UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Karine Emanuelle da Silva

Mecanismos moleculares envolvidos na redução da funcionalidade mitocondrial e autofagia
do tecido adiposo marrom de ratos alimentados com dieta hiperproteica

Ribeirão Preto
2020

KARINE EMANUELLE DA SILVA

Mecanismos moleculares envolvidos na redução da funcionalidade mitocondrial e autofagia do tecido adiposo marrom de ratos alimentados com dieta hiperproteica

Dissertação apresentada ao programa de
Bioquímica da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto-USP para a obtenção do título
de mestre em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof^a Dr^a. Isis do Carmo
Kettelhut

Ribeirão Preto

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Emanuelle, Karine Silva

Mecanismos moleculares envolvidos na redução da funcionalidade mitocondrial e autofagia do tecido adiposo marrom de ratos alimentados com dieta hiperproteica. Ribeirão Preto, 2019.

95f. 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Kettelhut, Isis do Carmo.

1. Tecido adiposo marrom **2.** Dieta hiperproteica **3.** Autofagia **4.** Mitocôndrias

FOLHA DE APROVAÇÃO

EMANUELLE, K. S. Mecanismos moleculares envolvidos na redução da funcionalidade mitocondrial e autofagia do tecido adiposo marrom de ratos alimentados com dieta hiperproteica.

.

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus amados pais Elma Gomes da Silva e José Antônio da Silva por serem meus grandes incentivadores em cada passo dessa caminhada.

Agradeço, de maneira especial, às agências CAPES e CNPq pelo apoio e incentivo financeiro no desenvolvimento desse trabalho.

Resumo

EMANUELLE, K. S. **Mecanismos moleculares envolvidos na redução da funcionalidade mitocondrial e autofagia do tecido adiposo marrom de ratos alimentados com dieta hiperproteica**. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Animais submetidos à dieta hiperproteica (HP) totalmente livre de carboidratos representam um bom modelo experimental para o estudo dos ajustes metabólicos frente a diferentes situações fisiológicas, pois apresentam características como manutenção da glicemia e menor queda do glicogênio hepático durante a restrição alimentar e alta atividade neoglicogenética hepática, mesmo em condições pós-prandiais. Além disso, os animais HP apresentam altos níveis circulantes dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), que parecem ser importantes para essas adaptações metabólicas. O tecido adiposo marrom (TAM) desses animais apresenta menor massa, redução na produção de calor e do *turnover* de NOR e menor atividade simpática em relação aos animais que consomem dieta balanceada. Sendo o TAM rico em mitocôndrias, a função e a reciclagem dessas organelas são fundamentais para a atividade do tecido. Por isso, os objetivos deste trabalho foram elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no controle da atividade termogênica, no conteúdo e na funcionalidade mitocondrial, além da degradação autofágica-lisossomal no TAM de ratos Wistar Hannover submetidos à dieta HP. Foram determinados parâmetros metabólicos e hormonais para confirmar a adaptação desses animais a este tipo de dieta. Foram avaliadas as vias de sinalização adrenérgica, o conteúdo proteico e a expressão gênica de marcadores da dinâmica mitocondrial, termogênese, autofagia, mitofagia e as vias de sinalização da insulina, além dos fatores de transcrição FoxO e seus genes alvo. Além disso, foram conduzidos ensaios para a determinação da densidade e da funcionalidade mitocondrial do TAM dos animais HP. Os resultados do presente estudo mostraram que todos os parâmetros metabólicos e hormonais obtidos foram semelhantes aos previamente encontrados nos ratos Wistar (Ribeirão Preto) adaptados à dieta HP. O TAM desses animais apresentou redução das proteínas envolvidas na sinalização adrenérgica, como a EPAC e os substratos fosforilados por PKA, além de redução do RNAm do receptor β_3 adrenérgico. Houve redução do conteúdo da UCP1 e da AMPK e da expressão gênica do PGC1 α , Dio2 e UCP1. Houve aumento do conteúdo proteico de VDAC, Tom20 e da atividade da citrato sintase, porém acompanhado de

redução do consumo de oxigênio em todos os estados avaliados. Por conseguinte, a adaptação à dieta HP promoveu redução dos principais marcadores autofágicos, LC3II e p62, o que foi confirmado pela redução do fluxo autofágico. Houve acúmulo do conteúdo das proteínas envolvidas com mitofagia, Parkin, PINK1, BNIP3 e redução do fluxo autofágico mitocondrial. A dieta hiperproteica também promoveu no TAM a redução do conteúdo proteico do IRS-1, porém aumento da fosforilação de Akt nos resíduos **Ser⁴⁷³** e **Thr³⁰⁸**, aumento da fosforilação da ERK1 e ERK2 nos resíduos **Thr²⁰²** e **Tyr²⁰⁴**, respectivamente, e aumento do conteúdo proteico da p38. Além disso, houve aumento da fosforilação de FoxO1 no resíduo **Ser²⁵⁶** e de FoxO3a no resíduo **Ser²⁵³** e redução da transcrição de seu gene alvo Gabarap. Em conjunto nossos resultados demonstram que o TAM de animais submetidos à dieta HP apresenta acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, acompanhado por reduzida capacidade fosforilativa e termogênica e ainda sugerem que o aumento do conteúdo mitocondrial não depende do incremento de síntese, mas sim da redução da atividade autofágica-lisossomal e da degradação dessas organelas neste tecido.

Palavras-chave: Tecido adiposo marrom; Dieta hiperproteica; Autofagia; Mitocôndrias; Mitofagia.

Abstract

EMANUELLE, K. S. **Molecular mechanisms involved in the reduction of mitochondrial functionality and autophagy of brown adipose tissue in rats fed a high-protein diet.** 2020. 85f. Dissertation (Master's degree). Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Animals submitted to a high-protein, carbohydrate-free diet (HP) are a good experimental model for studying the metabolic adjustments in different physiological situations, as they present interesting characteristics such as maintenance of blood glucose levels and lower drop of hepatic glycogen content during food restriction and high hepatic gluconeogenic activity, even in postprandial conditions. In addition, HP animals have high circulating levels of branched-chain amino acids (BCAA), which appear to be important for many adaptive characteristics they present. The brown adipose tissue (BAT) of these animals has less mass, reduced heat production and reduced NOR turnover. Since BAT is extremely rich in mitochondria, the function and recycling of these organelles are essential for the performance of the tissue. Therefore, the aims of this work were to elucidate the molecular mechanisms involved in the control of thermogenic activity, content and mitochondrial functionality, in addition to autophagic-lysosomal degradation in the BAT of animals fed 30 days with the HP diet. Metabolic and hormonal parameters were measured in order to confirm the animals' adaptation to this diet. Adrenergic signaling pathways, protein content and gene expression of markers of mitochondrial dynamics, thermogenesis, autophagy, mitophagy and insulin signaling pathways were evaluated, in addition to FoxO transcription factors and their target genes. In addition, experiments were conducted to determine the density and mitochondrial functionality of BAT in HP animals. In this work, all metabolic and hormonal parameters using Wistar Hannover rats fed HP diet were shown to be in line with previous adaptation data of Wistar (Ribeirão Preto) rats. The BAT of these animals show a reduction in proteins involved in adrenergic signaling such as EPAC and PKA phosphorylated substrates, in addition to a reduction in the $\beta 3$ adrenergic receptor mRNA. There was a reduction in the content of UCP1 and AMPK and in the gene expression of PGC1 α , Dio2 and UCP1. There was an increase in the protein content of VDAC, Tom20 and in the citrate synthase activity, however there was a reduction in oxygen consumption in all evaluated states. Therefore, adaptation to the HP diet led to a reduction in the main autophagic markers, LC3II and p62, which was confirmed by the reduction in autophagic flow. There was an accumulation of the

content of proteins involved with mitophagy, Parkin, PINK1, BNIP3 and reduced mitochondrial autophagic flow. The high-protein diet also promoted a reduction in the protein content of IRS-1 in BAT, increased phosphorylation of Akt in *Ser*⁴⁷³ and *Thr*³⁰⁸ residues, increased phosphorylation of ERK1 and ERK2 in *Thr*²⁰² and *Tyr*²⁰⁴ residues, respectively, and increased protein content of p38. In addition, there was an increase in FoxO1 and FoxO3a phosphorylation in the *Ser*²⁵⁶ and *Ser*²⁵³ residues, respectively, and reduced the transcription rate of its target gene Gabarap.

Taken together our results demonstrated that there is an accumulation of dysfunctional mitochondria in the BAT of animals fed a HP diet with reduced thermogenic and phosphorylative capacity, suggesting that this increase in the mitochondrial content is independent of synthesis, but probably depends on the reduction of the autophagic- lysosomal activity and decrease in the mitochondria degradation .

Keywords: Brown adipose tissue; high-protein diet; autophagy; mitochondria; mitophagy.

Lista de abreviaturas e siglas

AGL – Ácido graxo livre
AMP – Monofosfato de adenosina
AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
ATG13 – *Autophagy-related protein 13*
ATP – Adenosina trifosfato
BCAA – Aminoácidos de cadeia ramificada
BNIP3 - *BCL2 Interacting protein 3*
CCCP - Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc.
DIO - Deiodinase
DRP1 - GTPase relacionada à dinamina
EPAC – Proteína trocadora diretamente ativada pelo AMPc.
ERK - Quinase regulada por sinal extracelular
ETS – Cadeia transportadora de elétrons
FBXO7 - F-Box only protein 7
FIS1 – Fisina 1
FOXO – Forkhead box O
GABARAP - Proteína associada ao receptor de ácido gama-aminobutírico
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATE 16 – ATPase associada ao Golgi de 16 kDa
GDP – Difosfato de guanosina
GLUT4 - Transportador de glicose do tipo 4
IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IR – Receptor de insulina
IRS – Substrato do receptor de insulina
LC3 – Microtubule-associated protein light chain 3
LKB1 – Liver kinase 1
MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MFN - Mitofusina
mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos
NOR - Noradrenalina

NRF - Fator respiratório nuclear 1
OPA1 – Proteína atrófica ótica 1
OXPHOS – Fosforilação oxidativa
PAF – Pré-autofagossoma
PDK - Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol
PGC1 α - Coativador-1 do receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo
PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase
PINK1 - PTEN-induces putative kinase
PKA – Proteína quinase A
RPL39 – Proteína ribossomal L39
SNS – Sistema nervoso simpático
SQSM1 - Sequestroma-1
T3 - Triiodotironina
T4 - Tiroxina
TAB – Tecido adiposo branco
TAG - Triacilglicerol
TAM – Tecido adiposo marrom
UCP1 – Proteína desacopladora 1
ULK1 - Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
VDAC – Canal aniônico dependente de voltagem
VPS34 – Vacuolar protein sorting 34

Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	2
I.1 CONTROLE DO METABOLISMO PROTEICO NO TECIDO ADIPOSEO MARROM: AUTOFAGIA E MITOFAGIA	5
I.2 DIETA HIPERPROTEICA TOTALMENTE LIVRE DE CARBOIDRATOS	9
II. OBJETIVO GERAL	12
II.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
III. MATERIAIS E MÉTODOS	14
III.1 ANIMAIS E SEU TRATAMENTO	14
III.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	17
III.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	19
1. <i>Histologia</i>	19
2. <i>Conteúdo de Noradrenalina</i>	19
3. <i>Ácidos graxos livres, glicerol, insulina e glicemia</i>	20
4. <i>Fracionamento e dosagem das proteínas mitocondriais</i>	20
5. <i>Ensaio da atividade da citrato sintase</i>	20
6. <i>Ensaio de consumo de oxigênio</i>	21
7. <i>Análise in vivo do fluxo autofágico</i>	21
8. <i>Western blot</i>	21
9. <i>PCR quantitativa em tempo real</i>	24
III.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
IV. RESULTADOS	28
IV.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	28
IV.2 EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NO CONTEÚDO DE NORADRENALINA E NA VIA DO AMPC/PKA/CREB NO TAM	34
IV.3 EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA SOBRE O CONTEÚDO E A FUNÇÃO MITOCONDRIAL	36
1. <i>Conteúdo mitocondrial</i>	36
2. <i>Termogênese</i>	39
3. <i>Dinâmica mitocondrial</i>	41
4. <i>Fração mitocondrial</i>	43
5. <i>Função mitocondrial</i>	45
IV.4 EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NA ATIVIDADE DO PROCESSO AUTOFÁGICO-LISOSSOMAL DO TAM	47
1. <i>Marcadores autofágicos</i>	47
2. <i>Mitofagia</i>	49
3. <i>Fluxo autofágico</i>	50
4. <i>Fluxo autofágico na fração mitocondrial</i>	52
5. <i>Sinalização PI3K/Akt/FoxO</i>	53
6. <i>Sinalização das MAPK</i>	55
7. <i>Receptor de insulina (IR) e Substrato do receptor (IRS-1)</i>	56
IV. DISCUSSÃO.....	58
V. CONCLUSÕES.....	66
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

|| INTRODUÇÃO

I. Introdução

Uma das principais leis da termodinâmica é a que diz respeito a uma tendência natural para a desordem. Contudo, células são sistemas que parecem contrariar tal tendência devido ao seu alto grau de organização e de regulação, buscando sempre evitar o gasto inútil de energia, especialmente na forma de calor. As primeiras evidências a respeito de células que eram especializadas na produção de calor, como as células adiposas marrons, despertaram grande interesse de toda a comunidade científica, principalmente após a descoberta de sua presença em quantidade apreciável e de sua importância funcional no homem adulto, no qual ele está presente e ativo, principalmente nas regiões cervical supraclavicular e, em menor quantidade ao longo da coluna espinal, nas regiões periaórtica e perirenal (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007). Além disso, ele preserva as mesmas características morfológicas e fisiológicas descritas em pequenos roedores (CYPESS et al., 2009). Nestes animais, os depósitos de gordura marrom estão principalmente localizados nas regiões cervicais, axilar, periaórtica, e interescapular, sendo esta última a região mais estudada especialmente pela facilidade de acesso e manipulação.

O tecido adiposo marrom (TAM) é formado por células adiposas multiloculares caracterizadas pela presença de várias gotículas lipídicas de diferentes tamanhos contendo triacilglicerol e um grande número de mitocôndrias (Figura 1) (CANNON; NEDERGAARD, 2004). A produção de calor nesse tecido acontece devido à intensa atividade das mitocôndrias, as quais expressam a proteína desacopladora 1 (UCP-1) também denominada termogenina. A UCP-1 é específica do TAM e confere a ele a sua propriedade termogênica, sendo que essa propriedade é diretamente proporcional ao conteúdo de mitocôndrias ou ao conteúdo desta proteína no tecido (MATTHIAS et al., 2000). Classicamente, o mecanismo de geração de ATP por mitocôndrias acontece por ocasião da formação de um gradiente de prótons, denominada força próton-motriz, entre o espaço intermembranas. Assume-se que esses prótons retornam para o espaço interno mitocondrial por meio da ATP-sintase e tal força próton-motriz promove alterações conformacionais nessa enzima, promovendo a formação de ATP. A termogenina, por sua vez, age promovendo o desacoplamento entre a cadeia respiratória e a síntese de ATP permitindo que parte do gradiente de prótons seja desfeito e consequentemente calor seja produzido (JÉQUIER ERIC; TAPPY LUC, 2019). Ao longo desse processo, os ácidos graxos provenientes do próprio estoque de triacilglicerol do TAM, do tecido adiposo branco (TAB) ou da dieta (HIMMS-HAGEN, 1989) constituem os principais substratos energéticos para o ciclo de Krebs e para o funcionamento da cadeia de

transporte de elétrons nessas células adiposas marrons. Essa função do TAM o faz ser conhecido como o principal sítio de termogênese facultativa induzida pela dieta (*diet-induced thermogenesis*) e de termogênese adaptativa independente de tremores (*non-shivering thermogenesis*) (HIMMS-HAGEN, 1990).

Figura 1: Adipócitos brancos e marrons. Adaptado (Goto et al., 2016).

O principal estímulo para a hidrólise do triacilglicerol e para a produção de calor é o sistema nervoso simpático (SNS), que a partir da liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas, conduz à estimulação especialmente dos receptores adrenérgicos do subtipo β_3 , os quais estão acoplados à proteína Gs. Esta, por sua vez, ativa a enzima adenilil ciclase, culminando com a elevação dos níveis intracelulares do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), cujo principal alvo *downstream* é a proteína quinase A (PKA). Quando ativa, ela é capaz de promover a lipólise por meio da fosforilação de proteínas como a lipase hormônio sensível e a perilipina, promovendo a hidrólise dos TAG armazenados nas gotículas de gordura dos adipócitos e a liberação dos ácidos graxos. Esses ácidos graxos serão conduzidos à mitocôndria e utilizados como substratos para a termogênese e como ativadores da UCP-1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Concomitante a esses processos, a estimulação da via β_3 adrenérgica/AMPc ativa diversos fatores de transcrição que regulam um programa gênico envolvido com a regulação da termogênese e da biogênese mitocondrial. Diversos trabalhos tem mostrado que a estimulação simpática promove hipertrofia do TAM em distintas situações fisiológicas: exposição crônica ao frio (MORENO et al., 1994), dieta rica em sacarose (GRANNEMAN; CAMPBELL, 1984), dieta com alta concentração de carboidratos

(DE FRANÇA et al., 2016) e administração farmacológica de noradrenalina e agonistas β adrenérgicos (HIMMS-HAGEN et al., 2000). Foi mostrado também que o estímulo mediado pela noradrenalina é capaz de aumentar a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos marrons em adipócitos marrons especializados (HIMMS-HAGEN et al., 2000), além de levar também à síntese de proteínas envolvidas na termogênese e no crescimento tecidual como, por exemplo, a UCP-1, lipase lipoproteica, iodotironina 5'-deiodinase (DIO) e os transportadores de glicose, com concomitante aumento da captação de glicose e de ácidos graxos livres e da capacidade termogênica (HIMMS-HAGEN, 1989).

CREB (*cAMP response element binding protein*) é um fator transcricional sabidamente regulado por PKA e quando fosforilado no resíduo *ser*¹³³ por essa quinase, é capaz de induzir a transcrição gênica da UCP-1 e também do coativador-1 do receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) (BARTNESS; VAUGHAN; SONG, 2010). PGC-1 α é um co-ativador transcricional de vários receptores nucleares e é responsável por gerenciar a transcrição de genes envolvidos com a termogênese e com a biogênese mitocondrial, como aqueles que codificam enzimas da oxidação de ácidos graxos, ATP-sintase e a UCP-1 (CROWLEY; YEO; O'RAHILLY, 2002).

Além de CREB, uma importante enzima reguladora da atividade do TAM é a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) a qual é ubiquamente expressa e é regulada, principalmente, pela razão intracelular AMP/ATP (HARDIE, 2018). No TAM, ela está mais expressa do que em qualquer outro tecido e tem sua atividade estimulada, principalmente, pela NOR (MULLIGAN et al., 2007). A AMPK, quando ativada pela LKB1 (*liver kinase B1*) por meio da fosforilação do resíduo *thr*¹⁷², modula o metabolismo através da fosforilação de proteínas chaves e fatores de transcrição como o PGC1 α , regulando a biogênese mitocondrial e a termogênese (JÄGER et al., 2007).

Em contraposição à hipertrofia, o processo atrófico no TAM se desenvolve quando o estímulo simpático sobre o tecido está reduzido ou ausente. Nessas situações, observa-se redução do número de adipócitos, redução da massa do tecido e da capacidade termogênica. Modelos que comprovam tal afirmativa aparecem na literatura como, por exemplo, a desnervação simpática do tecido (DESAUTELS; DULOS; MOZAFFARI, 1986), o jejum e a termoneutralidade (HIMMS-HAGEN, 1989). Nesse contexto, protocolos experimentais de obesidade (HANSEN; KRISTIANSEN, 2006)(NAGATA et al., 2006) também demonstram que a atividade termogênica do TAM dos animais está comprometida, enquanto que a sua maior ativação funcional está relacionada com resistência à obesidade (KOZAK; HARPER,

2000). Conclui-se, portanto, que o estímulo noradrenérgico é fundamental para a regulação da função TAM, especialmente, a sua capacidade termogênica.

1.1 Controle do metabolismo proteico no tecido adiposo marrom: autofagia e mitofagia

O aumento da síntese de proteínas seguido pela redução ou manutenção da degradação conduz ao quadro de hipertrofia de um tecido. Em contrapartida, a redução ou manutenção da síntese acompanhada pelo incremento da degradação leva à atrofia (BECHET et al., 2005). Nas células de mamíferos, a degradação proteica é feita por diferentes sistemas, sendo a primeira via proteolítica intracelular descrita a autofágica-lisossomal. Esta se caracteriza pela degradação de constituintes celulares no interior do lisossomo, o qual apresenta lúmen ácido (pH 4-5) e alta concentração de hidrolases ácidas, as catepsinas B, D, H, L, que determinam a sua capacidade proteolítica (BECHET et al., 2005).

Para que os substratos proteicos possam ser degradados, faz-se necessária a sua entrega ao lisossomo. A chegada dos substratos autofágicos ao lisossomo dá-se por meio de três vias: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia (RAVIKUMAR et al., 2010). No que concerne ao tecido adiposo marrom e músculo esquelético, os substratos alcançam o interior dos lisossomos principalmente por meio da macroautofagia, que neste trabalho será tratada somente como autofagia. O processo autofágico é composto por três fases distintas: iniciação, alongamento e maturação e assim como mostrado na figura 2, seu início se dá pela formação no citosol de uma membrana de camada dupla que engloba o substrato proteico, denominada de pré-autofagossoma (PAF), a qual dará origem ao autofagossomo. Este, por sua vez, se funde ao lisossomo formando o autolisossomo.

Figura 2: Progressão da via autofágica-lisossomal. Adaptado (RAVIKUMAR et al., 2010)

Nos últimos anos diversos genes têm sido relacionados à autofagia, sendo denominados de atg. O início da formação do autofagossomo requer a ativação de Ulk1 (*Unc51-like kinase 1*) que está complexada a outras duas proteínas: Atg13 (*Autophagy-related protein 13*) e FIP200 (*kinase family interactin protein of 200 kD*). O complexo multiproteico Beclin1 e a enzima Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), uma PI3K_{III} (fosfatidilinositol 3-quinase de classe III), juntamente com o conjugado Atg5-12 também são importantes para iniciar o processo de isolamento da membrana dupla e formar o PAF, visto que esse processo encontra-se suprimido em células deficientes de Atg-5. A Atg8, que primeiramente foi identificada em leveduras, apresenta três proteínas homólogas em mamíferos: LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), Gabarap (*γ-aminobutyric acid reporter-associated protein*) e GATE 16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*). A LC3, a Gabarap e a p62 são de grande relevância para a formação da dupla membrana do autofagossomo, sendo a LC3 apresentada sob duas formas: LC3-I e LC3-II. A primeira é formada pela clivagem da região carboxi-terminal da LC3 pela Atg4B. A transformação de LC3-I em LC3-II é catalisada pelas Atg3 e Atg7 e permite a ligação da LC3-II a um fosfolípido de membrana (fosfatidiletanolamina), o que facilita a translocação da LC3 do citosol para a membrana. Essas duas isoformas da LC3 são consideradas de extrema relevância, pois, em diversos estudos, o aumento da relação LC3-II/LC3-I é largamente utilizada como um marcador autofágico. (RAVIKUMAR et al., 2010).

Diversas cascatas de sinalização regulam o desenvolvimento da autofagia sendo que as mais bem descritas são as das MAPKs e PI3K/ Akt. A via de sinalização clássica da insulina tem início com a ligação desse hormônio ao seu receptor de membrana, denominado IR (receptor de insulina), o qual possui atividade tirosina quinase. O IR ativo fosforila os substratos do receptor de insulina (IRS's), cujas tirosinas fosforiladas são reconhecidas por proteínas que possuem domínios SH₂, destacando-se a subunidade p85 da PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase). No próximo passo, a PI3K fosforila o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, convertendo-o em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, o qual pode ancorar as proteínas PDK (proteína quinase dependente de fosfatidilinositol) e Akt. Em seguida, a PDK1 fosforila a Akt no resíduo *thr*³⁰⁸ e o complexo 2 da mTOR a fosforila no resíduo *Ser*⁴⁷³, sendo que ambas as modificações são importantes para a estabilização e máxima atividade da Akt (BAYASCAS; ALESSI, 2005). Uma vez ativa, a Akt pode modificar a atividade de diversas outras proteínas a partir da sua atividade serina-treonina quinase após se desligar da membrana e se translocar para o citoplasma ou núcleo (INOKI et al., 2002).

Um dos alvos *downstream* da Akt são os fatores de transcrição FoxO (*forkhead box*), os quais exercem um papel importante na regulação do metabolismo proteico. Na sua forma ativa, defosforilados, estão predominantemente no núcleo e são capazes de induzir a transcrição de genes envolvidos no processo autofágico-lisossomal como, por exemplo, LC3b, p62 e Gabarap (ZHAO et al., 2007). A fosforilação de FoxO pela Akt o libera da sua ligação ao DNA, translocando-o do núcleo para o citosol, propiciando assim que esse fator seja sequestrado pela proteína 14-3-3, o que promove a sua inativação (BIRKENKAMP; COFFER, 2003). Além de FoxO, a Akt tem como alvo indireto *downstream* o complexo 1 da mTOR (mTORC1), um sensor de nutrientes e, especialmente, de aminoácidos que estimula a síntese proteica e inibe a degradação autofágica a partir da fosforilação inibitória do resíduo *ser*⁷⁵⁷ da proteína ULK (RAVIKUMAR et al., 2010), a qual é fundamental para a iniciação desse processo.

As MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) constituem uma família de serina/treonina quinases, que, quando ativas, fosforilam inúmeros substratos nucleares e citosólicos e, assim, regulam processos celulares vitais como crescimento, embriogênese e apoptose. ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e p38 são importantes representantes desse grupo e tem sua atividade controlada por fatores de crescimento, citocinas, aminoácidos entre outros. Em miotubos C2C12, ERK1 e ERK2 são também capazes de fosforilar Foxo em resíduos de *ser*^{294;344;425}, o que permite maior interação de Foxo com enzimas responsáveis

por sua degradação, reduzindo portanto a sua atividade transcricional (YANG et al., 2008). No músculo esquelético tem sido reportado também um *cross-talk* entre a cascata das MAPK e de Akt. Haddad e Adams (2004) demonstraram que a co-infusão local (14 dias) de IGF-1 e de PD-098059, um inibidor de ERK, aboliu o efeito hipertrófico induzido por IGF-1 (HADDAD; ADAMS, 2004). Além disso, em miotubos que não apresentavam atividade de ERK1 e ERK2 houve significativa redução da fosforilação de Akt e aumento da expressão de genes proteolíticos (SHI et al., 2009). Assim, essas quinases são também muito importantes no controle dos processos intracelulares de síntese e degradação de proteínas.

Durante anos, a autofagia foi considerada uma via degradativa não seletiva, contudo, recentemente, diversas formas seletivas de autofagia têm sido descritas. (RAVIKUMAR et al., 2010). O processo envolvido na degradação de mitocôndrias é denominado **mitofagia** e tem grande relevância na manutenção de uma rede saudável dessas organelas (KIM; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ; LEMASTERS, 2007). Alguns processos são capazes de estimular a mitofagia como, por exemplo, a falta de nutrientes, espécies reativas de oxigênio (EROS) entre outros. Esses estímulos podem induzir a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), a qual conduzirá à formação do poro de transição de permeabilidade (PTP). O PTP é um canal de membrana mitocondrial não seletivo e que leva a perda do potencial de membrana (RAVIKUMAR et al., 2010).

A mitofagia se desenvolve, principalmente, pela ação de duas importantes proteínas, a serina-treonina quinase PINK1 (*PTEN-induces putative kinase*) e a E3 ligase Parkin. A partir da despolarização mitocondrial, PINK1 é estabilizada na membrana externa mitocondrial e, com o auxílio da Fbxo7 (*F-Box only protein 7*), fosforila Parkin, permitindo a sua translocação para a mitocôndria (BURCHELL et al., 2013). Parkin, por sua vez, promove a ubiquitinação de diversas proteínas mitocondriais como VDAC (*voltage-dependent anion channel*) e as Mitofusinas 1 e 2 (Mfn1/ Mfn2). A ubiquitinação da VDAC é um sinal importante para o recrutamento de p62 (*Sequestosome-1*), BNIP3 (*BCL2 Interacting Protein 3*) e LC3, o que culminará com o engolfamento da mitocôndria pelo autofagossoma (ASHRAFI; SCHWARZ, 2013).

A ubiquitinação das mitofusinas é também um importante passo para o desenvolvimento da mitofagia, visto que mitocôndrias são organelas dinâmicas que constantemente sofrem fusão e fissão (MACVICAR, 2013). Os processos de fusão são dirigidos pelas Mfn1, Mfn2 (mitofusinas 1 e 2) e OPA1 (*optic atrophy 1*). As mitofusinas são GTPases grandes localizadas na membrana mitocondrial externa, enquanto OPA1 é uma GTPase relacionada à dinamina que é vital para a fusão da membrana interna. O aumento da

fusão conduz à formação de longas redes de mitocôndrias que dificultam o englobamento da organela pelo autofagossoma. Sendo assim, Parkin ubiquitina as mitofusinas em resíduos que propiciam a degradação dessas proteínas via sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (DING; YIN, 2012). De maneira semelhante, a fissão requer a ação de uma GTPase relacionada à dinamina (Drp1). A Drp1 é uma proteína citosólica, que é recrutada para a superfície da mitocôndria, onde interage com a fisina 1 (Fis1). A fissão, por sua vez, aumenta a fragmentação mitocondrial e, dessa forma, facilita a reciclagem das mitocôndrias pelo autofagossoma (DING; YIN, 2012).

1.2 Dieta hiperproteica totalmente livre de carboidratos

Nosso laboratório tem uma longa história no estudo do controle hormonal, nutricional e neural da homeostase energética. Um dos principais modelos utilizado ao longo desses últimos 50 anos são os animais adaptados a uma dieta hiperproteica, totalmente livre de carboidratos (dieta HP), não sendo, entretanto, muito comuns relatos na literatura utilizando dieta semelhante a esta usada em nosso trabalho.

Os estudos de nosso laboratório demonstraram que animais HP apresentam características metabólicas interessantes como redução da massa e da concentração de lipídios totais no TAM, mesmo sem alteração no consumo alimentar e da massa corporal (KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1985) (BRITO et al., 1999). A utilização de glicose pelo TAM ocorre principalmente pelo transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4), o qual é altamente expresso nesse tecido (SHIMIZU et al., 1993), sendo também regulado pela insulina e pelo SNS (SHIMIZU; NIKAMI; SAITO, 1991). Animais alimentados com a dieta HP, cuja redução da insulina plasmática é evidente, apresentam também diminuição na captação de glicose e no conteúdo de GLUT4 (KAWASHITA et al., 2002). Além disso, foi também verificada uma significativa redução da atividade lipogênica no fígado e no tecido adiposo branco (epididimal, retroperitoneal, subcutâneo e intramuscular), assim como no TAM, e ainda assim esses animais HP eram capazes de manter consideráveis reservas de gordura na carcaça, havendo uma redução de somente 10% em relação aos ratos adaptados à dieta controle (dieta N) após 30 dias neste regime alimentar. Outros estudos demonstraram que a manutenção da gordura corporal, era devida, pelo menos em parte, a uma acentuada redução da capacidade termogênica do TAM de ratos HP (BRITO; BRITO; MIGLIORINI, 1992) (BRITO et al., 1999). Tal afirmativa foi evidenciada pela redução da massa do tecido, da atividade da citocromo oxidase e da ligação mitocondrial de GDP, que quantifica a

termogenina exposta na superfície externa da membrana mitocondrial interna. A menor capacidade termogênica do TAM de ratos HP produzirem calor foi ainda corroborada pelo menor aumento da temperatura do tecido provocada pela infusão de noradrenalina (BRITO; BRITO; MIGLIORINI, 1992). De maneira oposta aos regimes alimentares hipercalóricos, a presença de proteínas na dieta parece inibir a atividade do TAM de maneira dependente da concentração desse macronutriente. De fato, trabalho de Brito e colaboradores (1998) mostrou redução no conteúdo de noradrenalina e no *turnover* de catecolaminas no TAM de ratos alimentados com dieta hiperproteica e livre de carboidratos (BRITO et al., 1998). Estudos clássicos demonstraram que ratos alimentados com dieta hipercalórica apresentavam menor ativação do TAM quanto maior a proporção de proteína ingerida (ROTHWELL; STOCK, 1982). Da mesma maneira, animais tratados com dieta isocalórica, mas com porcentagem variável de proteína (5 a 15%), apresentavam redução da massa do TAM e da ligação de GDP, que era tanto mais acentuada quanto maior o teor proteico da dieta (SWICK; GRIBSKOV, 1983).

Como já mencionado, a dieta hiperproteica promove importantes modificações no metabolismo de carboidratos e de lipídios no TAM de roedores, entretanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos desta dieta na regulação da função mitocondrial nesse tecido. Sendo a quantidade de lipídios na carcaça relativamente mantida devido à redução da atividade termogênica do TAM e à redução da atividade da citocromo oxidase, a nossa primeira **hipótese** é que a dieta hiperproteica reduz não somente a termogênese, mas também a capacidade respiratória e fosforilativa das mitocôndrias desse tecido, tornando-o menos ativo do que em animais que recebem dieta controle.

Como a dieta hiperproteica é rica em aminoácidos e estes têm emergido como importantes inibidores da degradação autofágica-lisossomal (ZHENG et al., 2016) (ZHANG et al., 2016), a nossa segunda **hipótese** é que a autofagia está reduzida no TAM de animais que são alimentados por essa dieta, assim como a degradação das mitocôndrias desse tecido, o que contribui diretamente para a perda da funcionalidade dessas organelas.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram investigar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da atividade termogênica, no conteúdo e funcionalidade mitocondrial, além da atividade autofágica-lisossomal no TAM de ratos adaptados à dieta hiperproteica.

|| OBJETIVOS

II. Objetivo geral

Elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no controle da atividade termogênica, no conteúdo e na funcionalidade mitocondrial, além da degradação autofágica-lisossomal no TAM de ratos alimentados por 30 dias com dieta hiperproteica (HP) totalmente livre de carboidratos.

II.1 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da administração da dieta HP nos parâmetros metabólicos (glicemia, glicogênio hepático, ácidos graxos livres, glicerol) e hormonais (insulina, glucagon e noradrenalina);
2. Avaliar os efeitos da dieta HP no TAM de animais alimentados por 30 dias com essa dieta quanto:
 - i. As vias de sinalização adrenérgica;
 - ii. Ao conteúdo, dinâmica e função mitocondrial;
 - iii. As proteínas e genes envolvidos com o controle da termogênese: UCP1; PGC1 α ; AMPK;
 - iv. A expressão gênica e conteúdo proteico dos marcadores autofágicos e mitofágicos, além do fluxo autofágico: LC3; p62; ULK; ATG7; BECLIN; PINK1; Parkin; BNIP3; FbxO7;
 - v. A modulação das vias de sinalização da insulina (Akt/FoxO1) e (MAPK's) e os genes alvos de FoxO1 (LC3b, p62, Gabarap).

MATERIAIS E MÉTODOS

III. Materiais e Métodos

III.1 Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* machos com peso inicial variando entre 40 e 50 gramas, provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Fisiologia da FMRP/USP, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $\pm 55\%$ e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais de acordo com o regime alimentar.

As informações nutricionais das dietas estão apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3 (KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1980). Ambas as dietas apresentam valor calórico total de aproximadamente 4 Kcal/g. Os efeitos do jejum foram avaliados em animais já adaptados às dietas, os quais foram deixados sem alimento durante 24 horas antes do experimento, recebendo apenas água durante este período.

Todos os experimentos foram realizados pela manhã, entre as 7 e 9 horas e o sacrifício dos animais foi realizado após anestesia com isoflurano por deslocamento cervical ou decapitação (quando necessária a coleta de sangue).

Tabela 1: Composição das dietas (em gramas)

Composição	N	HP
Caseína*	20	86
Sacarose	33	-
Amido	33	-
Óleo vegetal	8	8
Mistura Salina	5	5
Mistura de Vitaminas	1	1
Total	100	100

*Caseína com 92% de proteína; 8% de umidade

Tabela 2: Composição da mistura salina (em gramas)

Composição	Dietas N e HP
KH_2PO_4	389,0
CaCO_3	381,4
NaCl	139,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	57,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,0
KI	0,79
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,55
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,48
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
Total	1000,0

Tabela 3: Composição da mistura de vitaminas

Composição	Dietas N e HP
Vitamina A	200 U.I
Vitamina E	1 U.I
Vitamina D	20 U.I
Colina	20,0 g
Ácido p. aminobenzóico	1,0 g
Inositol	1,0 g
Niacina	0,4 g
Pantotenato de cálcio	0,4 g
Riboflavina	0,08 g
Piridoxina	0,05 g
Menadione	0,05 g
Ácido fólico	0,02 g
Biotina	0,004 g
Dextrose q.s.p.	100,0 g
Vitamina B12	0,0003 g
Tiamina	0,05 g

III.2 Grupos experimentais

1. Caracterização do modelo

20 ratos *Wistar Hannover* foram divididos aleatoriamente em dois grupos de acordo com a dieta ofertada:

1. Grupo N: 10 animais submetidos à dieta sintética balanceada controle (dieta N) composta de 16% de proteína, 66% de carboidratos e 8% de lipídios.

2. Grupo HP: 10 animais submetidos à dieta sintética rica em proteínas (dieta HP) composta de 70% de proteínas, 8% de lipídios e livre de carboidratos.

Os animais foram mantidos por 30 dias nos regimes alimentares mencionados acima e no 31º dia foram subdivididos em mais dois grupos:

1. Grupo N: 5 animais alimentados com a dieta N

1.1. Grupo NJ: 5 animais submetidos à dieta N e jejuados por 24 horas.

2. Grupo HP: 5 animais alimentados com a dieta HP.

2.1. Grupo HPJ: 5 animais submetidos à dieta HP e jejuados por 24 horas.

O sacrifício dos animais de cada grupo foi conduzido de forma alternada. O sangue foi coletado em frascos com e sem heparina e o plasma e o soro foram armazenados a -20°C. As amostras obtidas foram utilizadas para dosagens da glicemia, insulina, glucagon, ácidos graxos livres e glicerol utilizando kits comerciais. O fígado foi retirado, mantido em gelo e uma porção de 500mg foi colocada em KOH 30% para a determinação do conteúdo de glicogênio hepático, segundo método de SJÖRGEN *et al*, (1938). O tecido adiposo marrom interescapular foi rapidamente retirado, dissecado e limpo em gelo e um fragmento foi preparado para a produção de lâminas histológicas; o restante do tecido foi congelado em nitrogênio líquido para dosagem do conteúdo de noradrenalina e para análises moleculares.

2. Ensaio de fluxo autofágico

20 ratos *Wistar Hannover* foram novamente divididos aleatoriamente nos dois grupos descritos acima (Grupos 1 e 2). Após 28 dias na dieta, foram novamente subdivididos em dois outros grupos:

1. Grupo NS: 5 animais submetidos à dieta N e que receberam salina 48h, 24h e 1h antes do sacrifício.

1.1. Grupo NC: 5 animais submetidos à dieta N e que receberam colchicina (0,4mg/kg i.p.) 48h, 24h e 1h antes do sacrifício.

2. Grupo HPS: 5 animais submetidos à dieta HP e que receberam salina 48h, 24h e 1h antes do sacrifício.

2.1. Grupo HPC: 5 animais submetidos à dieta HP e que receberam colchicina (0,4mg/kg i.p.) 48h, 24h e 1h antes do sacrifício.

Todos os animais estavam alimentados até 2 horas antes do início do sacrifício. Após a eutanásia, o TAM foi coletado, limpo em gelo e congelado para análise molecular do fluxo autofágico.

3. Fracionamento mitocondrial e citosólico

20 ratos foram submetidos exatamente ao mesmo protocolo descrito acima. Após o sacrifício, o TAM ainda fresco, após ser limpo em gelo, foi feito o fracionamento das proteínas do citosol e das mitocôndrias desse tecido. As frações obtidas foram utilizadas para a dosagem de proteínas mitocondriais e de constitutivos citosólicos. Os protocolos dessas medidas estão descritos a seguir.

4. Ensaio de função mitocondrial e atividade da citrato sintase

8 ratos foram aleatoriamente divididos nos grupos 1 e 2. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e o TAM foi removido, limpo em gelo e um fragmento do tecido foi submetido ao protocolo de avaliação da capacidade respiratória e de atividade da citrato sintase (descritos a seguir).

III.3 Metodologia experimental

1. Histologia

Após a retirada e limpeza do TAM, o tecido foi cuidadosamente cortado em pequenos fragmentos e disposto sobre cassetes histológicos, os quais foram imersos em paraformaldeído 4% por 48 horas e, em seguida, álcool 70% por 24 horas. Posteriormente, o tecido foi desidratado em banhos de álcool com concentrações crescentes por aproximadamente 45 minutos em cada concentração. Após essa fase, os cassetes foram submetidos à diafanização em Xilol I, II e III e subsequente inclusão em parafina para formação dos blocos que foram cortados em micrótomo com espessura de 3 μ m.

As lâminas foram desparafinizadas em Xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina, corante que marca ácidos nucleicos com coloração azul-púrpura, e eosina, que apresenta coloração rosa e é responsável por corar proteínas não específicas no citoplasma e na matriz extracelular (FISCHER et al., 2008).

2. Conteúdo de Noradrenalina

Fragmentos de TAM foram homogeneizados em 5 mL de tampão contendo ácido perclórico 0,2N com EDTA 1mM e metabissulfito de sódio. O homogenado foi centrifugado a 5000g por 20 minutos a 4°C. 4 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de polietileno e foram adicionadas 50mg de alumina ativada, 1mL de tampão Tris 2 M pH 8,9, contendo 0,5% de metabissulfito de sódio e 2,5% de EDTA e 20uL do padrão interno bromidrato de 3,4-diidroxibenzilamina diluído 8 vezes. Os tubos foram agitados por 20 minutos em banho a temperatura ambiente e centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba à vácuo e a alumina foi lavada duas vezes com 3mL de solução lavadora contendo EDTA 20mM, Tris 2M e metabissulfito de sódio 20%. Após cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 5000rpm por 5 minutos e as catecolaminas foram eluídas da alumina por agitação com 800uL de ácido perclórico 0,1N durante 10 minutos. A noradrenalina foi dosada com a ajuda de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) *Proeminence SHIMADZU* com detector eletroquímico *Decade Lite*.

3. Ácidos graxos livres, glicerol, insulina e glicemia

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGLs) foram determinadas por meio do kit NEFA – Randox, o qual é um ensaio colorimétrico que utiliza como padrão o ácido palmítico e quantifica a concentração de AGLs não esterificados. O ensaio de dosagem do glicerol plasmático foi realizado por meio do kit enzimático comercial da Bioclin Quibasa. A determinação de insulina sérica foi feita com a utilização do kit comercial *Rat/Mouse insulin ELIZA EZRMI-13K* (Millipore-EUA). A glicemia dos animais foi medida semanalmente ao longo de todo o período experimental por meio do glicosímetro da *Accu-Chek*.

4. Fracionamento e dosagem das proteínas mitocondriais

O TAM foi homogeneizado em 10 ml de tampão contendo 300 mM de sacarose, 2 mM de EDTA e 10 mM de Tris-HCl (Tampão H) em pH 7,2 e centrifugado a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o pellet descartado. Nova centrifugação foi feita, dessa vez a 3000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado representa a fase citosólica. O pellet, no qual contém as mitocôndrias, foi gentilmente ressuspensionado em 200 µl de tampão H. Ambas as frações foram misturadas ao tampão de lise (RIPA) na proporção 2:1 e a concentração de proteína mitocondrial e citosólica foi determinada usando albumina bovina como padrão (LOWRY, 1951).

5. Ensaio da atividade da citrato sintase

Para a medida da atividade da citrato sintase (WILLIAMS et al., 1986), aproximadamente 5 mg do tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão RIPA [0,75 M NaCl, 0,5% SDS, 0,25 M Tris, 5% Triton X-100, 100 mM EDTA suplementado com 100 mM de ortovanadato, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de PMSF, 1% de leupeptina. As proteínas foram quantificadas usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). 2-4 mg de proteínas foram incubadas com meio de reação [50 mM Tris-HCl, 100 µM 2-ácido dinitrobenzoico (DTNB), 0,25% Triton X-100, pH 8,0 suplementado com 50 µM acetil-CoA] a 37°C por 5 minutos, a reação foi iniciada com a adição de oxaloacetato (250 µM). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas das respectivas amostras.

6. Ensaio de consumo de oxigênio

A taxa de respiração mitocondrial foi medida utilizando-se o tecido fresco e após tratamento com BSA e saponina, o consumo de oxigênio foi monitorado em um *Oxígraph-2k respirometer* (Oroboros, Innsbruck, Austria) contendo 2,1 mL de ar saturado MiR05. Os estados de respiração foram determinados pela adição de substratos e moduladores (succinato, ADP, oligomicina e CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona)). Após a realização do ensaio, o meio de reação foi completamente removido da câmara do oxígrafo e submetido à quantificação proteica (BRADFORD, 1976) e normalização do fluxo respiratório.

7. Análise *in vivo* do fluxo autofágico

Para a determinação do fluxo autofágico, os grupos experimentais foram tratados com colchicina (Sigma-Aldrich) na dose de 0,4 mg/Kg/dia ou salina, conforme já explicado no delineamento experimental. A colchicina é uma droga capaz de bloquear a fusão do autofagossomo ao lisossomo e, conseqüentemente, aumentar os níveis proteicos da LC3II (JU et al., 2010), visto que essa isoforma da LC3 está presente nas membranas externas e internas do autofagossomo e é degradada quando ocorre essa fusão. O acúmulo da LC3II, quantificada por *western blot*, reflete o fluxo autofágico, o qual é avaliado a partir da comparação entre os animais que receberam ou não a colchicina, conforme determinado nas diretrizes para a investigação da autofagia (KLIONSKY et al., 2016). Primeiramente, a colchicina foi pesada, dissolvida em água e armazenada em -20°C na concentração de 4mg/mL. Imediatamente antes do tratamento via intraperitoneal, a droga foi diluída em salina autoclavada para a concentração de 0,5mg/mL. Os animais receberam três doses: 48 horas, 24 horas e 1 hora antes da eutanásia, sendo que os controles receberam apenas injeção (i.p) de salina nos mesmos períodos.

8. Western blot

Pequenos fragmentos do tecido adiposo marrom subescapular dos ratos foram homogeneizados no aparelho TissueLyzerII (30Hz por 2 minutos) em 6 volumes de tampão Tris-HCL (50mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de doxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1mM PMSF, 5ug/mL de aprotinina e 1 ug/mL de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10mM de ortovanadato de

sódio, 10mM de pirofosfato de sódio e 100mM de fluoreto de sódio). O homogenado foi centrifugado a 14000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry *et al.* (1951) (LOWRY, 1951) e posteriormente para determinação do conteúdo proteico por Western blot. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada ao tampão da amostra de acordo com o método Laemmli (1970) (LAEMMLI, 1970). As amostras foram aquecidas em temperaturas entre 50-70°C e aplicadas em géis de acrilamida:bisacrilamida e as corridas eletroforéticas foram realizadas em sistemas de corrida (Protean III Cell BioRad) contendo tampão de corrida [Tris-HCL (25mM e pH 8,4), glicina (115mM), SDS (0,1%)]. Após a corrida, as proteínas foram transferidas (BioRad TransBlot SD Cell, EUA) para membranas de nitrocelulose utilizando-se tampão de transferência contendo Tris (48mM), glicina (39mM), SDS (10%) e metanol (0,2M), pH 7,4 durante 30 minutos sob amperagem de 400mA e voltagem fixa máxima de 25 volts, à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução TBS-T/leite 10% por 1 hora sob agitação, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com os anticorpos primários descritos na tabela 4. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à peroxidase (tabela 4). Após a lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo não ligado, a membrana foi revelada em sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+ System (BioRad Laboratories Inc., EUA) com a adição de reagente de quimioluminescência [Tris/HCl (1M, pH 8,5), luminol (250mM), ácido cumárico (90mM) e H₂O₂ (0,01%)]. As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o *software* ImageJ (Fiji is Just) versão 1.52d (*National Institutes of Health*, EUA). Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (*i.e.* 100%).

Tabela 4: Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados no *Imunoblotting*

Anticorpo (Ac)	Fornecedor	Diluição do Ac Primário	Diluição do Ac secundário
<i>ser</i> ²⁵³ <i>FoxO3a</i>	Santa Cruz	1:500	1:1000
<i>ser</i> ²⁵⁶ <i>FoxO1</i>	Santa Cruz	1:500	1:1000
<i>ser</i> ⁴⁷³ <i>Akt</i>	Cell signalling	1:500	1:1000
<i>ser</i> ⁷⁵⁷ <i>ULK</i>	Cell signalling	1:500	1:500
<i>thr</i> ¹⁷² <i>AMPK</i>	Cell signalling	1:500	1:1000
<i>thr</i> ¹⁸⁰ <i>p38</i>	Cell signalling	1:1000	1:1000
<i>thr</i> ²⁰² <i>ERK1</i> <i>/tyr</i> ²⁰⁴ <i>ERK2</i>	Cell signalling	1:1000	1:1000
<i>thr</i> ³⁰⁸ <i>Akt</i>	Cell signalling	1:500	1:1000
<i>tyr</i> ¹¹⁸⁵ <i>IR</i>	Santa Cruz	1:500	1:3000
<i>tyr</i> ⁸⁹⁵ <i>IRS1</i>	Santa Cruz	1:500	1:3000
Akt Total	Cell signalling	1:1000	1:2000
AMPK Total	Cell signalling	1:1000	1:2000
Atg7	Cell signalling	1:500	1:1000
Beclin	Cell signalling	1:1000	1:1000
BNIP-3	Cell signalling	1:1000	1:1000
Citrato Sintase	Cell signalling	1:750	1:3000
EPAC	Cell signalling	1:1000	1:1000
ERK1/ERK2	Cell signalling	1:1000	1:1000
Fbxo7	Cell signalling	1:500	1:1000
FoxO1	Santa Cruz	1:1000	1:2000
FoxO3a	Santa Cruz	1:1000	1:2000
GAPDH	Cell signalling	1:1000	1:10 000
GLUT4	Cell signalling	1:1000	1:2000
IR	Santa Cruz	1:1000	1:3000
IRS1	Cell signalling	1:1000	1:1000
LC3b	Cell signalling	1:500	1:2000
Mitofusina 1	Cell signalling	1:500	1:1000
Mitofusina 2	Cell signalling	1:1000	1:1000

<i>Oxphos</i>	Santa Cruz	1:1000	1:10 000
p38	Cell signalling	1:1000	1:1000
p62	PROGEN	1:750	1:4000
Parkin	Cell signalling	1:500	1:2000
PGC1 α	Santa Cruz	1:500	1:2000
PI3K p110	Cell signalling	1:1000	1:1000
PINK1	Cell signalling	1:500	1:1000
Substratos PKA	Cell signalling	1:1000	1:1000
Tom20	Cell signalling	1:1000	1:2000
UCP1	Santa Cruz	1:750	1:5000
ULK	Cell signalling	1:500	1:1000
VDAC	Cell signalling	1:1000	1:3000
α tubulina	Santa Cruz	1:1000	1:1000
β actina	Santa Cruz	1:1000	1:5000

9. PCR quantitativa em tempo real

O RNA das amostras foi extraído pelo método do Trizol™ (Invitrogen, EUA) e quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (260nm). Após tratamento de 1 μ g de RNA total com DNase, foi adicionado o *primer* de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (20 pmoles; Invitrogen, EUA) em volume total de 13 μ l, sendo as misturas preparadas em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% e, posteriormente, autoclavada). Após o aquecimento a 65°C por 5 minutos e subsequente resfriamento a 4°C, a transcriptase reversa (*Super Script IV*) e os demais reagentes foram adicionados (tampão de reação 5x SST IV, DTT, RNase Out Inhibit) seguindo-se para o ciclo de 23°C – 10 minutos, 55°C – 10 minutos, 80°C – 10 minutos e infinito a 4°C. Os cDNAs foram posteriormente submetidos à PCR em tempo real utilizando-se Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen) com sequências de primers específicos descritos na tabela 5. Os resultados foram adquiridos em sistema de detecção Perkin-Elmer ABI Prism 7500 com os seguintes parâmetros 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pelo ciclo de dissociação: 95°C (15 segundos), 60°C (1 minutos) e 95°C (15 segundos) para verificação do produto através da análise pela curva de melting. Para análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene de interesse foi calculado em referência à expressão de RPL39 (ribossomal

protein 39), que representa o controle interno endógeno (*housekeeper gene*), utilizando-se o método $2^{-2\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 5: Primers utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	Sequência dos Primers
DIO2	F: AGC TTT CTC CTA GAC GCC TAC A R: AGG GTG AGC CTC ATC AAT GTA T
DRP1	F: AGAATATTCAAGACAGCGTCCCAAAG R: CGC TGT GCC ATG TCC TCG GAT TC
FIS1	F: GCA CGC AGT TTG AAT ACG CC R: CTG CTC CTC TTT GCT ACC TTT GG
GABARAP	F: CCC AGT TGT GGC AGT AGA CA R: GAC TGA TCC TGA GGC TCC TG
LC3b	F: TTT GTA AGG GCG GTT CTG AC R: CAG GTA GCA GGA AGC AGA GG
MFN1	F: CCT TGT ACA TCG ATT CCT GGG TTC R: CCT GGG CTG CAT TAT CTG GTG
MFN2	F: GAT GTC ACC ACG GAG CTG GA R: AGA GAC GCT CAC TCA CTT TG
PGC1 α	F: AAG GTC CCC AGG CAG TAG AT R: GGC TGT AGG GTG ACC TTG AA
RPL39	F: TCC TGG CAA AGA AAC AAA AGC R: TAG ACC CAG CTT CGT TCT CCT
SQSM1 (p62)	F: AGA ATG TGG GGG AGA GCG TGG C R: GGG TGT CAG GCG GCT TCT CTT
UCP1	F: CCG GTG GAT GTG GTA AAA AC R: ATC CGA GTC GCA GAA AAG AA
ULK1	F: AAG TTC GAG TTC TCT CGC AAG R: CGA TGT TTT CGT GCT TTA GTT CC
β 3-ADR	F: GCT ATG CCA ACT CTG CCT TC R: AAA TGG ACG CTC ACC TTC AT

III.4 Análise Estatística

Todas as amostras foram avaliadas quanto a sua normalidade por meio do teste *Shapiro-Wilk*. Os dados que apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$) foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e os testes estatísticos utilizados foram o teste T de *Student* ou o *Two-way Anova*, ambos considerando $p < 0,05$ como nível de significância. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram expressos como percentil/mediana e o teste utilizado foi o *Wilcoxon Mann-Whitney*, também tomando $p < 0,05$ como nível de significância. Para todas as análises estatísticas, foi utilizado o *software SigmaStat 3.5* e para a construção dos gráficos o *software GraphPad Prism 6*.

|| **RESULTADOS**

IV. Resultados

IV.1 Caracterização do modelo experimental

Antes de serem estudados os mecanismos responsáveis pelas alterações da função mitocondrial e autofagia do TAM em ratos submetidos à dieta HP, foram investigados vários parâmetros metabólicos e as adaptações fisio-metabólicas promovidas por este tratamento dietético, assim como os ajustes metabólicos durante o jejum de 24 horas, após 30 dias de adaptação à dieta. A fim de caracterizar o modelo experimental, foram avaliadas a massa corporal e as concentrações plasmáticas de glucagon, insulina, glicerol, ácidos graxos livres, glicose, além do conteúdo de glicogênio hepático.

Observa-se que na primeira semana experimental, a massa corporal dos animais HP mostrou-se reduzida em comparação aos ratos N (Figura 3). Tal diferença pode ser devida à adaptação desses animais à nova dieta, o que os fez comer menos nos primeiros dias. Após essa fase de adaptação, os animais HP voltaram a crescer normalmente e, com aproximadamente 12 dias, já não foi observada diferença significativa entre os grupos, o que permaneceu até o final do período experimental, além disso, semelhante ingestão alimentar foi observada entre os dois grupos a partir do sétimo dia de dieta.

Figura 3: Curva da massa corporal (g) dos animais alimentados por 30 dias com dieta controle (N) ou hiperproteica (HP). Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM; $n=5$ animais por grupo; * $p < 0,05$, HP vs. N em um mesmo dia.

A concentração plasmática do glucagon é sabidamente maior no plasma de animais alimentados com dieta hiperproteica. De fato, no nosso trabalho, os animais HP apresentaram aumento dos níveis circulantes desse hormônio no estado alimentado em comparação ao grupo N, não sofrendo nenhuma alteração significativa durante o jejum de 24 horas. Já no grupo N, o esperado aumento dos níveis de glucagon foi observado após a restrição alimentar (Tabela 6). Em relação à insulina, os animais tratados com a dieta hiperproteica apresentaram significativa redução ($0,49 \pm 0,1$ vs. $2,72 \pm 0,6$ ng/mL) nos níveis desse hormônio (Figura 22a).

Durante o estado alimentado, os animais adaptados à dieta HP não apresentaram alteração dos níveis circulantes de glicerol, mas apresentaram redução dos de ácidos graxos livres. Além disso, apresentaram significativa queda glicêmica a partir da segunda semana (Figura 4), o que se manteve até o fim do tempo experimental. Durante o jejum de 24 horas (tabela 6), os animais HP mostraram outra importante particularidade, a prevista queda glicêmica durante esse período foi em menor magnitude do que aquela verificada nos animais controle (50% vs. 70%, respectivamente). Em adição, não houve diferença no glicerol e o aumento dos ácidos graxos livres foi em menor proporção quando comparado aos controles.

Um dos principais contribuintes para a manutenção glicêmica, especialmente em períodos de oferta restrita de alimentos, é o glicogênio hepático. Não houve diferença

significativa no conteúdo de glicogênio hepático entre os dois grupos alimentados (Tabela 6). Contudo, como esperado, ambos os grupos apresentaram significativa redução do glicogênio hepático após jejum de 24 h comparados aos seus controles alimentados, sendo a queda menos acentuada nos animais HP em comparação aos ratos N também jejuados (70% vs. 90% respectivamente).

Tabela 6: Efeito da dieta HP e do jejum nos parâmetros metabólicos e hormonais de ratos

	Dieta N		Dieta HP	
	Alimentado	Jejum 24h	Alimentado	Jejum 24h
Glucagon (pg/mL)	33,81 ± 5,73	127,81 ± 5,59 [#]	76,38 ± 20,22 [*]	62,21 ± 19,40
Glicerol (mM)	3,10 ± 0,87	7,27 ± 1,33 [#]	3,94 ± 0,76	1,97 ± 0,15 ^Δ
AGL (mM)	0,580 ± 0,130	1,120 ± 0,043 [#]	0,250 ± 0,022 [*]	0,780 ± 0,088 ^{τΔ}
Glicemia (mg/dL)	144 ± 5	45 ± 1 [#]	123 ± 3 [*]	62 ± 1 ^{τΔ}
Glicogênio hepático (%)	3,80 ± 0,50	0,40 ± 0,05 [#]	3,20 ± 0,40	1,00 ± 0,10 ^{τΔ}

AGL: Ácidos Graxos Livres

Dados foram expressos como média ± EPM; n= 5 animais por grupo. * p< 0,05, HP vs. N (alimentado); Δ HP vs. N (jejum); # N Jejum vs. N Alimentado; τ HP jejum vs. HP alimentado;

Figura 4: Glicemia dos animais alimentados por 30 dias com dieta controle (N) ou hiperproteica (HP). Os dados foram apresentados como média ± EPM; n= 5 animais por grupo ; * p< 0,05 , HP vs N.

Em seguida, foi avaliado o conteúdo proteico do transportador de glicose GLUT4 e da enzima glicolítica GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase). No tecido adiposo marrom, o GLUT-4 é fundamental para a captação de glicose enquanto que o conteúdo de GAPDH pode conferir algumas informações a respeito da utilização da glicose. A figura 5 mostra que os animais tratados com dieta hiperproteica apresentaram redução do conteúdo proteico de GAPDH e GLUT4, como anteriormente já havia sido demonstrado (KAWASHITA et al., 2002).

Figura 5: Efeito da dieta HP no conteúdo de GLUT4 e GAPDH no TAM. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=5$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais;. * $p<0,05$ HP vs. N.

Um importante fenótipo do TAM de animais que são alimentados com a dieta hiperproteica é a redução da massa. O TAM dos animais é aproximadamente 30% menor do que os controles (figura 3a e 3c). Além disso, nota-se a partir da foto histológica que a cor do citoplasma é menos intensa do que os animais controles (Figura 3b), dando indícios de menor concentração proteica. Tal observação foi confirmada a partir da verificação da menor concentração de proteínas totais ($\sim 18\%$) (Figura 3d).

Figura 6: Foto, histologia, massa e concentração de proteínas do TAM de animais alimentados por 30 dias com dieta controle (N) ou hiperproteica (HP). PC= Peso Corporal. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=5$ animais por grupo; * $p<0,05$ HP vs. N.

Os dados apresentados até aqui demonstram que os animais submetidos à dieta HP utilizados neste trabalho, embora de uma nova espécie, *Wistar Hannover*, apresentaram os mesmos ajustes metabólicos e adaptações hormonais anteriormente encontrados por nosso laboratório utilizando ratos *Wistar (Ribeirão Preto)* adaptados a este mesmo tipo de dieta.

IV.2 Efeito da dieta hiperproteica no conteúdo de noradrenalina e na via do AMPc/PKA/CREB no TAM

Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o TAM de animais alimentados com dieta hiperproteica apresenta menor conteúdo e *turnover* de noradrenalina (NOR). Foi quantificado novamente o conteúdo de NOR no TAM de nossos animais e sabendo-se que a maioria dos seus efeitos intracelulares são mediados via receptores β_3 adrenérgicos e pelo segundo mensageiro AMPc, tornou-se interessante avaliar a expressão do RNAm do receptor β_3 adrenérgico e a atividade da via intracelular responsiva às catecolaminas neste tecido. Dessa forma, verificou-se o estado de ativação de PKA e o conteúdo proteico da Epac1, proteínas que contem domínio de ligação ao AMPc. É importante ressaltar que essa forma de avaliação da atividade de PKA não é um método direto, mas sim uma estimativa do grau de fosforilação de seus substratos.

Como pode ser observado na figura 7, o conteúdo de NOR no TAM de animais HP foi significativamente menor do que nos controles. Houve redução do nível de fosforilação dos substratos da PKA, indicando menor atividade desta quinase (Figura 8a). O conteúdo proteico da Epac1 (Figura 8^a), assim como o RNAm do receptor β_3 adrenérgico foram significativamente reduzidos no TAM dos animais alimentados com dieta hiperproteica em comparação aos controles (Figura 8b) Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com dieta hiperproteica reduz o fluxo simpático, ou seja, reduz a atividade da via de sinalização adrenérgica no TAM desses animais.

Figura 7: Concentração de noradrenalina no TAM dos animais alimentados com dieta controle (N) ou hiperproteica (HP). Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. n= 5 animais por grupo; * p<0,05 HP vs. N.

Figura 8: Western blot, densitometria dos substratos de PKA fosforilados, EPAC e níveis de RNAm do receptor β_3 adrenérgicos. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. n= 5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais; * p<0,05 HP vs. N.

IV.3 Efeito da dieta hiperproteica sobre o conteúdo e a função mitocondrial

1. Conteúdo mitocondrial

Sendo o tecido adiposo marrom riquíssimo em mitocôndrias, sua atuação é altamente dependente do conteúdo e da funcionalidade dessa organela. Neste trabalho, as proteínas mitocondriais apresentadas nos resultados seguintes foram avaliadas em fração de tecido total e corrigidas pela β actina e também pela VDAC. Esta última correção foi feita com o intuito de se obter uma estimativa a respeito do conteúdo proteico por mitocôndria do tecido.

A figura 9 mostra que houve aumento significativo de VDAC e de TOM20 no grupo tratado com dieta hiperproteica, enquanto que o conteúdo da citrato sintase não apresentou variação. Tais resultados sugerem que o conteúdo mitocondrial do TAM de animais alimentados com a dieta hiperproteica pode estar aumentado.

Figura 9: Western blot e densitometria de VDAC, TOM20 e citrato sintase. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=5$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * $p<0,05$ HP vs. N.

A fim de confirmar esses achados iniciais sugestivos de que o grupo tratado com dieta hiperproteica apresenta maior conteúdo mitocondrial, foi realizada a medida da atividade da citrato sintase, a qual é considerada uma das mais confiáveis marcadoras do número de mitocôndrias em um tecido (LARSEN et al., 2012). A dieta HP promoveu o aumento da atividade dessa enzima em comparação ao grupo controle (Figura 10), confirmando que os animais HP apresentam maior densidade de mitocôndrias no TAM.

Figura 10: Citrato sintase (unidades/mg de proteína) no TAM. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo, $p < 0,05$ HP vs. N.

Em seguida, foi avaliado o conteúdo proteico dos complexos da cadeia respiratória (OXPHOS – *Oxidative Phosphorylation*) e da ATP-sintase. Quando os dados foram corrigidos pela β actina, houve significativo aumento do complexo II (Figura 11a), corroborando os achados acima relativos ao aumento da densidade mitocondrial do tecido, uma vez que o conteúdo proteico desse complexo é também considerado um marcador do número dessas organelas (LARSEN et al., 2012). Em relação à correção feita por VDAC (Figura 11b), observa-se significativa redução do complexo I e da ATP-sintase. Tais dados são interessantes, pois parecem indicar que apesar do aumento do conteúdo mitocondrial no tecido, a capacidade respiratória e fosforilativa por mitocôndria parecem estar diminuídas no TAM de animais HP.

Figura 11: Western blot e densitometria dos complexos da cadeia respiratória (*Oxphos*) e ATP-sintase. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=5$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * $p<0,05$ HP vs. N.

2. Termogênese

Uma das funções mais importantes do TAM é a sua atividade termogênica, por isso, diversos estudos tem descrito proteínas que atuam na regulação desse processo. Houve significativa redução do conteúdo de UCP-1 (Figura 12a), assim como da AMPK total (Figura 12b) no TAM do ratos submetidos à dieta hiperproteica em comparação ao grupo controle. Além disso, no grupo HP, houve redução dos níveis de RNAm da UCP1, do PGC1 α e da DIO2, gene que controla a síntese da enzima desiodinase do tipo II, que atua na conversão de tiroxina (T4) para triiodotironina (T3), hormônio também relevante para o controle da termogênese (Figura 12c). Analisados em conjunto, tais resultados sugerem que a capacidade termogênica do TAM de animais alimentados com dieta hiperproteica está comprometida.

Figura 12: Western blot e densitometria da UCP1, *thr*¹⁷²AMPK, AMPK e PGC1α e níveis de RNAm de UCP1, PGC1α, Dio2. S=Salina; J=Jejum. Os dados foram apresentados como média ± EPM. n= 5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * p<0,05 HP vs. N.

3. Dinâmica mitocondrial

Mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas que passam constantemente por processos de fusão e fissão a fim de regular as necessidades metabólicas da célula, além da sua própria sobrevivência. Diversas proteínas são importantes marcadoras desses processos, tais como as GTPases mitofusinas 1 e 2, envolvidas com fusão, e as GTPases fisina (FIS1) e dinamina (DRP1), envolvidas com fissão. Tendo por base tais evidências, foram avaliados o conteúdo proteico e a expressão gênica das mitofusinas, além dos níveis de RNAm da FIS1 e DRP1. Não houve alteração no conteúdo proteico das mitofusinas (Figura 13a), mas houve significativa redução da expressão do RNAm da MFN2 e da FIS1 (Figura 13b). Tais resultados não permitem estabelecer conclusões mais seguras a respeito da dinâmica mitocondrial no TAM de animais HP.

Figura 13: Western blot e densitometria da Mfn1 e Mfn2 e níveis de RNAm da MFN1, MFN2, FIS1 e DRP1. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. n= 5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * p<0,05 HP vs. N.

4. Fração mitocondrial

Até esse ponto, as análises das proteínas mitocondriais foram feitas em fração total do TAM e o conteúdo proteico por mitocôndria foi estimado a partir da correção pela VDAC. Com o intuito de verificar a reprodutibilidade das alterações vistas no conteúdo de diversas proteínas, foi realizado um fracionamento das proteínas do citoplasma e das mitocondriais. Não houve alteração significativa na VDAC (figura 14a) como era visto na fração total de TAM (figura 9a) demonstrando que o conteúdo mitocondrial foi normalizado entre os dois grupos. Houve significativa redução do complexo I e da ATP-sintase nos animais tratados com a dieta hiperproteica assim como visualizado no extrato total (figura 14b). Em relação à Mfn2 e a Citrato Sintase, ambas não apresentaram variação no seu conteúdo (figura 14c). Os dados até aqui permitem sugerir que aparentemente a capacidade respiratória e/ou fosforilativa da mitocôndria pode estar comprometida nos animais tratados com a dieta hiperproteica.

Figura 14: Western blot e densitometria dos complexos da cadeia respiratória (*Oxphos*), ATP-sintase, Mfn2 e Citrato Sintase (CS). C: Citosol; M: Mitocôndria. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * $p < 0,05$ HP vs. N.

5. Função mitocondrial

A partir dos dados obtidos a respeito da aparente redução do conteúdo de algumas proteínas mitocondriais, foi realizado um teste de função mitocondrial, no qual a capacidade respiratória e outros parâmetros foram analisados. Nesse ensaio, alguns substratos são adicionados a fragmentos permeabilizados de TAM a fim de se modular o consumo de oxigênio, cuja medição é feita por respirômetro de alta resolução (*Oxygraph-2k; Oroboros*).

O primeiro estado avaliado foi o chamado *routine*. Nele mede-se apenas o consumo basal de oxigênio do tecido sem adição de nenhum tipo de substrato. Houve significativa redução do consumo de oxigênio no grupo HP em relação ao controle (figura 15a). Entretanto, é necessário ter cautela ao se analisar tal resultado, pois em tecidos permeabilizados pode ocorrer um trânsito de substratos entre o lado interno e externo da mitocôndria, mascarando a real taxa de consumo do tecido. A fim de se transpor tal viés, quantidades saturantes de alguns substratos são adicionadas à cuba experimental.

O segundo estado avaliado foi o denominado *OXPHOS* e os substratos adicionados foram succinato e ADP, os quais são fundamentalmente usados para a síntese de ATP pela ATP-sintase. Sendo assim, nesse passo avalia-se especialmente a capacidade fosforilativa do tecido. A figura 15b mostra que houve significativa redução do consumo de oxigênio no TAM de animais alimentados com a dieta hiperproteica em relação ao controle.

Seguiu-se o ensaio adicionando-se um inibidor seletivo da ATP-sintase, a oligomicina. Nesse passo, o estado avaliado é chamado de *leak*, no qual se mede a respiração não-fosforilante, isto é, o grau de desacoplamento do tecido. Sabe-se que o TAM, em condições normais, já é um tecido altamente desacoplado, contudo tal dado é também importante para se verificar a atividade e, de maneira indireta, a quantidade de UCP-1 presente no tecido, visto que essa é a proteína responsável por essa função. Houve significativa redução no consumo de oxigênio do grupo HP em relação ao controle (figura 15c), demonstrando que o tecido tem a respiração desacopladora reduzida, evidenciando o menor conteúdo de UCP1 observado na (figura 12a).

O último passo do ensaio é obtido a partir da adição de um desacoplador químico, o CCCP. Tal estado é denominado *ETS* e reflete a capacidade respiratória máxima do tecido. Assim como nos últimos estados, a dieta hiperproteica também promoveu a redução do consumo de oxigênio no TAM em comparação com a dieta controle (figura 15d).

Esse conjunto de dados evidencia a perda funcional das mitocôndrias do TAM de animais alimentados com a dieta hiperproteica, visto que a capacidade fosforilativa, a

capacidade desacopladora e a capacidade respiratória do tecido estão comprometidas. É importante ressaltar que todos os dados foram corrigidos pela concentração total de proteínas (mg/mL) dos fragmentos utilizados nas cubas experimentais. Além disso, tais dados foram também corrigidos pela atividade da citrato sintase e resultados semelhantes foram obtidos (dados não mostrados).

Figura 15: Ensaio de consumo de oxigênio. Os dados foram apresentados como percentil e mediana. (+ média) $p < 0,05$ HP vs. N.

IV.4 Efeito da dieta hiperproteica na atividade do processo autofágico-lisossomal do TAM

1. Marcadores autofágicos

Os principais marcadores autofágicos são as proteínas p62 e LC3, esta última sofre uma clivagem pela Atg4B e passa a ser nomeada LC3-I, sendo ainda inativa nessa forma. Ao ser lipídada pela ação catalítica das Atg5 e Atg7, adquire a sua forma ativa denominada LC3-II (RAVIKUMAR et al., 2010). Houve significativa redução do conteúdo da LC3-II, contudo sem alteração da razão LC3-II/LC3-I no grupo tratado com a dieta HP (figura 16a). Além disso, os animais alimentados com a dieta rica em proteínas apresentaram redução da p62 e da Atg7, sem alteração no conteúdo de Beclin (figura 16a) e nos níveis de fosforilação de *ser*⁷⁵⁷ULK (figura 16b). Além disso, nesse mesmo grupo, houve significativa redução no RNAm de ULK (figura 16c) em comparação ao grupo controle. Tomados em conjunto esses dados sugerem redução da autofagia no TAM de animais alimentados com a dieta HP.

Figura 16: Western blot e densitometria de LC3, p62, Atg7 e Beclin, *ser*⁷⁵⁷ULK e ULK e níveis de RNAm de ULK. J: Jejum; S: Salina; INS: Insulina. Os dados foram apresentados como média ± EPM. n= 4 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. *p<0,05 HP vs. N.

2. Mitofagia

A figura 17a mostra que os animais alimentados com a dieta hiperproteica apresentaram aumento do conteúdo proteico de PINK1, Parkin e BNIP3, enquanto o conteúdo de Fbox7 mostrou-se reduzido nesses animais em comparação ao controle. Em contrapartida, não houve alteração significativa nos níveis de RNAm de BNIP3 nesses mesmos animais (Figura 17b). Esses dados dão indícios de acúmulo de diversas proteínas relacionadas com a mitofagia podendo sugerir inibição da mitofagia.

Figura 17: Western blot e densitometria de PINK, Parkin, Fbox7, BNIP e níveis de RNAm de BNIP3. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=5$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * $p<0,05$ HP vs. N.

3. Fluxo autofágico

Sabe-se que o processo lisossomal-autofágico é altamente dinâmico. Sendo assim, alterações no conteúdo proteico dos marcadores autofágicos podem fornecer interpretações dúbias. Isso porque, a redução no conteúdo da LC3II pode indicar redução na lipidação da LC3I, o que significaria redução do fluxo autofágico. Contudo, como a LC3II é degradada quando o autofagossomo se funde ao lisossomo, tal redução pode indicar também aumento do fluxo autofágico, visto que a redução percebida na LC3II nesse caso seria advinda do aumento da sua taxa de degradação. A fim de se responder tal questão, realizou-se o experimento de fluxo autofágico utilizando-se de uma droga, a colchicina.

A figura 18a e 18b mostram que o tratamento com colchicina foi eficiente, visto que houve significativo aumento do conteúdo da LC3II, p62, Parkin, Fbxo7 e Mfn2 no grupo controle N tratado com colchicina em comparação ao controle N que recebeu salina. Além disso, é notório que a dieta hiperproteica promoveu menor acúmulo da forma lipídica da LC3 em relação ao grupo controle que recebeu colchicina, assim como da Parkin e da Mfn2, confirmando a inibição do fluxo autofágico no TAM desses animais HP e também dando indícios a respeito da inibição da mitofagia nesse mesmo tecido.

Figura 18: Ensaio de fluxo autofágico. *Western blot* e densitometria de LC3, p62, Parkin, Mfn2, Fbxo7. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4-5$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. # $p < 0,05$ N colchicina vs. N salina; *HP colchicina vs. N colchicina.

4. Fluxo autofágico na fração mitocondrial

Os dados obtidos até aqui mostram que o fluxo autofágico no TAM de animais alimentados com dieta HP está reduzido. Contudo, a maior parte das proteínas relacionadas com a degradação seletiva mitocondrial está aumentada. Dessa forma, a fim de verificar se também na mitocôndria o processo autofágico está inibido, foi avaliado o fluxo autofágico com colchicina, porém na fração mitocondrial isolada.

O TAM dos animais do grupo HP tratados com colchicina apresentou menor acúmulo da LC3 (Figura 19) em comparação com os controles que também receberam essa droga, demonstrando que também a remoção seletiva de mitocôndrias está diminuída nesse grupo, nos permitindo concluir que o aumento das proteínas relacionadas com mitofagia observado anteriormente (figura 17a) pode ser devido a um acúmulo das mesmas no TAM desses animais.

Figura 19: Ensaio de fluxo autofágico. *Western blot* e densitometria de LC3. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. $n=4$ animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. # $p<0,05$ N colchicina vs. N salina; *HP colchicina vs. N colchicina; \$ HP salina vs. N salina.

5. Sinalização PI3K/Akt/FoxO

Ao ser verificada a inibição do processo lisossomal-autofágico, foi investigada a via de sinalização PI3K/Akt que classicamente é conhecida por ser uma reguladora negativa da autofagia. O grupo tratado com a dieta hiperproteica apresentou significativo aumento da fosforilação de Akt (Figura 20b) nos dois resíduos estudados (*thr*³⁰⁸ e *ser*⁴⁷³), sugerindo aumento da atividade dessa quinase no TAM. Tal observação foi comprovada pelo aumento dos níveis de fosforilação de FoxO1 (Figura 20c) e FoxO3a (Figura 20d) em dois resíduos que são sabidamente fosforilados por Akt (*ser*²⁵⁶, *ser*²⁵³). Esses resultados podem indicar que os fatores FoxO estão localizados no citoplasma do TAM de animais alimentados com a dieta HP. A fim de se verificar tal indício, foram avaliados genes que tem a sua transcrição regulada por esses fatores. Houve significativa redução da transcrição de Gabarap nos animais HP (Figura 20e). Tal conjunto de dados sugere que FoxO pode ser um dos fatores responsáveis pela inibição da autofagia apresentada pelo grupo alimentado com a dieta rica em proteínas em comparação ao controle.

Figura 20: Western blot e densitometria da PI3K p110, ser²⁵⁶Akt, thr³⁰⁸Akt, Akt, ser²⁵⁶FoxO1, FoxO1, ser²⁵³FoxO3a, FoxO3a e níveis de RNAm de LC3b, p62 e Gabarap. Os dados foram apresentados como média ± EPM. n= 4-5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * p<0,05 HP vs. N.

6. Sinalização das MAPK

As MAPK's (proteínas quinases ativadas por mitógenos) são sensores intracelulares reguladoras do ciclo e do metabolismo celular e foi avaliado o estado de ativação das MAPKs, ERK e p38 e seus respectivos resíduos de fosforilação. Houve significativo aumento da fosforilação de ERK1 e ERK2 nos resíduos *thr*²⁰² e *tyr*²⁰⁴ respectivamente no grupo tratado com a dieta HP em comparação aos controles (Figura 21a). Em relação à p38, houve significativo aumento do seu conteúdo proteico total (Figura 21b), contudo sem alteração na fosforilação do resíduo *thr*¹⁸⁰ neste mesmo grupo.

Figura 21: Western blot e densitometria da *thr*²⁰²ERK1/*tyr*²⁰⁴ERK2, ERK1/ERK2, *thr*¹⁸⁰p38, p38. Os dados foram apresentados como média ± EPM. n= 5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * p<0,05 HP vs. N.

7. Receptor de insulina (IR) e Substrato do receptor (IRS-1)

As vias de sinalização intracelulares envolvendo as proteínas Akt e MAPK são estimuladas pela insulina e, portanto, são inibidoras do fluxo autofágico. A fim de testarmos a hipótese de que em nosso modelo experimental a insulina parece não ser o fator mais importante responsável pelo controle da autofagia, foram dosados primeiramente os níveis séricos da insulina, além do conteúdo proteico e do estado de fosforilação do receptor de insulina (IR) e do substrato do receptor de insulina (IRS1) no TAM dos animais.

A figura 22a mostra que houve significativa redução dos níveis séricos de insulina nos animais HP em comparação aos controles. Entretanto, não houve alteração na fosforilação de IR no resíduo estimulado pela ligação da insulina (tyr^{1185}), mas houve significativa redução do conteúdo de IRS1 nos animais HP em relação aos controles (Figura 22b). Além disso, vale ressaltar que esse mesmo grupo já havia apresentado menor conteúdo de GLUT4 e da enzima glicolítica GAPDH (figura 5). Em suma, esse conjunto de dados nos sugere que provavelmente não é a insulina a responsável pela inibição autofágica promovida pelo tratamento com a dieta hiperproteica, podendo talvez os aminoácidos exercer este papel. Futuros experimentos serão necessários para testar essa hipótese.

Figura 22: Insulina sérica, *Western blot* e densitometria de IR β , tyr^{1185} IR β , IRS1 e tyr^{895} IRS1. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. n= 5 animais por grupo e os blots são representativos de 2 animais. * $p < 0,05$ HP vs. N.

|| DISCUSSÃO

IV. Discussão

Nosso laboratório tem uma longa história no estudo do controle hormonal, nutricional e neural da homeostase energética. Um dos principais modelos utilizados ao longo desses últimos 50 anos são os animais adaptados a uma dieta hiperproteica, totalmente livre de carboidratos (dieta HP). Estes animais apresentam características comuns como a manutenção dos níveis de glicose sanguínea durante a restrição alimentar, ao contrário da conhecida queda da glicemia durante o jejum naqueles adaptados a dietas balanceadas, menor queda do conteúdo de glicogênio hepático nesta condição alimentar e alta atividade neoglicogenética no estado alimentado, não sofrendo alteração ou até mesmo redução durante o jejum.

Ainda vale ressaltar que esses animais HP apresentam altos níveis circulantes de glucagon e menores valores de insulinemia, quando comparados aos animais que consomem dieta balanceada. Outra característica marcante observada em animais que consomem alto teor de proteínas é a redução da massa do TAM, a qual é acompanhada pela redução na produção de calor. Foi também verificado que eles apresentam significativa redução da atividade simpática no TAM, avaliada pela redução do conteúdo e *turnover* de noradrenalina (BRITO; BRITO; MIGLIORINI, 1992; BRITO et al., 2001; KAWASHITA et al., 2002; KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1980). Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram investigar os mecanismos moleculares que regulam a atividade termogênica, o conteúdo e a funcionalidade mitocondrial, além da atividade autofágica-lisossomal no TAM de roedores adaptados a dieta HP.

Considerando que todas as informações conhecidas sobre os efeitos da dieta hiperproteica no controle do metabolismo energético foram obtidas em ratos *Wistar (Ribeirão Preto)*, foi inicialmente necessária a avaliação dos parâmetros de adaptação a este tipo de dieta em outra espécie de rato, da linhagem *Wistar Hannover*, que passou a ser utilizada na FMRP-USP a partir de janeiro de 2018. Assim para testar as hipóteses delineadas nesse trabalho, ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* foram tratados por 30 dias com dieta controle (N) ou com dieta hiperproteica totalmente livre de carboidratos (HP).

O presente estudo demonstrou que o regime alimentar hiperproteico durante 30 dias: 1- não alterou o peso corporal, exceto na primeira semana, 2-aumentou os níveis plasmáticos de glucagon e reduziu os níveis glicêmicos e de ácidos graxos livres no estado alimentado, 3- impediu o aumento dos níveis de glicerol e ácidos graxos livres durante o jejum, 4-promoveu menor queda do conteúdo de glicogênio hepático e da glicemia durante a restrição alimentar de 24 horas, 5-reduziu o conteúdo proteico da enzima glicolítica GAPDH e do transportador

de glicose GLUT-4, 6-reduziu a massa do TAM e a concentração de proteínas totais nesse tecido. Esses achados mostram um comportamento metabólico bastante semelhante entre as duas espécies de rato quando submetidos ao regime alimentar hiperproteico.

No presente trabalho foi demonstrada, no TAM de ratos HP, redução do conteúdo de duas importantes proteínas relacionadas com a captação e utilização da glicose, GLUT4 e GAPDH, semelhante às observações anteriores do nosso laboratório (KAWASHITA et al., 2002). Esse padrão alimentar também favorece a redução glicêmica já na primeira semana após o início da dieta e, conseqüentemente, a redução insulinêmica. Também já foi mostrada que a adaptação a essa dieta HP conduz à redução da lipogênese e da lipólise no TAM e no TAB (KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1985)(BRITO; BRITO; MIGLIORINI, 1992; KETTELHUT; FOSS; MIGLIORINI, 1985), o que está em consonância com os menores níveis de ácidos graxos livres e glicerol encontrados em nosso trabalho. Além disso, os níveis plasmáticos de glucagon, já altos nos ratos alimentados com dieta HP não sofrem alteração quando os animais são submetidos ao jejum, ao contrário do grande incremento observado nos ratos controles. Aparentemente, não é necessário o aumento da secreção desse hormônio a fim de manter a glicemia, visto que a neoglicogênese hepática já se encontra elevada no estado alimentado (MIGLIORINI et al., 1973; PERET; CHANEZ, 1976) e parece ser suficiente para o suprimento das demandas energéticas durante a restrição calórica em curto prazo.

Um dos principais estímulos reguladores da atividade do TAM é a noradrenalina liberada pelo sistema nervoso simpático. Brito e colaboradores (1998) demonstraram ocorrer redução do conteúdo e do *turnover* de NOR no TAM de animais alimentados com dieta HP. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esses achados, visto que foi também encontrado menor conteúdo de NOR no TAM dos nossos ratos HP em comparação aos controles. A NOR, após interagir com os seus receptores β adrenérgicos, promove o aumento intracelular do AMPc, o qual interage com proteínas que possuem domínio de ligação para esse mensageiro, especialmente PKA e EPAC. Os achados de redução da expressão do gene do receptor β_3 noradrenérgico e da concentração intratecidual de NOR, acompanhados de diminuição da fosforilação dos substratos da PKA e do conteúdo da EPAC, sugerem estar reduzido o fluxo simpático no TAM de animais adaptados à dieta HP em relação aos controles.

A NOR controla a atividade termogênica do TAM por meio da regulação da expressão de importantes genes como o da Dio2, PGC1 α e UCP1, sendo a concentração dessas proteínas

diretamente proporcional à capacidade termogênica do tecido. O gene Dio2 controla a expressão da enzima desiodinase 2, a qual atua na síntese da forma ativa do hormônio tireoidiano (T3). Animais “nocaute” para Dio2 apresentam brusca queda do hormônio T3 e reduzida capacidade termogênica do TAM (DE JESUS et al., 2001). Isso acontece porque T3 estimula a termogênese por induzir a expressão da UCP1 (BIANCO et al., 2005). O PGC1 α , por sua vez, é capaz de estimular os fatores de transcrição NRF, que são responsáveis pela biogênese mitocondrial (WU et al., 1999). Além do controle a nível gênico, a quinase AMPK pode fosforilar proteínas e participar da coordenação do programa termogênico desse tecido. Em nossa investigação, houve significativa redução do conteúdo da UCP1 e do conteúdo total da AMPK, redução da expressão dos genes da UCP1, PGC1 α e Dio2 no TAM de ratos HP, os quais são modulados pela sinalização noradrenérgica. Evidências anteriores já haviam demonstrado que os animais tratados com a dieta HP apresentam menor aumento da temperatura do TAM a partir da infusão de noradrenalina (BRITO et al., 1998). Os resultados do nosso estudo demonstram que a redução da capacidade termogênica dos animais HP ocorre pela menor expressão dos genes da UCP1, PGC1 α e Dio2 decorrente, pelo menos em parte, da redução da estimulação noradrenérgica e da menor atividade do SNS nesses animais.

É fato que a dieta HP reduz o conteúdo de NOR e o seu *turnover* no TAM. Em outros tecidos, como no TAB epididimal, ratos tratados com a dieta HP não apresentaram alteração no conteúdo de NOR, no entanto, a taxa de renovação foi significativamente menor nesses animais, assim como o peso do tecido (FRASSON et al., 2012). Já no fígado, embora o *turnover* não tenha sido avaliado, o conteúdo de NOR foi significativamente reduzido (MARTINS-SANTOS et al., 2008). Assim, o estímulo simpático parece estar globalmente reduzido no animal HP, o que pode ser um efeito proporcionado por aminoácidos e /ou por alterações hormonais e neurais promovidas pela dieta. Considerando que animais HP apresentam clara redução da termogênese, tornou-se interessante investigar a capacidade funcional das principais organelas responsáveis pela produção de calor do TAM, as mitocôndrias. Um dos grandes desafios ao se estudar mitocôndrias é o de se encontrar marcadores confiáveis e reprodutíveis do seu conteúdo. Um dos mais usados ao longo do tempo, o DNA mitocondrial, tem sofrido grande descrédito, especialmente pelo fato de que uma mitocôndria pode apresentar mais de uma cópia de DNA. Um estudo de Larsen e colaboradores (2012) demonstrou que os marcadores que melhor se correlacionam com a densidade de mitocôndrias de um tecido são: o conteúdo de cardiolipina, a atividade da citrato sintase, o conteúdo do complexo II da cadeia respiratória e a atividade dos complexos I, II e IV (LARSEN et al., 2012). A função do tecido adiposo marrom, caracterizado pelo grande

número de mitocôndrias, é altamente dependente do conteúdo e da funcionalidade dessa organela. No presente trabalho, ratos adaptados à dieta HP apresentaram aumento das unidades de citrato sintase e do conteúdo proteico do complexo II da cadeia respiratória, demonstrando haver um maior número de mitocôndrias no TAM desses animais. Também apresentaram aumento das proteínas VDAC e TOM20, que por serem proteínas da membrana externa desta organela, são frequentemente usadas para análises de proteínas mitocondriais, uma vez que suas expressões são relativamente constantes e não reguladas, a não ser pelo conteúdo de mitocôndrias do tecido. Futuros experimentos utilizando microscopia eletrônica e imunofluorescência serão muito interessantes para demonstrar a morfologia das mitocôndrias no TAM desses animais HP.

A autofagia é um importante processo regulatório da “saúde” das células e suas organelas, visto que essa via degrada substratos intracelulares reciclando esses compostos a fim de manter um adequado funcionamento de todos os constituintes celulares. Em nosso modelo foi mostrado que o fluxo autofágico no TAM de ratos HP está reduzido, especialmente pela análise do seu principal marcador, a LC3-II, tanto na avaliação do extrato total de tecido quanto na fração mitocondrial isolada, e tal resultado poderia explicar o aumento do número de mitocôndrias no TAM desses animais. O maior conteúdo mitocondrial no TAM dos ratos HP não advém do aumento da síntese dessas organelas, mas sim da redução da taxa de degradação das mesmas, o que poderia promover um acúmulo de mitocôndrias que apresentam capacidade funcional reduzida. Essa hipótese foi corroborada pela redução da expressão gênica do marcador de biogênese mitocondrial PGC1 α e pela inibição do fluxo autofágico mitocondrial, também avaliada pelo menor acúmulo da LC3-II.

Por conseguinte, o acúmulo das proteínas mitocondriais PINK1, Parkin, BNIP3 e outras, sugere que a mitofagia está reduzida no TAM desses animais. A inibição da mitofagia, processo importante para a reciclagem mitocondrial, impacta diretamente na função desta organela. Lu e colaboradores (2018), ao tratarem adipócitos com bafilomicina, também conhecido inibidor do fluxo autofágico, observaram significativa redução da capacidade de fosforilação oxidativa medida pela taxa de consumo de oxigênio (LU et al., 2018). É importante salientar que também o inverso pode ser verdadeiro, isto é, a perda da capacidade funcional das mitocôndrias pode comprometer o funcionamento lisossomal. Trabalhos tem demonstrado que a inibição da cadeia de transporte de elétrons de mitocôndrias do tecido cerebral, assim como a ausência de proteínas de fusão mitocondrial, conduziram à significativa perda da atividade lisossomal (DEMERS-LAMARCHE et al., 2016). Não pode

ser afastada a hipótese que a redução da funcionalidade mitocondrial seja o evento primário conduzindo posteriormente à perda da atividade lisossomal.

No presente estudo foi muito interessante a observação do aumento do conteúdo mitocondrial ser acompanhado de redução da capacidade fosforilativa e termogênica do TAM de animais HP, uma vez que apresentaram menores taxas de consumo de oxigênio. Por atuar no aumento da expressão da UCP1 e consequentemente no aumento da termogênese, o hormônio T3 é capaz de aumentar diretamente o consumo de oxigênio e, dessa forma, a capacidade respiratória mitocondrial de maneira tempo e dose dependente (YAU et al., 2019). Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que os animais HP apresentam níveis reduzidos dos hormônios T3 e T4 (DORETTO, 1995). Além disso, o nosso trabalho mostrou ocorrer redução da expressão do gene da Dio2 no TAM, o que reduz a conversão local da forma inativa para a ativa do hormônio tireoidiano, efeito que certamente contribuiu para a diminuição da capacidade respiratória das mitocôndrias do TAM dos animais HP.

Além da função sobre a termogênese e respiração mitocondrial, o hormônio tireoidiano T3 é relevante para o aumento da mitofagia no TAM. Estudos envolvendo tratamento de camundongos com esse hormônio verificaram significativo aumento do fluxo autofágico e aumento da degradação mitocondrial por meio de mitofagia (YAU et al., 2019). Essa constatação pode explicar, ao menos em parte, a redução da mitofagia apresentada por esses animais em nosso trabalho. Tomados em conjunto, os dados sugerem que a perda da funcionalidade mitocondrial e a redução da autofagia no TAM são fatores inter-relacionados e que podem estar sendo controlados, pelo menos em parte, pelos menores níveis do hormônio tireoidiano em animais submetidos à dieta hiperproteica. Contudo, vale ressaltar que a autofagia é um processo dinâmico e que também é regulado ao longo do tempo dependendo das necessidades intracelulares, portanto, a redução do fluxo autofágico demonstrada aqui não descarta a hipótese de que em algum período experimental mais agudo, esse processo tenha estado aumentado nos animais HP, visto que nesse trabalho foi utilizado o período de adaptação à dieta de 30 dias.

Evidências recentes têm sugerido que a capacidade termogênica e a mitofagia no TAM são processos interdependentes. Animais “nocaute” para UCP1 e expostos às baixas temperaturas apresentaram redução da expressão gênica de PINK1 e Parkin e acúmulo dessas proteínas após tratamento com cloroquina, um inibidor do fluxo autofágico, culminando com a inibição desse processo (LU et al., 2018). Esses dados apontam que, de alguma forma, a UCP1 é facilitadora da mitofagia no TAM de animais expostos ao frio. A redução do conteúdo da UCP1 vista no nosso trabalho, além de contribuir para o comprometimento da

capacidade termogênica, pode também estar contribuindo para a inibição da autofagia observada nesses animais.

Os fatores de transcrição FoxO tem sido mostrados como importantes reguladores das vias de degradação proteica. Quando fosforilados por quinases como Akt, eles ficam aprisionados no citoplasma e, portanto, incapazes de transcrever genes envolvidos com os processos proteolíticos. A inibição autofágica observada em nosso modelo foi corroborada pelo aumento do estado de fosforilação da Akt em seus dois principais resíduos (*thr*³⁰⁸ e *ser*⁴⁷³), o que culminou com o aumento da fosforilação de FoxO1 e FoxO3, além da redução significativa da transcrição de um dos seus genes alvos, Gabarap, cuja proteína está envolvida no processo autofágico lisossomal. Sabe-se que a Akt, assim como as MAPKs, são proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, entretanto os animais adaptados à dieta HP apresentaram níveis reduzidos desse hormônio, assim como do conteúdo do IRS1 (substrato 1 do receptor de insulina). São conhecidos vários substratos do receptor de insulina (IRS1, 2, 3,4, Gab-1, shc, cbl, entre outros), os quais são proteínas fundamentais na via de sinalização da insulina, mas a importância de cada subtipo é dependente do tecido. Classicamente, a partir do estímulo da insulina, esses substratos são estimulados e, como resultado, é observado aumento da fosforilação da Akt. Células adiposas marrons que não expressavam IRS1 apresentaram aumento compensatório do conteúdo de IRS2, mas não do IRS3 e IRS4. Todavia, esse aumento não foi suficiente para restaurar a ativação da PI3K classe I e a fosforilação da Akt (SOMWAR et al., 1998), demonstrando que o IRS1 parece ser o mais importante para a transdução do sinal de insulina em adipócitos marrons. Sendo assim, a ativação das quinases Akt e ERK observada em nosso trabalho parece ser independente da insulina, visto que houve redução dos níveis plasmáticos de insulina e do conteúdo de IRS1.

Ao longo dos últimos anos tem emergido a importância dos aminoácidos no controle da autofagia. Zheng e colaboradores (2016) demonstraram que porcos alimentados com dieta controle suplementada com BCAAs eram protegidos da perda da massa muscular esquelética após jejum (ZHENG et al., 2016). Da mesma maneira, ratos suplementados com todos os aminoácidos apresentaram menor perda de massa muscular após um estímulo atrofico (suspensão da pata) (MAKI et al., 2012). Foi mostrado que aminoácidos possuem sensores intracelulares que são capazes de regular a atividade de mTOR independentemente de Akt (YOON et al., 2016). Um mecanismo bem estabelecido se dá a partir da ligação da leucina ao seu RNA transportador denominado leucil-tRNA-sintetase. Após ser formado, esse complexo estimula a PI3K de classe III (Vps34), a qual recruta diversas outras GTPases pequenas, culminando com o aumento da atividade de mTOR (YOON et al., 2016). Proteínas como as

da família das foliculinas (FLC), os fatores de ribosilação (ARF), além dos carreadores de soluto (SLC), têm também emergido como importantes sensores de aminoácidos, ainda que em músculo esquelético (SHIMOBAYASHI; HALL, 2016). Além dessas, as sestrinas são proteínas citosólicas que interagem com um complexo multiproteico e regulam negativamente mTOR. Contudo, essa família proteica é um importante sensor de leucina e, quando esse aminoácido está presente, ele se liga às sestrinas e diminuem a inibição que elas exercem sobre mTOR, levando, portanto, à redução da autofagia e aumento da síntese proteica. CASTOR também representa outra família proteica que possui função muito semelhante à das sestrinas, porém tem sua função regulada exclusivamente por arginina (CHANTRANUPONG et al., 2016). Sendo assim, outro fator que pode estar sendo responsável pela redução da autofagia em nosso modelo são os aminoácidos presentes na dieta hiperproteica. Eizirik e colaboradores demonstraram que, além da dieta HP ser rica em aminoácidos de cadeia ramificada, animais adaptados a ela apresentam também aumento dos níveis plasmáticos de alguns aminoácidos, principalmente leucina, isoleucina e valina. (EIZIRIK; KETTELHUT; MIGLIORINI, 1987).

Além dos mecanismos acima expostos, evidências têm apontado que aminoácidos são também capazes de estimular as MAPKs e estas, por sua vez, podem também regular a autofagia. Terradellas e colaboradores (2008) demonstraram que células que foram incubadas com todos os aminoácidos apresentaram aumento do nível de fosforilação de ERK e p38 e, ao serem submetidas ao jejum, o estímulo da autofagia foi de menor magnitude que o observado nas células controles jejuadas. Além disso, a inibição autofágica promovida por aminoácidos foi completamente abolida quando os animais foram administrados com inibidores dessas duas quinases (CASAS-TERRADELLAS et al., 2008). Em nosso trabalho, os animais tratados com a dieta hiperproteica apresentaram aumento da fosforilação de ERK, além do aumento do conteúdo total da p38, sugerindo que essa via pode também estar sendo regulada pelos aminoácidos da dieta e atuando na regulação da autofagia no TAM desses animais.

Alguns trabalhos têm sugerido que a Akt pode também ter a sua fosforilação estimulada por aminoácidos e de maneira independente da insulina. Diferentes linhagens celulares, como HEK293, MCF7, Huh7, C2C12, MEF e HeLa, quando incubadas na presença de aminoácidos, apresentaram significativo aumento da fosforilação de Akt nos resíduos *Thr*³⁰⁸ e *Ser*⁴⁷³ (TATO et al., 2011). Tato e colaboradores confirmaram que aminoácidos podem também estimular a fosforilação de Akt no resíduo *Ser*⁴⁷³ via PI3K de classe I, diferente do que já está bem estabelecido na literatura, que é a participação da Vps34 (PI3K classe III) na

sinalização de aminoácidos, especialmente promovendo de maneira indireta a ativação de mTOR e consequente redução da autofagia.

Além disso, foi verificado que o uso do inibidor específico da Vps34, 3-metiladenina, não alterou o estado de fosforilação de Akt. Ainda que mais experimentos sejam necessários para confirmar essa via em nosso modelo, a ativação de Akt vista neste trabalho certamente está contribuindo para a redução da via autofágica no TAM de animais HP e pode estar sendo estimulada pelos aminoácidos provenientes da dieta, independente da insulina.

Mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas que passam constantemente por processos de fusão e fissão a fim de regular as necessidades metabólicas da célula, além da sua própria sobrevivência. Sabe-se também que essas adaptações morfológicas são fundamentais para que a mitocôndria mantenha a sua forma, distribuição e tamanho. Quaisquer desbalanços na coordenação desses processos resultarão ou em um grande número de pequenas mitocôndrias de formato arredondado (fissão aumentada) ou em uma rede hiperfusão com mitocôndrias conectadas e alongadas (fusão estimulada), o que pode dificultar o *turnover* mitocondrial. Em nosso modelo, não foi observada diferença no conteúdo proteico das mitofusinas, enquanto que os níveis de expressão gênica da mitofusina 2, assim como da mitofusina 1, apresentaram significativa redução. Tais dados tornam as interpretações inconclusivas quanto aos processos de dinâmica mitocondrial, sendo necessários mais experimentos, especialmente utilizando-se técnicas de imagem, a fim de entendermos melhor o desenvolvimento desse processo no TAM de animais submetidos à dieta hiperproteica.

V. Conclusões

Os resultados apresentados nesse trabalho confirmam que a adaptação dos animais *Wistar Hannover* à dieta hiperproteica é semelhante aos da linhagem *Wistar (Ribeirão Preto)* utilizada anteriormente em nosso laboratório, sendo reprodutíveis nesse novo modelo as alterações metabólicas e hormonais previamente verificadas.

Os dados aqui obtidos demonstram que a redução da capacidade termogênica do TAM de animais HP é determinada a nível gênico pela redução da taxa de transcrição de importantes marcadores dessa função como a UCP1, PGC1 α e Dio2 sendo esse processo mediado pela redução do fluxo simpático neste tecido e corroborado pelo menor conteúdo proteico da UCP1.

Outra interessante observação foi o aumento do conteúdo mitocondrial no TAM dos animais submetidos à dieta hiperproteica, demonstrado pelo maior conteúdo proteico da VDAC e Tom20 e pela maior atividade da citrato sintase. Curiosamente, esse aumento foi acompanhado por reduzida capacidade fosforilativa e termogênica dessas organelas. Os nossos achados sugerem que o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais nesse tecido parece não depender do aumento da síntese, visto que houve redução da expressão gênica do marcador de biogênese mitocondrial PGC1 α , mas parece sim ser resultante da redução do fluxo autofágico e da degradação dessas organelas, o que pode ser explicado pelos menores níveis circulantes de T3 e do alto teor de aminoácidos na dieta, os quais podem direta e indiretamente (AKT e MAPKs) contribuir para a inibição da autofagia no TAM dos animais alimentados com dieta HP.

Em conjunto, esses dados contribuem para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no controle do metabolismo proteico e da funcionalidade das mitocôndrias do TAM de animais alimentados com dieta rica em proteínas.

|| REFERÊNCIAS

VI. Referências Bibliográficas

ASHRAFI, G.; SCHWARZ, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 1, p. 31–42, 2013.

BARTNESS, T. J.; VAUGHAN, C. H.; SONG, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. S1, p. S36–S42, 11 out. 2010.

BAYASCAS, J. R.; ALESSI, D. R. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. **Molecular Cell**, 2005.

BECHET, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 2098–2114, out. 2005.

BIANCO, A. C. et al. Adaptive Activation of Thyroid Hormone and Energy Expenditure. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 3–4, p. 191–208, 8 jun. 2005.

BIRKENKAMP, K. U.; COFFER, P. J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochemical Society Transactions**, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.

BRITO, M. N. et al. Sympathetic activity in brown adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 69, n. 1, p. 1–5, 1998.

BRITO, M. N. et al. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1003-9, 1999.

BRITO, M. N.; BRITO, N. A.; MIGLIORINI, R. H. Thermogenic capacity of brown adipose tissue is reduced in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 11, p. 2081–2086, 1 nov. 1992.

BRITO, S. R. C. et al. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 50, n. 10, p. 1208–1212, 2001.

BURCHELL, V. S. et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1257–1265, 2013.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological

Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.

CASAS-TERRADELLAS, E. et al. Biochimica et Biophysica Acta ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 12, p. 2241–2254, 2008.

CHANTRANUPONG, L. et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. **Cell**, 2016.

CROWLEY, V. E. F.; YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 4, p. 276–286, abr. 2002.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009.

DE FRANÇA, S. A. et al. A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. **Lipids**, v. 51, n. 3, p. 303–310, 19 mar. 2016.

DE JESUS, L. A. et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 9, p. 1379–1385, 1 nov. 2001.

DEMERS-LAMARCHE, J. et al. Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 19, p. 10263–10276, 6 maio 2016.

DESAUTELS, M.; DULOS, R. A.; MOZAFFARI, B. Selective loss of uncoupling protein from mitochondria of surgically denervated brown adipose tissue of cold-acclimated mice. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 64, n. 11, p. 1125–1134, nov. 1986.

DING, W.-X.; YIN, X.-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 7, p. 547–564, 1 jul. 2012.

EIZIRIK, D. L.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Administration of branched-chain amino acids reduces the diabetogenic effect of streptozotocin in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, 1987.

FISCHER, A. H. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2008.

FRASSON, D. et al. The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2012.

GRANNEMAN, J. G.; CAMPBELL, R. G. Effects of sucrose feeding and denervation on lipogenesis in brown adipose tissue. **Metabolism**, v. 33, n. 3, p. 257–261, 1 mar. 1984.

HADDAD, F.; ADAMS, G. R. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 1, p. 203–210, jan. 2004.

HANSEN, J. B.; KRISTIANSEN, K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. **Biochemical Journal**, v. 398, n. 2, p. 153–168, 1 set. 2006.

HARDIE, D. G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 138, p. 20170774, 31 jan. 2018.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. **Progress in Lipid Research**, v. 28, n. 2, p. 67–115, 1989.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2890–2898, ago. 1990.

HIMMS-HAGEN, J. et al. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 279, n. 3 48-3, p. C670–C681, 1 set. 2000.

INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 648–657, 12 set. 2002.

JÄGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12017–22, 17 jul. 2007.

JÉQUIER ERIC; TAPPY LUC. Regulation of Body Weight in Humans. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 451–480, 2019.

JU, J. S. et al. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 929–935, 27 out. 2010.

KAWASHITA, N. H. et al. Glucose uptake, glucose transporter GLUT4, and glycolytic enzymes in brown adipose tissue from rats adapted to a high-protein diet. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 51, n. 11, p. 1501–1505, 2002.

KETTELHUT, I. C.; FOSS, M. C.; MIGLIORINI, R. H. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. **The American journal of physiology**, v. 239, n. 5, p. R437-44, nov. 1980.

KETTELHUT, I. C.; FOSS, M. C.; MIGLIORINI, R. H. Lipolysis and the antilipolytic effect of insulin in adipocytes from rats adapted to a high-protein diet. **Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 1 jan. 1985.

KIM, I.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; LEMASTERS, J. J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 462, n. 2, p. 245–

253, 15 jun. 2007.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, 2016.

KOZAK, L. P.; HARPER, M.-E. Mitochondrial Uncoupling Proteins in Energy Expenditure. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 339–363, 28 jul. 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970.

LARSEN, S. et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 14, p. 3349–3360, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 2001.

LOWRY. Lowry Protein Assay. **Journal of Biological Chemistry**, 1951.

LU, Y. et al. Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8251, 29 dez. 2018.

MACVICAR, T. Mitophagy. **Essays in Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 93–104, 2013.

MAKI, T. et al. Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogin-1 and MuRF1 in rats. **Nutrition Research**, v. 32, n. 9, p. 676–683, set. 2012.

MATTHIAS, A. et al. Thermogenic Responses in Brown Fat Cells Are Fully UCP1-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25073–25081, 2000.

MIGLIORINI, R. H. et al. Gluconeogenesis in a carnivorous bird (black vulture). **American Journal of Physiology**, 1973.

MORENO, M. et al. Cold exposure induces different uncoupling-protein thermogenin masking/unmasking processes in brown adipose tissue depending on mitochondrial subtypes. **Biochemical Journal**, v. 300, n. 2, p. 463–468, 1 jun. 1994.

MULLIGAN, J. D. et al. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. **The Journal of Physiology**, v. 580, n. 2, p. 677–684, 15 abr. 2007.

NAGATA, M. et al. Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Mouse Model Induced by Monosodium Glutamate. **Experimental Animals**, v. 55, n. 2, p. 109–115, 2006.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology**, v. 293, n. 2, p. 444–452, 2007.

PERET, J.; CHANEZ, M. Influence of Diet, Cortisol and Insulin on the Activity of

Pyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in the Rat Liver. **The Journal of Nutrition**, v. 106, n. 1, p. 103–110, 1 jan. 1976.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383–1435, 2010.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Effect of chronic food restriction on energy balance, thermogenic capacity, and brown-adipose-tissue activity in the rat. **Bioscience Reports**, v. 2, n. 8, p. 543–549, 1 ago. 1982.

SHI, H. et al. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 296, n. 5, p. C1040–C1048, maio 2009.

SHIMIZU, Y. et al. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 264, n. 6 27-6, 1993.

SHIMIZU, Y.; NIKAMI, H.; SAITO, M. Sympathetic Activation of Glucose Utilization in Brown Adipose Tissue in Rats¹. **The Journal of Biochemistry**, v. 110, n. 5, p. 688–692, 1 nov. 1991.

SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M. N. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. **Cell Research**, v. 26, n. 1, p. 7–20, 11 jan. 2016.

SOMWAR, R. et al. Temporal activation of p70 S6 kinase and Akt1 by insulin: PI 3-kinase-dependent and -independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 275, n. 4, p. E618–E625, 1 out. 1998.

SWICK, R. W.; GRIBSKOV, C. L. The Effect of Dietary Protein Levels on Diet-Induced Thermogenesis in the Rat. **The Journal of Nutrition**, v. 113, n. 11, p. 2289–2294, 1 nov. 1983.

TATO, I. et al. Amino Acids Activate Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6128–6142, 25 fev. 2011.

WILLIAMS, R. S. et al. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 376–380, 1986.

WU, Z. et al. Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 115–124, jul. 1999.

YANG, J. Y. et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. **Nature Cell Biology**, 2008.

YAU, W. W. et al. Thyroid hormone (T₃) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. **Autophagy**, v. 15, n. 1, p. 131–150, 2 jan. 2019.

YOON, M. S. et al. Leucyl-tRNA Synthetase Activates Vps34 in Amino Acid-Sensing mTORC1 Signaling. **Cell Reports**, 2016.

ZHANG, F. et al. Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. **EBioMedicine**, v. 13, p. 157–167, 2016.

ZHAO, J. et al. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metabolism**, 2007.

ZHENG, L. et al. Effects of Supplementation of Branched-Chain Amino Acids to Reduced-Protein Diet on Skeletal Muscle Protein Synthesis and Degradation in the Fed and Fasted States in a Piglet Model. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 17, 28 dez. 2016.