Avaliação comparativa da exposição ao frio e estimulação β 3-adrenérgica em camundongos C57BL/6

Jorge Luis Santos Carlos¹, Sidney Alcantara¹, Louise Tavares Garcia Pereira¹, Pedro Henrique de Souza Domingues¹, Angélica Amorim Amato¹

¹ Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

Resumo

Introdução: A estimulação β 3-adrenérgica é frequentemente utilizada como condição que mimetiza a exposição ao frio, em modelos animais e em cultura de células. Entretanto, poucos estudos investigaram de modo abrangente se essas abordagens são comparáveis. Este estudo buscou realizar uma avaliação comparativa entre a estimulação com um agonista β 3-adrenérgico e a exposição ao frio sobre a massa corporal, temperatura corporal e características histológicas do tecido adiposo.

Métodos: Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica a partir da 5ª semana de vida e divididos em três grupos para (i) permanecer a 24°C e receber veículo (controle), (ii) permanecer a 24°C e receber o agonista β 3-adrenérgico seletivo CL316,243 (1 mg/kg/dia) durante 5 dias, na 15ª semana, e (iii) ser exposto ao frio (5 a 6°C) durante 5 dias, na 15ª semana, e receber veículo. Foram analisados massa corporal, temperatura corporal e, ao final da exposição, os animais foram eutanasiados para avaliação da massa de depósitos de tecido adiposo e suas características histológicas.

Resultados: Foi observado que os camundongos expostos ao frio ou tratados com o agonista β 3-adrenérgico apresentaram perda comparável de massa corporal, em relação ao grupo controle, porém não houve alteração significativa da massa de tecidos adiposos marrom e branco. Como esperado, o grupo exposto ao frio apresentou redução de temperatura, seguida de recuperação parcial, ao passo que o grupo tratado com o agonista β 3-adrenérgico apresentou discreto aumento de temperatura. O frio e o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico apresentaram efeito comparável sobre as características histológicas do TAM e do TAB.

Conclusão: Os dados obtidos sugerem que os efeitos de estimulação β 3-adrenérgica e a exposição ao frio sobre a massa corporal e sobre as características histológicas são comparáveis. Dados moleculares podem esclarecer e contribuir com mais evidências para corroborar esses achados.

Palavras-chave: estimulação β 3-adrenérgica, exposição ao frio, massa corporal, tecido adiposo.

Introdução

A obesidade é uma epidemia global com morbidade e mortalidade significativas e que afeta adultos e crianças. A resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão são frequentemente encontradas em pacientes obesos. Estas condições podem, ainda, aparecer em conjunto, caracterizando a síndrome metabólica, que aumenta o risco de diabetes e doenças cardiovasculares (CROWLEY, 2008; LEDE et al. 2016).

Diferentes depósitos de tecido adiposo são compostos por adipócitos distintos. O tecido adiposo branco (TAB) é composto de adipócitos brancos e adipócitos bege, já o tecido adiposo marrom (TAM) é composto por adipócitos marrons. Cada tipo de adipócito possui características únicas e uma característica marcante dos adipócitos marrons e bege em relação ao adipócito branco é sua alta expressão da proteína desacopladora tipo 1 (UCP1), mediadora da termogênese. Há, ainda, outras características morfológicas e moleculares próprias de cada adipócito, que se reflete em características funcionais (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

A ativação das vias termogênicas, sobretudo por meio da atividade simpática, estimula o TAM e, conseqüentemente, a UCP1, gerando produção de calor. A termogênese no TAM é totalmente dependente da UCP1, expressa seletivamente na mitocôndria, que tem atividade de desacoplar a fosforilação oxidativa de síntese de ATP, dissipando assim energia na forma de calor (HENRY et al. 2011; SAITO, 2014). Os adipócitos bege, no TAB, também expressam UCP1 e apresentam, assim, capacidade termogênica. São bem caracterizados em roedores, denominados também adipócitos recrutáveis e observados no TAB em resposta a uma variedade de estímulos (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

Recentemente, foi observado que humanos adultos apresentam tecido adiposo termogênico e que sua presença é correlacionada com indicadores de saúde metabólica. Além disso, foi observado que esse tecido apresenta assinatura molecular dos adipócitos bege, caracterizados em roedores. Em modelos animais, há evidências sólidas de que o adipócito bege possui impacto positivo sobre o metabolismo sistêmico, resultado de sua atividade termogênica (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Dessa forma, tem havido grande interesse em se compreender a fisiologia desse adipócito. As abordagens mais comumente empregadas para promover o recrutamento de adipócitos bege são a exposição e a ativação da sinalização β 3-adrenérgica. Himms-Hagen e colaboradores (1994) mostraram o efeito de um novo agonista β 3-adrenérgico altamente seletivo, CL-316,243 (CL), sobre o balanço energético e nos tecidos adiposos marrom e branco de camundongos jovens com obesidade induzida pela dieta. O tratamento crônico com o CL aumentou a temperatura corporal e o gasto energético, principalmente pelo aumento da taxa metabólica de repouso. A ingestão de alimentos não foi alterada, mas a quantidade de tecido adiposo foi reduzida. Os animais apresentaram também alterações favoráveis nas características dos tecidos adiposos branco e marrom, sugerindo que esta via de sinalização pode ser um auxiliar no tratamento da obesidade.

Embora a exposição ao frio e a sinalização β 3-adrenérgica sejam utilizadas como abordagens para promover o recrutamento de adipócitos bege, não está claro se representam abordagens equivalentes. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi comparar o efeito da exposição ao frio e da ativação β 3-adrenérgica sobre a massa corporal, temperatura corporal e massa e características histológicas do tecido adiposo.

Material e métodos

1. Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (parecer número 27/2019, ANEXO I). Os procedimentos a que foram submetidos os animais seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, 2011*) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA 2013).

2. Procedimentos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 4 semanas de idade, obtidos do biotério central da Universidade Católica de Brasília. Os animais foram ambientados pelo período de 1 semana, em que receberam dieta padrão (normolipídica), na forma de *pellet*. O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum* e os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, organizados em 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura de 24°C com ciclos claro-escuros fixos de 12/12 horas.

A partir da 5ª semana, os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica (Pragsoluções, São Paulo), também fornecida na forma de *pellet* (composição descrita no ANEXO II), e compuseram três grupos:

(1) Controle: receberam dieta hiperlipídica da 5ª semana até a 15ª semana de vida e foram mantidos a temperatura de 24°C durante todo o experimento (n = 8);

(2) Agonista β 3-adrenérgico: receberam dieta hiperlipídica da 5^a semana até a 15^a semana de vida, foram mantidos a 24°C durante todo o experimento e tratados com o agonista β 3-adrenérgico seletivo CL316,243 durante a última semana de experimentação, por 5 dias (n = 8);

(3) Exposição ao frio: receberam dieta hiperlipídica da 5^a semana até a 15^a semana de vida e foram expostos ao frio (temperatura de 5-6°C) durante a última semana de experimentação, por 5 dias (n = 8).

A composição dos grupos não foi determinada por distribuição aleatória dos camundongos, devido à disponibilidade limitada de camundongos e necessidade de conduzir os grupos experimentais em momentos diferentes. Considerando a necessidade de individualização dos camundongos para exposição ao frio (LIM et al., 2012), os animais foram individualizados em gaiolas a partir da 14^a semana de vida, para posterior exposição ao frio do grupo correspondente (na 15^a semana de vida). Na 15^a semana de vida, os animais desse grupo foram colocados em uma câmara de exposição com temperatura controlada entre 5 e 6 °C, mantendo o ciclo claro/escuro a cada 12 horas. O CL316,243 foi administrado por via intraperitonal, na dose de 1 mg/kg/dia, diluído em cloreto de sódio a 0,9% (SANCHEZ-GURMACHES et al., 2012).

Os camundongos tiveram sua massa corporal e consumo de dieta avaliados semanalmente até a intervenção (5^a a 13^a semanas), a partir de quando foram avaliados diariamente (14^a a 15^a semana). Durante o período de intervenção, a temperatura foi aferida na região abdominal com termômetro do tipo laser e foram feitos registros termográficos diários com o uso de uma câmera termográfica modelo FLIR T420, a 1 metro de distância dos camundongos.

Ao final da intervenção, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources*, 2011) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA 2013). Foram coletados os depósitos de TAB inguinal, TAB epididimal e TAM interescapular, para determinação de sua massa e, em seguida, sua fixação em formalina. Os tecidos fixados foram emblocados em parafina, cortados com uso de micrótomo e corados com hematoxilina-eosina para análise histológica.

3. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos foram comparados por meio de análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunn. Foram considerados estatisticamente significativos valores de p inferiores a 0,05. A análise dos dados foi conduzida com uso do programa GraphPad Prism versão 8.0.

Resultados

Os animais foram recebidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, separados em grupos e os estudos foram conduzidos de acordo com os protocolos estabelecidos. Ao longo do estudo houve perda de alguns animais do grupo exposto ao frio, como descrito na Tabela 1.

Tabela 2: Número de animais por grupo e número de animais ao final do estudo.

Grupos	Animais por grupo	Animais ao final do estudo	Evento onde ocorreram perdas
Controle (a 24°C)	8	8	-
Expostos ao frio	8	4	24 horas após início da exposição ao frio
Agonista β 3-adrenérgico	8	8	-

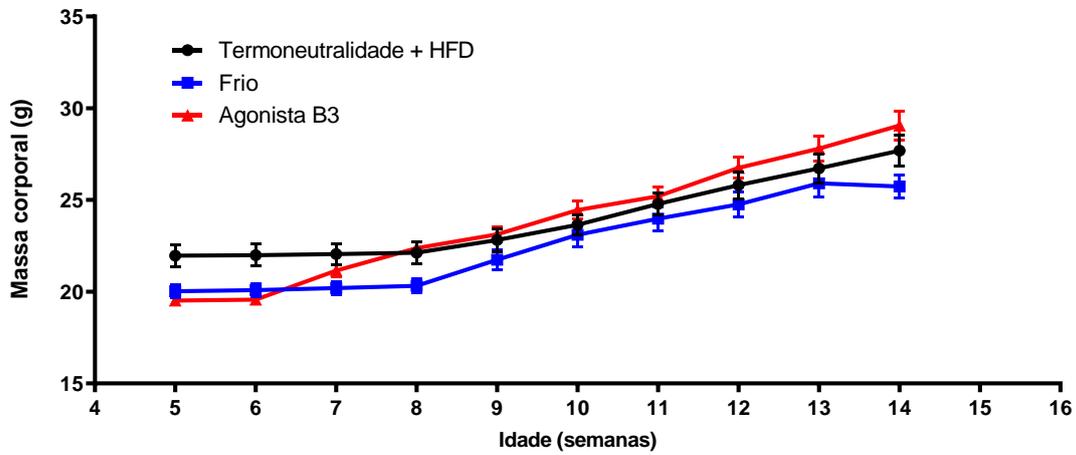
HFD – Dieta hiperlipídica com presença de 60% de gordura saturada

1. Massa corporal

Na 5ª semana de vida, em que os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos de estudo e iniciou-se a administração de dieta hiperlipídica, foi observado que o grupo controle (mantido a 24°C) apresentou massa corporal significativamente superior aos demais grupos ($21,96 \pm 1,68$ versus $20,02 \pm 1,07$ no grupo exposição ao frio e $19,52 \pm 0,80$ no grupo exposição ao agonista β 3-adrenérgico, $p = 0,0018$).

Os animais dos três grupos apresentaram massa corporal semelhante da 8ª à 14ª semana (Figura 1A). Ao final da 14ª semana, antes da intervenção, os animais do grupo exposição ao frio apresentaram perda de peso, embora não significativa e já dentro do período de individualização dos animais (Figura 1A). O ganho de massa corporal nesse período, no entanto, foi superior nos animais designados para receber o agonista β 3-adrenérgico (Figura 1B).

A



B

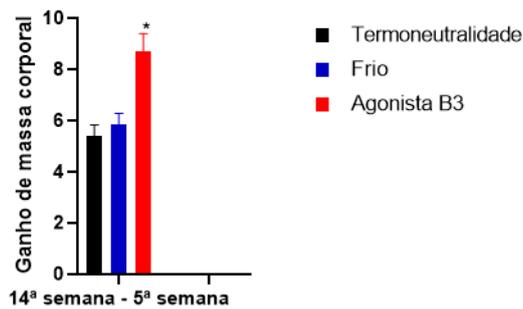
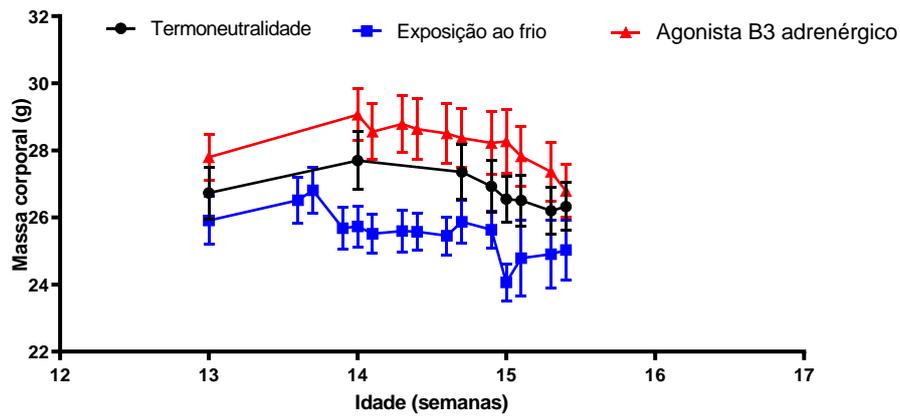


Figura 1. (A) Avaliação da massa corporal entre a 5ª e a 14ª semanas (B) do ganho médio de massa corporal de cada grupo entre a 5ª e a 14ª semanas. Os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica a partir da 5ª semana de vida e individualizados a partir da 13ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM, n = 8/grupo. * grupo apresenta diferença estatística dos outros grupos $p=0,0023$.

Foi observada perda de massa corporal, durante o período de intervenção, superior nos grupos tratado com o agonista β 3-adrenérgico ($1,24 \pm 0,29$ g) ou exposto ao frio ($1,01 \pm 0,31$ g) em comparação com o grupo controle ($0,18 \pm 0,14$ g, $p = 0,0064$), conforme apresentado nas Figuras 2A e 2B.

A



B

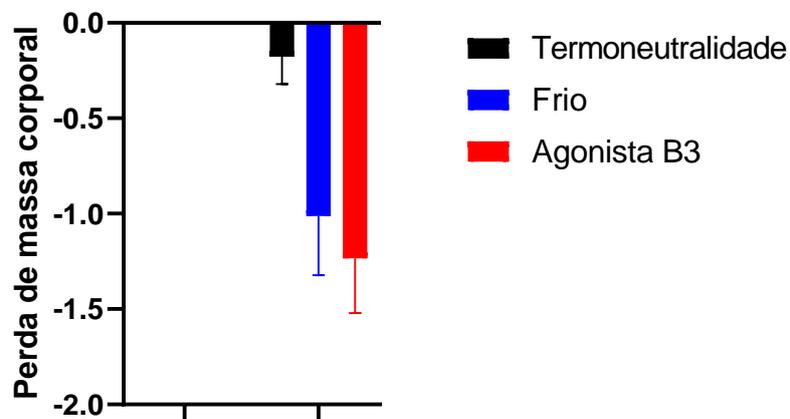


Figura 2. (A) Massa corporal entre a 13ª e 15ª semanas e (B) variação de massa corporal no decorrer da intervenção na 15ª semana. Dados apresentados como média \pm EPM, $n = 4$ a 8 /grupo, e analisados por one-way ANOVA; $p=0,0064$ (grupos frio e agonista B3 versus controle).

Não foi observada diferença significativa da massa de TAB epididimal, branco inguinal ou marrom interescapular dos animais nos diferentes grupos de estudo (Figura 3 e Tabela 2).

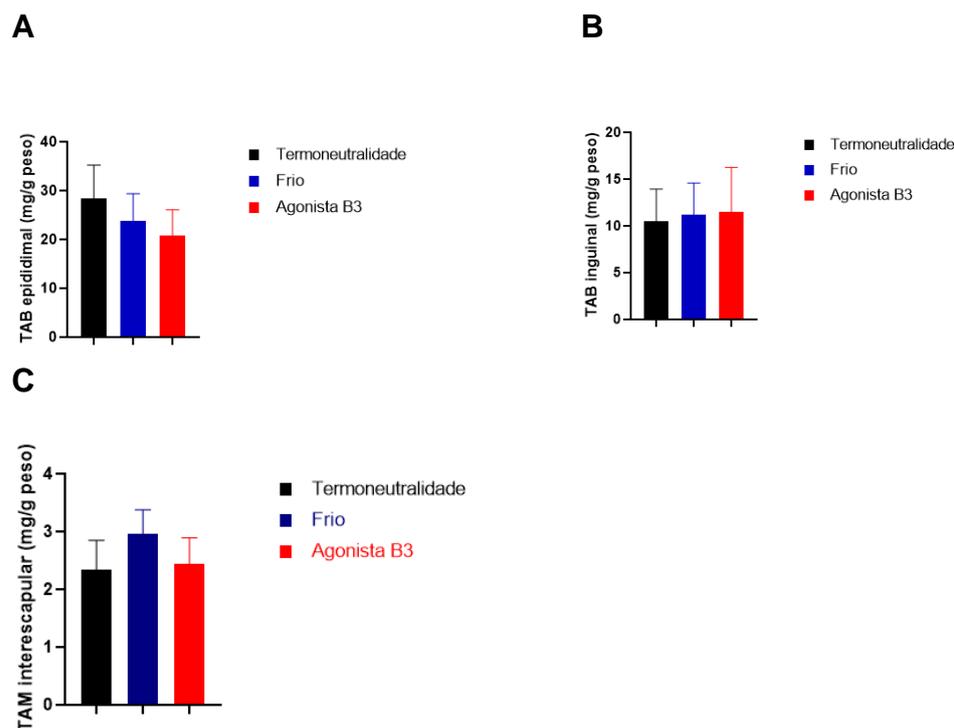


Figura 3: Massa relativa de (A) tecido adiposo branco epididimal, (B) tecido adiposo branco inguinal e (C) tecido adiposo marrom interescapular dos grupos de estudo. Dados apresentados como média \pm EPM (n = 4 a 8/grupo) e analisados por análise de variância One-Way ANOVA.

Tabela 3: Massa absoluta e relativa de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, conforme o grupo de tratamento.

Depósito	Controle (24°C)		Frio		Agonista β 3	
	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)
TAB epididimal	757,20 \pm	28,44 \pm	601,80 \pm	23,88 \pm	573,40 \pm	20,85 \pm
	80,99	2,39	84,22	2,73	64,07	1,84
TAB inguinal	279,40 \pm	10,49 \pm	281,3 \pm	11,22 \pm	319,80 \pm	11,47 \pm
	37,64	1,22	43,06	1,69	56,66	1,70
TAM interescapular	61,13 \pm	2,33 \pm	73,73 \pm	2,96	65,48 \pm	2,44
	4,33	0,18	3,73	\pm 0,21	3,14	\pm 0,16
Fígado	1099,00 \pm	41,64 \pm	1109,00	44,41 \pm	1349,00 \pm	49,80 \pm
	54,93	1,70	\pm 29,27	1,44	21,86	1,06

Dados apresentados como média \pm EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); n = 4 - 8 camundongos por grupo. A: massa absoluta (mg), R: massa relativa (mg/g de peso corporal);

2. Temperatura

A avaliação da temperatura na região abdominal, com termômetro laser digital infravermelho, mostrou que os animais expostos ao frio apresentaram redução de sua temperatura, seguida de recuperação parcial até o último dia de intervenção. Os animais do grupo controle mantiveram sua temperatura corporal e aqueles em tratamento com agonista β 3-adrenérgico tiveram incremento em sua temperatura corporal (Figura 4).

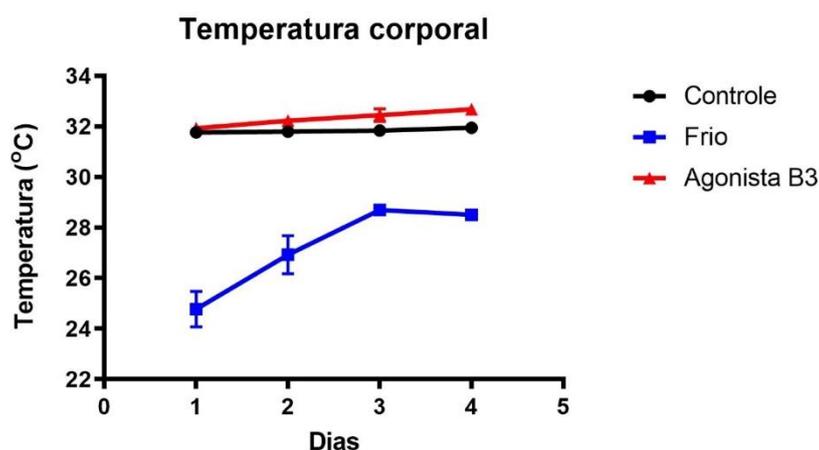


Figura 4: Temperatura dos camundongos durante a intervenção. Temperatura aferida com termômetro laser digital infravermelho, na região abdominal. Dados apresentados como média \pm EPM (n = 4 a 8/grupo).

Em um teste ANOVA de duas vias, foi observada diferença significativa da temperatura dos grupos ($p < 0,0001$). Ao comparar o grupo controle com o grupo tratado com agonista β 3-adrenérgico (ambos mantidos a mesma temperatura), foi observada uma diferença estatística ao longo do tempo desses grupos.

As imagens termográficas sugeriram temperaturas mais elevadas nas regiões retro-orbital e interescapular dos camundongos em todos os grupos. Apesar do caráter não quantitativo dessa análise, observou-se que os camundongos do grupo exposto ao frio apresentaram maior área em vermelho ou branca, correspondentes àquelas de maior temperatura (Figura 5).

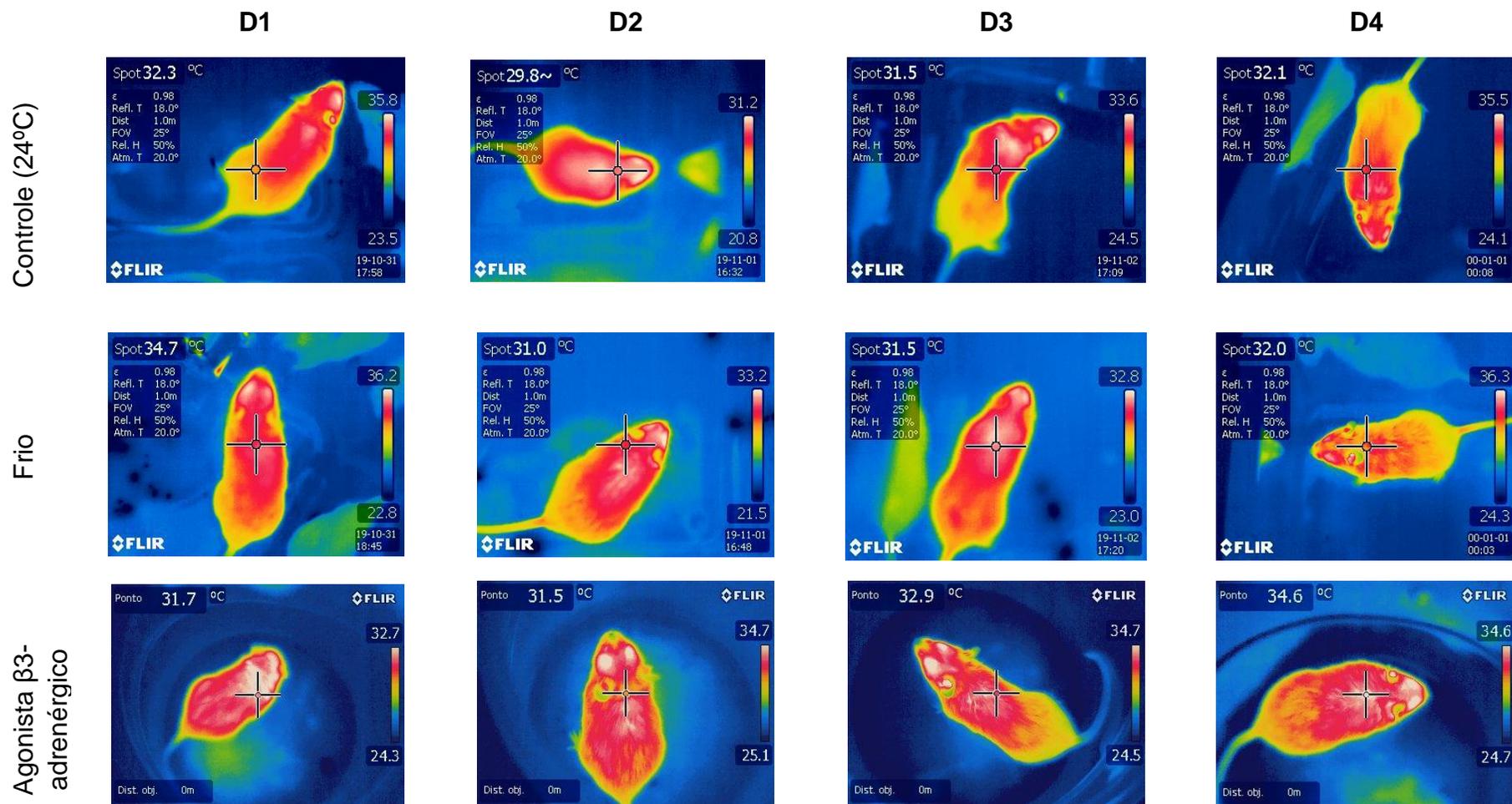


Figura 5: Imagens termográficas dos animais em estudo durante o período de tratamento, separados por grupos.

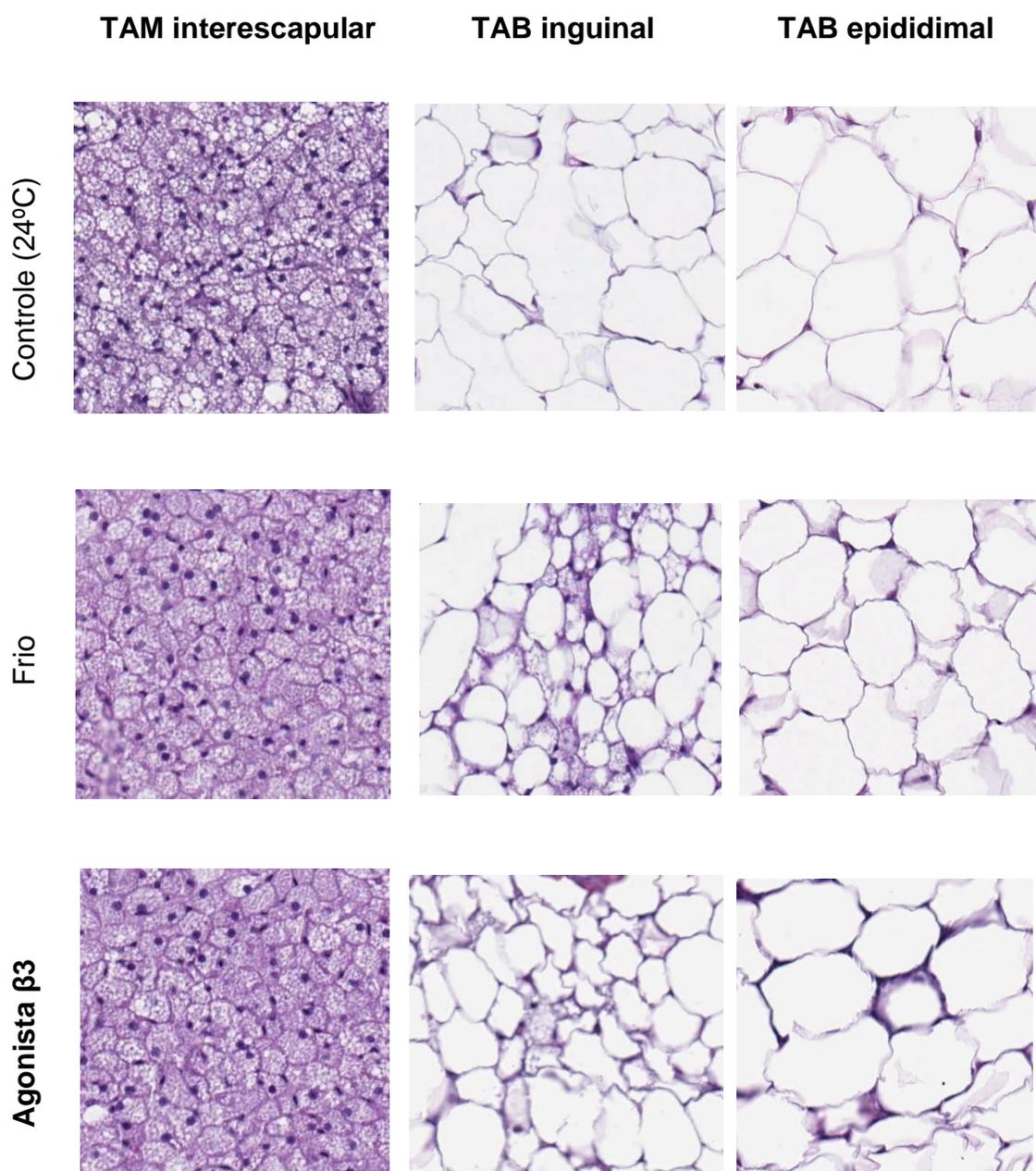


Figura 6. Características histológicas do tecido adiposo marrom (TAM) interescapular e tecido adiposo branco (TAB) inguinal e epididimal. Coloração com Hematoxilina-Eosina com uso de resolução para visualização a 100 μ m.

As imagens do TAM demonstram estruturas distintas dos animais do grupo em termoneutralidade sem tratamento, apenas em uso de dieta hiperlipídica, em relação aos outros dois grupos que possuem estruturas que se assemelham mais estruturalmente, é possível identificar estrutura semelhante entre os adipócitos dos grupos tratados, porém quando comparados aos adipócitos do grupo sem tratamento em termoneutralidade observamos diferenças no tamanho dos adipócitos, os animais sem tratamento apresentam adipócitos levemente maiores. A histologia dos fígados ficou prejudicada devido

a danos nos tecidos e dessa forma não foi possível avaliar esses tecidos de forma adequada. As imagens do TAB inguinal dos animais do grupo em termoneutralidade sem tratamento, apenas em uso de dieta hiperlipídica, apresentam células mais hipertróficas, com volume aumentado e com as estruturas características de células adiposas, apresentando núcleo periférico, as imagens dos grupos tratados apresentam aspecto similar entre si, com adipócitos menores quando comparados aos do grupo sem tratamento e em alguns pontos células adiposas com aspecto multilocular. Por fim as imagens do TAB epidídimal apresentam entre eles características similares entre todos.

Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar, comparativamente, o efeito da sinalização β 3-adrenérgica e da exposição ao frio sobre a massa corporal, a massa de tecido adiposo e as características histológicas do tecido adiposo, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Não foram identificadas diferenças significativas em relação a estes aspectos, sugerindo que, pelo menos em desfechos morfológicos, as duas abordagens são comparáveis.

Ao iniciarmos a avaliação dos animais observamos uma diferença estatística da média de sua massa corporal absoluta. Essa diferença ocorreu devido à disponibilidade de animais para a realização do estudo, que nos fez realizar o estudo de cada grupo em momentos diferentes. Dessa forma, a avaliação da massa corporal absoluta foi complementada pela avaliação da diferença de massa corporal ao longo do tempo. Nessa avaliação, os animais foram comparáveis, sugerindo que houve recuperação da massa corporal dos animais que inicialmente apresentavam menor massa.

Avaliando o ganho de massa corporal dos animais entre a 5ª e a 14ª semana, houve ganho levemente superior do grupo designado para receber tratamento com o agonista β 3-adrenérgico. Contudo ao final da 14ª semana, a massa corporal dos animais passou a não ter diferença estatística. Além disso, o ganho de massa corporal foi compatível com o esperado para a alimentação com a dieta oferecida, hiperlipídica (60% de lipídeos) (LANG; HASSELWANDER; LI; XIA, 2019).

Inicialmente, os animais foram mantidos em grupos de 4 por gaiola. Posteriormente, sua individualização se fez necessária devido ao protocolo para exposição ao frio, uma vez que manter os animais agrupados provocaria nos indivíduos o comportamento de se agruparem para se aquecerem (LIM et al., 2012). Assim, os animais de todos os grupos foram individualizados antes do período das intervenções, para aclimação a essa condição, que pode promover perda peso (PASCHOS; TANG; THEKEN; LI; VERGINADIS; LEKKAS; HERMAN; YAN; LAWSON; FITZGERALD, 2018). Além da individualização de todos os grupos, o grupo exposto ao frio e o grupo controle receberam aplicação do mesmo volume de solução salina referente ao peso com intuito de emular o estresse sofrido pelos animais tratados com agonista β 3-adrenérgico (CHARTOUMPEKIS; HABEOS; ZIROS; PSYROGIANNIS; KYRIAZOPOULOU; PAPAVALASSIOU, 2011). Essa medida visou minimizar os possíveis fatores interferentes nos resultados e permitir a comparabilidade dos grupos.

Tanto o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico quanto a exposição ao frio resultaram em perda de peso comparáveis e superior à observada entre os animais mantidos do grupo controle (mantidos a 24°C). A diminuição discreta de peso neste último, por sua vez, não é esperada na 15ª semana de vida, em resposta à alimentação com dieta hiperlipídica, porém pode ser atribuída ao efeito do isolamento (KAPPEL et. al., 2017) e também da aplicação de solução salina por via intraperitoneal (YOSHIDA et al., 1996).

Lim et al. (2012) investigaram diferentes protocolos de exposição ao frio e sugeriram a necessidade de aclimação dos animais em temperatura de 18°C antes da exposição ao frio, pois a transferência dos animais de 22 °C, temperatura ambiente, para o frio, pode resultar em aumento na taxa de mortalidade dos animais (LIM et al., 2012). Entretanto, em diversos outros estudos há descrição de transferência dos animais de condições termoneutralidade (30°C) ou temperatura ambiente (22°C) diretamente para frio (4 a 6°C), sem mortalidade (PASCHOS et al., 2018). Apesar dos diferentes protocolos aceitos, é possível que, em nossas condições, a transferência direta de 24°C para 5 a 6°C tenha contribuído para a mortalidade observada no grupo exposto ao frio.

O trabalho de JIA et al. (2016) apresenta uma evolução gráfica relativa a perda de massa corporal dos animais expostos ao frio semelhante à obtida neste trabalho, embora a duração da exposição tenha sido superior (7 dias versus 5 dias no presente estudo). A diferença de massa corporal ao final do período de tratamento evidenciou uma importante e característica perda de massa corporal associada aos tratamentos utilizados, como nos trabalhos de JIA et al. (2016), no caso dos animais expostos ao frio, e de GUERRA et. al. (1998), para os tratados com agonista β 3-adrenérgico. Neste último estudo, foi utilizada a mesma dose do fármaco, porém por período mais prolongado, de 24 dias. Ainda assim, o comportamento de perda de massa corporal foi semelhante ao do presente estudo, especialmente ao compararmos o mesmo período entre os tratamentos do nosso trabalho e do citado anteriormente.

Embora os camundongos expostos ao frio tenham apresentado perda de peso comparável à dos que foram tratados com o agonista β 3-adrenérgico, foi observado que estes apresentaram perda progressiva de peso do início ao fim do tratamento, ao passo que aqueles expostos ao frio apresentaram perda inicial mais acentuada, seguida de estabilização. Esse comportamento pode estar relacionado a um remodelamento da microbiota intestinal e do intestino delgado, em resposta ao frio, no sentido de promover maior absorção de nutrientes e, assim, evitar progressão da perda de peso, descrito anteriormente (CHEVALIER; STOJANOVIĆ; COLIN; SUAREZ-ZAMORANO; TARALLO; VEYRAT-DUREBEX; RIGO; FABBIANO; STEVANOVIĆ; HAGEMANN, 2015). Esse processo, para nosso conhecimento, não foi investigado em relação ao tratamento com o agonista β 3-adrenérgico e é possível que represente uma das diferenças em relação às duas abordagens.

Também foi avaliada a massa de diferentes depósitos de tecido adiposo dos camundongos dos diferentes grupos. Os tecidos foram descritos tanto em massa absoluta quanto em massa relativa, no intuito de observar de forma normalizada as amostras, eliminando possíveis vieses relativos a diferenças de massa corporal. Não houve diferença da massa desses depósitos, pelas duas formas supracitadas. Entretanto, seria esperada uma diferença especialmente em relação ao TAM, devido ao intenso consumo lipídico para a termogênese frente aos estímulos apresentados (exposição ao frio (JIA et al., 2016) e ativação β 3-adrenérgica, POEKES et al., 2018), quando comparados ao grupo controle. No caso dos TAB inguinal, também se esperaria redução de sua massa devido ao seu amarronzamento e aumento do consumo lipídico. Cabe destacar, no entanto, que JIA et al. (2016) descreveram, em resposta ao frio, aumento da massa adiposa inguinal a partir do terceiro dia e que se manteve até o 5º dia de exposição ao frio. Essa questão poderia ser reavaliada com a condução de novos grupos para compreender melhor esse desfecho divergente do esperado. É possível, por exemplo, que o tempo de tratamento ou exposição ao frio não tenha sido suficiente para observar redução significativa da massa desses depósitos. É possível, ainda, que o remodelamento intestinal em resposta ao frio, com aumento da absorção de nutrientes, seja responsável por manutenção da massa de tecido adiposo, a despeito do aumento da termogênese.

Quando avaliamos a temperatura corporal determinada pelo termômetro a laser digital infravermelho, pudemos observar que ela foi significativamente inferior no grupo exposto ao frio e semelhante no grupo mantido a 24°C ou tratado com o agonista β 3-adrenérgico. Este último, inclusive, apresentou incremento significativo da temperatura ao final do tratamento. Este achado é semelhante ao de Åkesson et. al. (2007) e Szentirmai e Kapás (2017), que observaram elevação da temperatura corporal após a administração de agonista β 3-adrenérgico. Além disso, o grupo exposto ao frio apresentou recuperação parcial da temperatura, sugerindo que tenha ocorrido o processo de termogênese (ADLANMERINI et al. 2019).

A temperatura avaliada por câmera infravermelha sugeriu que a temperatura dos animais expostos ao frio ao longo do tratamento apresentou temperatura corporal mais uniforme em diferentes regiões do corpo, quando comparados aos do grupo que foi mantido a 24°C. Entretanto, apesar da utilização das imagens para avaliar de forma geral o comportamento desses tecidos, segundo o trabalho de Jackson et. al., 2001, o uso de termografia infravermelha não é um método adequado para avaliar a capacidade da termogênese não dependente de tremores no TAM, por não apresentar correlação com o pico metabólico associado às alterações previstas com relação a estimulação β 3-adrenérgica e frio. Dessa forma, esse dado é limitado para estudar o processo de termogênese no tecido adiposo.

Os cortes histológicos apresentam o TAM com diferença visual entre os grupos tratados comparados ao grupo controle e muito similares quando comparados entre eles. O TAM do grupo controle apresenta adipócitos levemente maiores quando comparados aos TAM dos animais dos grupos tratados. O remodelamento estrutural do tecido sugere sua atividade termogênica, sendo esse achado esperado em resposta aos estímulos empregados.

Ao observarmos os cortes histológicos do TAB inguinal, conseguimos observar nos grupos tratados características que sugerem o amarronzamento do tecido, incluindo a presença de adipócitos multiloculares entre os adipócitos brancos (uniloculares), em comparação ao grupo controle. Também sob esse mesmo ponto de vista, houve redução no tamanho dos adipócitos dos grupos tratados quando comparado com o grupo controle. Os grupos tratados, além disso, foram comparáveis.

O TAB epididimal não apresentou características diferentes entre os grupos, embora pudesse ser esperado redução de seu conteúdo lipídico e, assim, redução do tamanho do adipócito, em resposta aos estímulos termogênicos, ainda que de maneira menos pronunciada que no TAB inguinal. É possível, entretanto, que o tempo de intervenção tenha sido insuficiente para promover modificações morfológicas no TAB epididimal. Além disso, o tecido seria mais bem caracterizado pela investigação de marcadores moleculares, que não foi realizada.

Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que o efeito da exposição ao frio e da sinalização β 3-adrenérgica por estímulo farmacológico promovem alterações comparáveis da massa corporal, massa adiposa e das características histológicas do tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Entretanto, ensaios adicionais, para caracterização molecular destes tecidos, devem ser realizados para melhor avaliar se a exposição ao frio e a sinalização β 3-adrenérgica são estratégias equivalentes de promover ativação do tecido adiposo termogênico. Não está claro, também, se esses estímulos seriam comparáveis em cenários de alimentação com outros tipos de dieta.

CONFLITO DE INTERESSES: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília parecer número 27/2019 (Anexo 1).

REFERÊNCIAS

ADLANMERINI, Marine; CARPENTER, Bryce J.; REMSBERG, Jarrett R.; AUBERT, Yann; PEED, Lindsey C.; RICHTER, Hannah J.; LAZAR, Mitchell A.. Circadian lipid synthesis in brown fat maintains murine body temperature during chronic cold. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 116, n. 37, p. 18691-18699, 26 ago. 2019. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1909883116>.

ÅKESSON, Lina; HAWKINS, Tyson; JENSEN, Richard; FULLER, Jessica M.; BRESLOW, Norman E.; LERNMARK, Åke. Decreased Core Temperature and Increased β 3-Adrenergic Sensitivity in Diabetes-Prone BB Rats. **Diabetes Technology & Therapeutics**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 354-362, ago. 2007. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dia.2006.0036>.

CHARTOUMPEKIS, Dionysius V; HABEOS, Ioannis G; ZIROS, Panos G; PSYROGIANNIS, Agathoklis I; KYRIAZOPOULOU, Venetsana e; PAPAVALASSILIOU, Athanasios G. Brown Adipose Tissue Responds to Cold and Adrenergic Stimulation by Induction of FGF21. **Molecular Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 7-8, p. 736-740, 25 fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2011.00075>.

CROWLEY VE. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann ClinBiochem*. 2008;45(Pt 3):245–55. Epub 2008/05/17. doi: 10.1258/acb.2007.007193. pmid:18482911

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v.19, n.10, p.1252-1263, 2013.

HENRY, Belinda A.; ANDREWS, Zane B.; RAO, Alexandra; CLARKE, Iain J.. Central Leptin Activates Mitochondrial Function and Increases Heat Production in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, [s.l.], v. 152, n. 7, p. 2609-2618, 10 maio 2011. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-0143>.

HIMMS-HAGEN, J.; CUI, J.; DANFORTH, E.; TAATJES, D. J.; LANG, S. S.; WATERS, B. L.; CLAUS, T. H.. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 266, n. 4, p. R1371-R1382, 1 abr. 1994. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.4.r1371>.

JACKSON, D.M; HAMBLY, C; TRAYHURN, P; SPEAKMAN, J.R. Can non-shivering thermogenesis in brown adipose tissue following NA injection be quantified by changes in overlying surface temperatures using infrared thermography? **Journal Of Thermal Biology**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 85-93, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4565\(00\)00023-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4565(00)00023-1).

JIA, R.; LUO, X.-Q.; WANG, G.; LIN, C.-X.; QIAO, H.; WANG, N.; YAO, T.; BARCLAY, J. L.; WHITEHEAD, J. P.; LUO, X.. Characterization of cold-induced remodelling reveals depot-specific differences across and within brown and white adipose tissues in mice. **Acta Physiologica**, [S.L.], v. 217, n. 4, p. 311-324, 24 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12688>.

LANG, Philipp; HASSELWANDER, Solveig; LI, Huige; XIA, Ning. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-14, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55987-x>.

LIM, Sharon; HONEK, Jennifer; XUE, Yuan; SEKI, Takahiro; CAO, Ziquan; ANDERSSON, Patrik; YANG, Xiaojuan; HOSAKA, Kayoko; CAO, Yihai. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 606-615, mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.013>.

KAPPEL, Sarah; HAWKINS, Penny; MENDEL, Michael. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. **Animals**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 88, 24 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani7120088>.

PASCHOS, Georgios K.; TANG, Soon Yew; THEKEN, Katherine N.; LI, Xuanwen; VERGINADIS, Ioannis; LEKKAS, Damien; HERMAN, Lindsay; YAN, Weili; LAWSON, John; FITZGERALD, Garret A.. Cold-Induced Browning of Inguinal White Adipose Tissue Is Independent of Adipose Tissue Cyclooxygenase-2. **Cell Reports**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 809-814, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.082>.

ROSEN, Evan d.; SPIEGELMAN, Bruce m. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, [s.l.], v. 156, n. 1-2, p.20-44, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>.

SON'KIN, V. D.; KIRDIN, A. A.; ANDREEV, R. S.; AKIMOV, E. B.. Homeostatic non-shivering thermogenesis in humans facts and hypotheses. **Human Physiology**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 599-614, set. 2010. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0362119710050129>.

SZENTIRMAI, Éva; KAPÁS, Levente. The role of the brown adipose tissue in β 3-adrenergic receptor activation-induced sleep, metabolic and feeding responses. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-14, 19 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01047-1>.

YOSHIDA, Toshihida; UMEKAWA, Tsunekazu; SAKANE, Naoki; YOSHIMOTO, Kanji; KONDO, Motoharu. Effect of CL316,243, a highly specific β 3-adrenoceptor agonist, on sympathetic nervous system activity in mice. **Metabolism**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 787-791, jun. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0026-0495\(96\)90147-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0026-0495(96)90147-x).

ANEXOS

ANEXO 1


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 15 de abril de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "METABOLISMO DO COLESTEROL E TERMOGÊNESE: ESTUDO DA TERMOGÊNESE NO TECIDO ADIPOSEO EM ANIMAIS COM NOCAUTE DO RECEPTOR DE LDL", Protocolo n.º 27/2019, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (48 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 30/04/2019 a 30/04/2021.




Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO 2

AMIDO DE MILHO	15,95000%
CASEINA	20,00000%
AMIDO DEXTRINIZADO	10,00000%
SACAROSE	10,00000%
OLEO DE SOJA	4,00000%
CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%
MIX MINERAL AIN 93 G	3,50000%
MIX VIT AIN 93	1,00000%
L CISTINA	0,3000%
BITARTARATO DE COLINA	0,2500%
BHT	0,0010%
BANHA	30,0000%
	100,00100%