ANAYSA PAOLA BOLIN

**Investigação do potencial termogênico e metabólico
da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos -
repercussão sistêmica do fenótipo bege**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo

2018

ANAYSA PAOLA BOLIN

**Investigação do potencial termogênico e metabólico
da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos -
repercussão sistêmica do fenótipo bege**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemari Otton

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bolin, Anaysa Paola

Investigação do potencial termogênico e metabólico da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos - repercussão sistêmica do fenótipo bege / Anaysa Paola Bolin; orientadora Rosemari Otton. -- São Paulo, 2018.
105 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Catequinas. 2. Chá verde. 3. Gasto energético. 4. Obesidade. 5. Tecido adiposo. I. Otton, Rosemari, orientador. II. Título.

Estudo realizado no laboratório de Fisiologia Celular e Biologia Molecular da Universidade Cruzeiro do Sul, Campus Anália Franco. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA Universidade de São Paulo, 135/2013) e da Universidade Cruzeiro do Sul (CEUA Cruzeiro do Sul, 004/2015) e recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2013/22293-0 e 2011/19216-8, Bolsa de Doutorado FAPESP 2012/20415-8 e bolsa BEPE 2016/10114-1.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Anaysa Paola Bolin

Título da Tese: Investigação do potencial termogênico e metabólico da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos - repercussão sistêmica do fenótipo bege

Orientador(a): Profa. Dra Rosemari Otton

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **135** nas fls. **12** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rosemari Otton**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Modulação do estresse de retículo endoplasmático em adipócitos e leucócitos de camundongos induzidos a obesidade e tratados cronicamente com extrato de chá verde (Camelia sinensis)*" do qual participam o(s) aluno(s) **Anaysa Paola Bolin**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **03.12.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 04 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.150.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **135/2013/CEUA**, válido até 03/12/2017, e por solicitação da Profa. Dra. **Rosemari Otton**, do departamento de Farmacologia, informo que o título do projeto foi alterado para "**Investigação do potencial termogênico e metabólico da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos**" por solicitação da banca de qualificação.

São Paulo, 10 de agosto de 2017.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

www.cruzeirosul.edu.br

Anália Franco
Av. Regente Feijó, 1295
03342-000 São Paulo SP
T F 55 11 2672 6200

Pinheiros
R. Butantã, 285
05424-140 São Paulo SP
T F 55 11 3030 4000

Liberdade
R. Galvão Bueno, 868
01506-000 São Paulo SP
T F 55 11 3385 3000

São Miguel
Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225
08060-070 São Paulo SP
T F 55 11 2037 5700

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação de Mirnas e Validação de Genes-Alvo no Tecido Adiposo e Fígado de Camundongos Obesos em Resposta ao Tratamento com Extrato de Chá Verde", protocolo nº 004_2015, sob a responsabilidade de Rosemari Otton – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL, em reunião de 16/09/2015.

Prof. Dra. Rosemari Otton
Comissão de Ética no uso de Animais

Dedico este trabalho a todas as pessoas que passaram em minha vida. Sou a construção de tudo aquilo que vivencio. Este trabalho reflete os sonhos de uma criança que queria ser cientista e que teve em sua vida pessoas que contribuíram para que isso acontecesse. Dedico este trabalho à minha família, que tanto me apoia e me guia e a todos os meus amigos. Amo todos vocês!!!!!!

AGRADECIMENTO

Agradeço especialmente a **DEUS**, que está presente em todos os momentos da minha vida, me guiando e me dando forças na minha caminhada. Obrigada por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

À minha família: meu pai **Paulo Bolin**, minha sogra **Gessy de Souza Gomes** e ao meu marido **Gean Gomes**, pelo suporte e pela força. Obrigada pela paciência, pelo amor, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim! Obrigada por me apoiarem e me darem todo o suporte que sempre precisei! Obrigada por terem feito do meu sonho o nosso sonho! Pai, obrigada por tudo, por sempre acreditar em mim, por acreditar no meu sonho e por ter investido na minha educação!

À minha mãe **Maria A. de Lourdes Molina Bolin**, que sempre foi minha fortaleza, meu amor maior, minha inspiração! Que os meus passos e minha jornada te orgulhem sempre. Saudades imensas, saudades que não cabem no peito!

À minha querida orientadora **profa. Dra. Rosemari Otton**, que me fez enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma tese, mas vidas humanas...que podemos ser tudo o que queremos...nós temos a força para sermos incríveis...Você foi mais que uma orientadora, foi conselheira, confidente, mãe e amiga. Você é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar em mim! Obrigada pelas longas horas de discussões, pela liberdade que meu deu na bancada e por todo seu comprometimento!

Aos amigos que fiz no laboratório, alguns desde o meu período de IC, pelos momentos divididos juntos, especialmente à **Rita de Cássia, Beatriz Guerra, Andrea Rocha, Natalia Molina, Marcelo Marinovic e Douglas Marin** que se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho e minha jornada. Obrigada por dividirem comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês! Quero estar com vocês durante toda minha caminhada!

Aos alunos que já passaram pelo laboratório de Fisiologia Celular e Biologia Molecular, em especial **Gustavo Tolentino**, e aos novos membros e novos amigos, **Letícia Ferreira, Fábio Lima, Alessandra Melo, Juliana Esposito, Thais Fernandes, Amaury Pinfildi e Celso Filho**. Vocês são amigos incríveis e que quero levar por toda minha vida!

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Bianco**, pela oportunidade e suporte na sua supervisão durante o meu estágio sanduíche na *Division of Endocrinology and Metabolism* na *Rush University Medical Center*, Chicago, USA (Bolsa BEPE FAPESP 2016/10114-1). Aos amigos que fiz durante esse período, que me acolheram e cuidaram de mim: **Tatiana Fonseca, Cezar Bianchi, Barbara Bocco, Gustavo Fernandes e Rodrigo Rodrigues**. Vocês são pessoas sensacionais e com certeza fizeram a diferença na minha vida! Quero ter vocês durante toda minha jornada! “*Feliz por fazer parte desse time*”!

Aos professores **Drs. Alice C. Rodrigues, William T. Festuccia e Fernanda Ortis** pelas contribuições durante o exame de qualificação. Espero que todas as sugestões tenham sido incorporadas para este trabalho final!

Aos professores **Drs. Marcelo Cristofollete, Lila M. Oyama, William T. Festuccia e Alice C. Rodrigues** pelas contribuições e sugestões para a versão final desta tese.

Ao **Departamento de Farmacologia** do Instituto de Ciências Biomédicas, **seus professores e funcionários**, pelo convívio e pela ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial as secretárias **Mônica Nunes** e **Camila Trindade** pelo impecável e exemplar trabalho.

À **Universidade Cruzeiro do Sul, Universidade Federal de São Paulo e a Universidade de São Paulo**, onde foram realizados todos os experimentos propostos neste trabalho.

Aos professores **Drs. Gisele Giannocco, Alice C. Rodrigues, Niels O. Câmara, Pedro Fernandes e Marcelo Mori** e à aluna **Marina Burgos-Silva** por toda contribuição e ajuda durante o desenvolvimento deste projeto.

À instituição de fomento **FAPESP**, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho e pela concessão da Bolsa de Doutorado (2012/20415-8) e pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE 2016/10114-1).

Aos **animais utilizados**, parte fundamental deste trabalho, obrigada pela sua contribuição na ciência.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!!!!

*“Quando a alma está feliz, a prosperidade cresce,
a saúde melhora, as amizades aumentam,
enfim, o mundo fica de bem com você! O mundo
exterior reflete o universo interior.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

BOLIN, A.P. **Investigação do potencial termogênico e metabólico da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos - repercussão sistêmica do fenótipo bege.** 2018. 105f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O desenvolvimento de adipócitos termogênicos/bege no tecido adiposo branco (TAB) pode reduzir os efeitos adversos da obesidade e melhorar a saúde metabólica. Certos agentes farmacológicos e nutricionais podem promover esses efeitos ativando fatores de transcrição ou vias regulatórias, promovendo o *browning* do TAB. Como suplemento nutricional ou dietético, os compostos presentes no chá verde (CV) têm demonstrado fortes correlações entre o metabolismo energético e a perda de peso corporal (PC), no entanto, sua potencial contribuição para o desenvolvimento de células termogênicas/bege foram fracamente investigadas. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a relação entre as alterações metabólicas induzidas por uma dieta obesogênica e a indução de células termogênicas/bege em camundongos obesos tratados com CV. Além disso, foi avaliado o efeito de uma mistura contendo as principais catequinas do CV (EGCG (2 μ M), EGC (1 μ M), ECG (0,6 μ M) e EC (0,4 μ M)) (Sigma) em uma concentração final de 4 μ M e o extrato de CV a 0,19% na indução de fenótipo bege *in vitro* (pré-adipócitos 3T3-F442A). Camundongos induzidos à obesidade (dieta de cafeteria/16 semanas) e tratados com CV (500 mg/kg de PC) durante 12 semanas mostraram uma redução significativa nos indicadores de obesidade, ganho de peso, depósitos de gordura, hiperlipidemia e incremento nos níveis plasmáticos de adiponectina sem alteração na ingestão alimentar. A taxa metabólica basal foi aumentada, assim como, os genes envolvidos na oxidação de AG, termogênese e marcadores de células bege no TA subcutâneo de animais obesos tratados com CV. O CV também diminuiu a inflamação e o estresse de retículo endoplasmático induzido pela dieta e a resistência à insulina (RI). É sugerido pela primeira vez que o tratamento com CV induz um ciclo fútil que envolve a *de novo* lipogênese para ativação da via termogênica *in vivo* e *in vitro*. A mistura de catequinas e o extrato de CV demonstraram redução significativa no acúmulo de lipídios, além de induzir a expressão de marcadores termogênicos relacionados à oxidação de AG e ativação mitocondrial, bem como o consumo de oxigênio. O efeito termogênico do CV e do mix de catequinas ocorre de maneira autônoma e dependente da modulação temporal de fatores adipogênicos como o PPAR γ . Nosso estudo sugere que as alterações metabólicas promovidas pela ingestão de CV induzem o gasto energético e comprometem o destino final da célula adiposa, ainda em etapas iniciais do processo de adipogênese, com modulações que envolvem a via do PPAR γ , associado à ativação de um ciclo fútil e indução do fenótipo bege. Essas alterações culminam em uma estratégia terapêutica eficiente de combate à obesidade e suas co-morbidades.

Palavras-chave: Catequinas. Chá verde. Gasto energético. Obesidade. Tecido adiposo.

ABSTRACT

BOLIN, A.P. **Investigation of the thermogenic and metabolic potential of the *Camellia sinensis* plant in obese mice - systemic repercussion of the beige phenotype.** 2018. 105p. Thesis (Ph. D. thesis in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The development of thermogenic/beige adipocytes in white adipose tissue (WAT) might reduce the adverse effects of obesity and could help to improve metabolic health. Certain pharmacological and nutritional agents can promote those effects by activating transcription factors or regulatory signaling pathways furthering WAT browning. As a nutritional or dietary supplement, compounds present in green tea (GT) has demonstrated remarkable correlations between energy metabolism and body weight (BW) loss, however, their potential contributions to the development of thermogenic/beige cells have been scarcely investigated. The aims of this study were to evaluate the relationship between metabolic alterations induced by an obesogenic diet and the induction of thermogenic/beige cells in GT-treated obese mice. We also evaluated the effect of a mix containing the main catechins found in GT (EGCG (2 μ M), EGC (1 μ M), ECG (0.6 μ M) and EC (0.4 μ M)) (Sigma) in a final concentration of 4 μ M and a GT extract at 0.19% in the induction of beige phenotype *in vitro* (3T3-F442A pre-adipocytes). Obesity-induced mice (cafeteria diet/16 weeks) that were treated with GT (500 mg/kg of BW) for 12 weeks showed a significant reduction in indicators of obesity such as BW gain, fat depots, hyperlipidemia and an increment in plasma adiponectin levels without alteration in food intake. The basal metabolic rate was increased as well as genes involved in FA oxidation, thermogenesis and beige cells markers in the subcutaneous AT of obese animals treated with GT. GT also decreased inflammation and endoplasmic reticulum stress induced by the diet and relief insulin resistance (IR). It is suggested for the first time that the treatment was able to induce a futile cycle through *de novo* lipogenesis to activate the thermogenic pathway *in vivo* and *in vitro*. The mix of catechins or the GT showed significant reduction of lipid accumulation and upregulated the expression of thermogenic markers related to FA oxidation and mitochondrial activation, as well as, oxygen consumption. The effects of GT and the mix of catechins occur in an autonomous manner and seems to be dependent on initial mechanism in adipogenesis through PPAR γ participation. Our study suggest that the metabolic alterations caused by GT ingestion induce energetic expenditure and compromise the final commitment of adipose cell, still in the initial stages of the adipogenesis process, with modulations involving the PPAR γ pathway, associated to the activation of the futile cycle and induction of beige phenotype. These alterations culminate in an effective therapeutic strategy to combat obesity and its comorbidities.

Keywords: Catechins. Green Tea. Energy expenditure. Obesity. Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenciação de adipócitos <i>in vivo</i>	26
Figura 2 - Metabolismo lipídico e mobilização de AG controlada pelo TA.....	29
Figura 3 - Contribuição da linhagem Myf5 para o compartimento celular do precursor de adipócitos	33
Figura 4 - Desenvolvimentos dos diferentes tipos de adipócitos	35
Figura 5 - Reguladores transcricionais de adipócito bege e marrom	36
Figura 6 - Sinalização e ativação aguda da termogênese dependente de UCP-1	39
Figura 7 - Fatores indutores de adipócitos marrom e bege	41
Figura 8 - Estrutura geral dos flavonóides	45
Figura 9 - Estrutura química das principais catequinas encontradas no CV	46
Figura 10 - Efeito dos polifenóis presentes no CV na saúde	49
Figura 11 - Proporção dos ingredientes utilizados na preparação da dieta de cafeteria (A) e foto da preparação da ração (B)	56
Figura 12 - Design Experimental <i>in vivo</i>	57
Figura 13 - Design experimental <i>in vitro</i>	62
Figura 14 - Efeito agonista sobre o PPAR γ exercido pelos compostos do extrato de CV após o período de diferenciação	63
Figura 15 - Efeito agonista do PPAR γ dos compostos do extrato de CV na etapa inicial da adipogênese	64
Figura 16 - O extrato de CV reverte os marcadores de obesidade	77
Figura 17 - O extrato de CV não interfere com a ingestão alimentar	78
Figura 18 - A tríade RI x inflamação x ERE induzido pela dieta é revertida pelo extrato de CV	79
Figura 19 - O extrato de CV induz aumento no gasto energético em camundongos obesos.....	80
Figura 20 - O extrato de CV previne o whitening do TAM e induz genes termogênicos no TAB subcutâneo de camundongos obesos.....	81
Figura 21 - As catequinas do extrato de CV induzem ciclo fútil <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	82
Figura 22 - As catequinas do extrato de CV induzem o consumo de oxigênio <i>in vitro</i> e modulam parâmetros iniciais da adipogênese.....	83
Figura 23 - Mecanismo proposto para indução de adipócitos bege pelos polifenóis do CV ..	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição energética da dieta de cafeteria	56
Tabela 2 - Sequência dos nucleotídeos dos primers utilizados	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

67LR	<i>Receptor de laminina 67 kDA</i>
Acetil-CoA	<i>Acetilcoenzima A</i>
ACC	<i>Acetilcoenzima A carboxilase</i>
ADP	<i>Adenosina difosfato</i>
AG	<i>Ácido graxo</i>
AGL	<i>Ácido graxo livre</i>
AgRp	<i>Agouti-related protein</i>
AST	<i>Aspartato aminotransferase</i>
ALT	<i>Alanina aminotransferase</i>
ATP	<i>Trifosfato de adenosina</i>
AMPc	<i>Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico</i>
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
BMP7	<i>Bone Morphogenetic Protein 7</i>
BMP8b	<i>Bone Morphogenetic Protein 8b</i>
CEA	<i>Coeficiente da eficácia alimentar</i>
C/EBP$\alpha/\beta/\delta$	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins $\alpha/\beta/\delta$</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
COMT	<i>Catecol O-Metiltransferase</i>
CPCC	<i>Ganho de peso por consumo calórico</i>
CV	<i>Chá verde</i>
Dio2	<i>Tiroxina 5'-deiodinase tipo 2</i>
DNMTs	<i>DNA metiltransferases</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DM2	<i>Diabete Mellitus do tipo 2</i>
DEPC	<i>Diethyl dicarbonate</i>
EBF2	<i>Early B-Cell Factor 2</i>
EC	<i>Epicatequina</i>
ECG	<i>Epicatequina galato</i>
EGC	<i>Epigallocatequina</i>
EGCG	<i>Epigallocatequina-3- galato</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
En1	<i>Engrailed-1</i>
ERE	<i>Estresse de retículo endoplasmático</i>
EROS	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>
FGF	<i>Fator de crescimento de fibroblastos</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
GABA-A	<i>Ácido gama-aminobutírico A</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
GTT	<i>Teste de Tolerância à glicose</i>
H₂O₂	<i>Peróxido de hidrogênio</i>

HDACS	<i>Histona deacetilases</i>
HE	<i>Hematoxilina e eosina</i>
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>
IGF-1	<i>Fator de crescimento semelhante a insulina I</i>
IκB-α	<i>NF-kappa-B inhibitor alpha</i>
IL-1β	<i>Interleucina-1β</i>
IL-1	<i>Interleucina-1a</i>
IL-4	<i>Interleucina-4</i>
IL-5	<i>Interleucina-5</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-13	<i>Interleucina-13</i>
IL-33	<i>Interleucina-33</i>
ILC2	<i>Type-2 innate lymphoid cells</i>
InsR	<i>Insulin receptor</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
<i>K_{itt}</i>	<i>Taxa de decaimento da glicose</i>
IMC	<i>Índice de massa corpórea</i>
ITT	<i>Teste de Tolerância à Insulina</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
M1	<i>Macrófagos do tipo 1</i>
MCP1	<i>Proteína quimioatraente monocitária 1</i>
MRP2	<i>Proteína associada a resistência de múltiplas drogas do tipo 2</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
Myh11	<i>Myosin Heavy Chain 11</i>
PAI-1	<i>Inibidor do Ativador de Plasminogênio tipo 1</i>
PAX7	<i>Paired box protein7</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFRα	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PF	<i>Peso final (g) do animal</i>
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 -alpha</i>
PI	<i>Peso inicial (g) do animal</i>
PIB	<i>Produto interno bruto</i>
PKA	<i>Proteína quinase A</i>
PPARα	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha</i>
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PPREs	<i>Elemento responsivo a PPAR</i>
POMC	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
PRDM3	<i>Positive regulatory domain zinc finger protein 3</i>
PRDM16	<i>Positive regulatory domain zinc finger protein 16</i>

NA	<i>Noradrenalina</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
RER	<i>Respiratory exchange ratio</i>
RI	<i>Resistência à insulina</i>
RXR	<i>Receptor retinóico X</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
SFB	<i>Soro fetal bovino</i>
SIRT1	<i>NAD-dependent deacetylase sirtuin-1</i>
SNA	<i>Sistema nervoso autônomo</i>
SNC	<i>Sistema nervoso central</i>
SNS	<i>Sistema nervoso simpático</i>
O-GlcNAc	<i>O-linked N-acetylglucosamine</i>
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element-binding proteins 1c</i>
T3	<i>Triiodotironina</i>
T4	<i>Tiroxina</i>
TA	<i>Tecido adiposo</i>
TAB	<i>Tecido adiposo branco</i>
TAM	<i>Tecido adiposo marrom</i>
TBX15	<i>Fator de transcrição Tbx15 (T-box 15)</i>
TG	<i>Triglicerídeos</i>
TID	<i>Termogênese induzida pela dieta</i>
TLE3	<i>Transducin-like enhancer of split 3</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
Tnf-α	<i>Tumor necrosis fator alpha</i>
TR	<i>Receptor de hormônio tireoideano</i>
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
VEGF-A	<i>Fator de crescimento vascular endotelial - A</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VO₂	<i>Consumo de oxigênio</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Tecido Adiposo: Conhecendo os diferentes depósitos e suas principais funções	26
2.2 Adipogênese de adipócitos termogênicos	32
2.3 Termogênese do TA	37
2.4 Componentes envolvidos na indução da termogênese	39
2.5 Alimentos funcionais na obesidade – conhecendo a planta <i>Camellia sinensis</i> ..	43
2.6 Ação biológica dos compostos polifenólicos da planta <i>Camellia sinensis</i> – sua utilização como alimento funcional no manejo da obesidade	48
3 OBJETIVOS.....	52
3.1 Objetivos específicos	53
3.1.1 Avaliação dos efeitos metabólicos do tratamento com o extrato de CV em camundongos alimentados com dieta de cafeteria	53
3.1.2. Caracterização do perfil fenotípico e genotípico dos adipócitos de animais tratados com o extrato de CV e induzidos a obesidade	53
3.1.3. Avaliar o efeito do extrato de CV e do mix de catequinas sobre a identidade de adipócitos em experimentos <i>in vitro</i>	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Animais	55
4.2 Indução à obesidade e suplementação com CV – Design experimental	55
4.3 Grupos experimentais	58
4.4 Taxa de metabolismo basal	58
4.5 Exposição ao frio	58
4.6 Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar	59
4.7 Avaliação do índice de adiposidade, histologia do TA e tamanho dos adipócitos	59
4.8 Análises plasmáticas	60
4.9 Glicemia de jejum, Teste de Tolerância à glicose (GTT), Teste de Tolerância à Insulina (ITT), taxa de decaimento da glicose (K_{ITT}) e índice HOMA	60
4.10 Cultivo Celular e diferenciação celular	61
4.11 Consumo de oxigênio	62
4.13 Avaliação do papel agonista dos compostos presentes no extrato de CV sobre o PPAR γ	63
4.14 Extração, Quantificação do RNA total e Reação de RT (reverse transcriptase) ..	64
4.15 RT-qPCR	65
4.16 Análise estatística	67
5 RESULTADOS.....	68
5.1 O extrato de CV reverte os marcadores de obesidade	69
5.2 O Extrato de CV não interfere com a ingestão alimentar	69

5.3 A tríade RI × inflamação × estresse de retículo endoplasmático (ERE) induzida pela dieta é revertida pelo extrato de CV	70
5.4 O extrato de CV induz o aumento no gasto energético em camundongos obesos	71
5.5 O extrato de CV previne o <i>whitening</i> do TAM e induz genes termogênicos no TAB subcutâneo de camundongos obesos	72
5.6 As catequinas presentes no extrato de CV induzem um ciclo fútil <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	73
5.7 As catequinas do CV induzem o consumo de oxigênio <i>in vitro</i> e modulam parâmetros iniciais da adipogênese	74
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIA*	94

1INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada hoje como uma epidemia do século 21 (Risk Factor Collaboration, 2016) e vem sendo descrita como uma “Nova Síndrome Mundial” (Burkert *et al.*, 2013). Desde 1987, o NIH (*National Institutes of Health*) tem utilizado o índice de massa corpórea (IMC) ($\text{peso (kg)} / (\text{altura}^2 \text{ (m)})$) para definir obesidade e sobrepeso. Indivíduos são considerados obesos se o IMC for maior que 30, e apresentam sobrepeso se o mesmo estiver entre 25 e 30. O IMC serve, verdadeiramente, como uma ferramenta de triagem e não de diagnóstico de saúde. Além do IMC, a avaliação da distribuição da circunferência abdominal e a porcentagem de gordura corporal podem fornecer informações adicionais para se determinar o risco de saúde. Hoje se sabe, que o risco de doenças cardiometabólicas (doenças coronarianas, hipertensão, Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2)) está aumentado em pacientes com IMC normal e que apresentam a medida de circunferência abdominal maior que 102 cm para homens e 89 cm para mulheres (Mcshea, 2017).

Apesar de décadas de esforços para retardar o progresso da epidemia, em 2016, mais de 1,9 bilhões de pessoas, acima de 18 anos, apresentavam sobrepeso e mais de 650 milhões eram obesas (World Health Organization, 2017). Esta prevalência se traduz em um custo global de saúde equivalente a 2,8% do produto interno bruto (PIB) mundial, ou aproximadamente US\$ 2 trilhões. Além do excesso de despesas com cuidados de saúde, a obesidade também impõe custos sob a forma de perda de produtividade e perda de crescimento econômico como resultado de dias de trabalho perdidos, menor produtividade no trabalho, mortalidade e incapacidade permanente (Tremmel *et al.*, 2017).

A obesidade é caracterizada por um aumento da deposição de gordura. De acordo com uma visão simplista, está baseada na primeira lei da termodinâmica e resulta de um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético. De acordo com essa visão, a obesidade é o resultado de baixa atividade física (estilo de vida sedentário) e aumento no consumo de alimentos ricos em energia, que ultrapassa as necessidades diárias do indivíduo. No entanto, sua etiologia é mais complexa. De fato, circunstâncias como o *status* socioeconômico, o ambiente e o comportamento pessoal, além das interações genótipo-fenótipo, têm que ser levados em consideração para se entender a obesidade, assim como estes fatores afetam a ingestão de alimentos, o *turnover* de nutrientes, a termogênese, a oxidação de ácido graxo (AG) e, também, o armazenamento diferencial de gordura em depósitos adiposos regionais versus tecidos não adiposos (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017).

A epidemia da obesidade é acompanhada por uma miríade de riscos à saúde e está associada com diversas comorbidades, tais como a resistência à insulina (RI), DM2, doença gordurosa não alcoólica, esteatohepatite, asma, diversos tipos de cânceres, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Essas comorbidades estão relacionadas com a geração da inflamação crônica de baixo grau, característica da obesidade (Reilly e Saltiel, 2017).

Na obesidade, o gatilho inicial para o processo inflamatório pode ser resultado do estresse homeostático produzido pelo balanço energético positivo e um estado hiper-anabólico geral, particularmente nas células do tecido adiposo (TA), os adipócitos. Essas células respondem pela liberação de adipocinas (citocinas) que iniciam uma resposta inflamatória adaptativa, permitindo uma expansão saudável dos adipócitos, enquanto reduz simultaneamente o armazenamento de energia. No entanto, com a progressão da obesidade, o sistema se esforça para restaurar a homeostase, o que só pode ser realizado ao alcançar um novo limiar para os novos níveis circulantes de glicose, lipídios e hormônios, além do aumento do tônus simpático. Estas mudanças são acompanhadas da flexibilidade metabólica reduzida, RI em longo prazo e às catecolaminas, remodelação anormal do tecido e fibrose (Reilly e Saltiel, 2017).

Na obesidade, a função endócrina do TA é comprometida, o que provoca alterações metabólicas sistêmicas. Em contraste com a inflamação aguda, os sinais cardinais da "inflamação", como edema, calor, rubor, dor e perda da função, raramente são observados na inflamação crônica. Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias como o Tnf- α (*tumor necrosis fator α*) e a interleucina 6 e 1 β (IL-6 e IL-1 β) e o desbalanço na proporção de células imunes são um mecanismo comum de inflamação aguda e crônica. A este respeito, a remodelação do tecido é uma das características histológicas da inflamação crônica, em que as células estromais mudam drasticamente o número e o tipo celular, favorecendo a presença de células imunes de caráter inflamatório como macrófagos do tipo 1 (M1), além de mastócitos, linfócitos T CD8+ e CD4+ (Reilly e Saltiel, 2017).

Apesar dos mecanismos moleculares e celulares que correlacionam as diversas patologias associadas à obesidade serem muito estudados, ainda pouco é conhecido. Aparentemente diversos fatores contribuem para o desenvolvimento desta patologia, o que a torna complexa e heterogênea, e dificulta seu estudo, diagnóstico e tratamento.

Para conter a epidemia da obesidade, estratégias individualizadas de tratamento, como modificações do estilo de vida, devem ser complementadas com abordagens e soluções mais amplas para a população, incluindo a prevenção, como por exemplo, modulações nas funções básicas dos tecidos envolvidos nessa patologia, como o TA, fígado e hipotálamo.

Até a presente data, as estratégias que visam controlar o peso corporal têm como foco principal a redução da ingestão calórica e a prevenção da absorção alimentar. O controle do peso corporal depende do equilíbrio bem regulado entre consumo de energia e gasto energético; portanto, as abordagens destinadas a aumentar o gasto energético representam-se como uma estratégia alternativa para promover a perda de peso. A termogênese sem tremor, observado em adipócitos marrons e bege, pode contribuir substancialmente para o gasto energético, e, assim, ser uma ferramenta terapêutica promissora para tratar a obesidade e doenças associadas.

Recentemente diversas moléculas e condições foram identificadas como moduladoras de diferentes vias já descritas na obesidade. Evidências emergentes sugerem que fatores dietéticos podem servir como reguladores ambientais críticos da ativação da termogênese, melhorando, assim, o metabolismo. Portanto, é oportuno questionar, por exemplo, dentre as diversas opções de compostos naturais disponíveis à população, “Quais as doses efetivas?”, “Quais são seus efeitos adversos?”, “Por qual via de sinalização ocorre a ativação termogênica?”.

Como suplemento nutricional ou dietético, o chá verde (CV) é uma bebida obtida através das folhas da planta *Camellia sinensis* que possui efeitos benéficos notáveis sobre o metabolismo energético e distúrbios relacionados a obesidade. O CV contém quantidades relativamente elevadas de polifenóis, principalmente catequinas, que apresentam diversos efeitos na saúde humana atuando em diversas funções celulares e em diferentes alvos metabólicos. Algumas das atividades antiobesidade e antidiabéticas atribuídas aos polifenóis foram associadas aos efeitos positivos no gasto energético (Mele *et al.*, 2017). Desta forma, neste estudo investigamos o potencial efeito da indução da termogênese e do fenótipo bege do TA branco (TAB) subcutâneo *in vivo* e *in vitro* pelo extrato de CV e pelas catequinas e suas consequências no metabolismo de animais induzidos à obesidade por dieta de cafeteria.

2.1 Tecido Adiposo: Conhecendo os diferentes depósitos e suas principais funções

O TA é basicamente composto de adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos (Ray *et al.*, 2016). Este tecido vem sendo cada vez mais reconhecido como um importante mediador da regulação metabólica sistêmica e desempenha um papel central na saúde, em parte, pela sua importância no controle da homeostase energética do organismo.

Embora a característica chave do TA seja o armazenamento de energia na forma de gotículas lipídicas, nem todos os depósitos de gordura são originados da mesma forma. Pelo menos 17 tipos de depósitos de gordura que carregam diferentes adipócitos são reconhecidos (Walden *et al.*, 2012). No entanto, tradicionalmente, os adipócitos são divididos em dois tipos: adipócitos brancos presentes no TAB, que é o principal local de armazenamento de energia e, adipócitos marrons presentes no TA marrom (TAM) (**Figura 1**), estes últimos dedicados a termogênese e ao gasto de energia em virtude da expressão da proteína UCP1 (*Uncoupling Protein-1*). Mais recentemente, foi descrito um terceiro tipo de adipócito, chamado de bege ou “brite” (*brown-in-white*), que compartilha muitas características com o adipócito marrom clássico, como o alto conteúdo mitocondrial e a expressão de UCP1 (Rosenwald e Wolfrum, 2014).

Figura 1 - Diferenciação de adipócitos *in vivo*.

Histologia do adipócito branco, bege e marrom obtidas de camundongos (10x de magnitude). Fonte: Rodriguez *et al.* (2015).

Os adipócitos brancos possuem uma única e grande gota lipídica, poucas mitocôndrias, baixa taxa oxidativa, minúsculo citoplasma e são produtoras de adipocinas. Podem apresentar um tamanho variável entre 25-200 μm e são encontrados, principalmente, nos depósitos de TAB, que constituem a massa adiposa mais predominante na maioria dos animais. Sua principal função é a alta capacidade de armazenamento de energia sob a forma de triglicerídeos (TGs), respondendo rapidamente e de forma dinâmica a alterações de privação e excesso de nutrientes por meio da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, cumprindo assim um papel importante na homeostase energética (Tan e Vidal-Puig, 2008) e, consequentemente da RI, DM2 e doenças cardiovasculares.

Os depósitos de TAB subcutâneo e visceral apresentam contribuições diferentes para o metabolismo energético. Em primeiro lugar, o perfil de secreção de citocinas do TAB visceral e subcutâneo diferem entre si. Por exemplo, a expressão e secreção de IL6 e PAI -1 (Inibidor do Ativador de Plasminogênio tipo 1) são maiores no TAB visceral, enquanto a leptina e a adiponectina são maiores no TAB subcutâneo (Kershaw e Flier, 2004). Em segundo lugar, as adipocinas produzidas pelo TAB subcutâneo são secretadas na circulação sistêmica, enquanto as produzidas pela TAB visceral são secretadas no sistema portal, tendo assim um impacto mais direto no metabolismo energético hepático. Em terceiro lugar, a taxa de lipólise e mobilização de AGs também é diferente, o TAB visceral parece ser mais sensível aos efeitos lipolíticos das catecolaminas e menos sensível aos efeitos antilipolíticos da insulina, que mobiliza AGs na veia porta. Considera-se que estas diferenças são possivelmente devido ao ambiente específico desses depósitos, que inclui a inervação e vasculatura própria de cada depósito (Tchkonia *et al.*, 2013).

Histologicamente o TAB subcutâneo é heterogêneo e contém adipócitos uniloculares maduros intercalados com pequenos adipócitos multiloculares, enquanto, a gordura visceral é mais uniforme e parece ser constituída principalmente de grandes adipócitos uniloculares (Tchkonia *et al.*, 2013). Portanto, o aumento da deposição de gordura subcutânea, parece proteger contra certos aspectos da disfunção metabólica, enquanto, o aumento do depósito visceral parece estar associado com complicações metabólicas e aumentar o risco de DM2, dislipidemia, doença hepática gordura não alcoólica e doença cardiovascular. Por causa disso, tornou-se popular referenciar a

gordura adiposa subcutânea como "gordura boa" e a visceral como "gordura ruim" (Hamdy *et al.*, 2006).

Fatores que controlam a mobilização de gordura (lipólise) e a síntese (lipogênese) são importantes reguladores do acúmulo de TG no TA (**Figura 2**) (Lafontan, 2008). Durante ciclos de jejum e alimentação, o metabolismo lipídico do TA é controlado por nutrientes (como carboidratos e AGs poliinsaturados) e por hormônios (como a insulina, glucagon e as catecolaminas). A interação normal desses fatores é essencial para manter a homeostase adiposa.

Uma das principais funções do TAB é a liberação de AGs não esterificados na circulação durante o jejum e em outros estados que demandam energia, como o exercício, para serem utilizados como fonte de ATP (Trifosfato de adenosina). A lipólise é induzida de forma aguda em jejum pela sinalização β -adrenérgica levando ao acúmulo de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e subsequente fosforilação mediada por PKA (proteína quinase A) da lipase hormônio sensível (HSL) (*Hormone-sensitive lipase*) e perilipina. O TG é, então, clivado sequencialmente por diversas enzimas, até a geração de ácido graxo livre (AGL) e glicerol, que são liberados para fornecer as necessidades energéticas de outros tecidos. AGLs e glicerol são substratos para a cetogênese e a gliconeogênese no fígado, respectivamente, enquanto o AGL também é utilizado pelo músculo esquelético e coração como uma fonte de energia (Duncan *et al.*, 2007).

A lipogênese, por outro lado, é o processo que abrange a síntese de AG a partir de acetilcoenzima A (acetil-CoA). A glicose fornece seu próprio metabólito acetil-CoA como substrato para a síntese de novos AGs e induz, de maneira indireta, a expressão da acetil-CoA carboxilase (ACC), a enzima limitante da via, além de estimular a liberação de insulina pancreática que promove a lipogênese. Como resultado, a insulina estimula a absorção de glicose nos adipócitos e ativa as enzimas glicolíticas e lipogênicas e estimula a expressão de SREBP1 (*Sterol regulatory element-binding proteins 1c*) que controla a expressão dos genes necessários para a síntese de colesterol, AG e de fosfolipídios (Luo e Liu, 2016). Além do SREBP1, o fator transcricional ChREBP (*Carbohydrate response element binding protein*) promove a expressão de genes envolvidos na *de novo* lipogênese. Contudo, em condições normais, a *de novo* lipogênese é relativamente baixa no TAB em comparação com o

fígado e TAM em roedores, e ainda mais baixo em seres humanos (Swierczynski *et al.*, 2000).

Figura 2 - Metabolismo lipídico e mobilização de AG controlada pelo TA

As vias lipogênica e lipolítica são sensíveis à nutrição, bem como hormônios como insulina, norepinefrina e glucagon. Assim, é necessária uma regulação sutil de lipogênese e lipólise para homeostase de energia sistêmica e sensibilidade à insulina. Fonte: Luo e Liu (2016).

Além da sua principal função de armazenar energia sob a forma de TGs, o TA exerce uma atividade endócrina ativa e produz uma variedade de moléculas químicas. A multiplicidade de adipocinas, identificadas nas últimas duas décadas influenciam essencialmente todos os sistemas orgânicos e medeiam efeitos fisiológicos sobre o metabolismo, a imunidade, o comportamento, a função cardiovascular e a reprodução, muitas vezes com relevância em diversas patologias (Fasshauer e Bluher, 2015). A adiponectina e a leptina são as adipocitocinas mais abundantes produzidas pelos adipócitos. A leptina foi descoberta no TA em 1994, seguida pela clonagem da adiponectina em 1995 (Zhang *et al.*, 1994; Scherer *et al.*, 1995). Muitas outras adipocinas, incluindo resistina, chemerina, apelina, visfatina, PAI-1, proteína quimioatraente monocitária 1 (MCP-1), TNF- α e IL-6 apresentam papéis fundamentais

na função endócrina do TA regulando o metabolismo sistêmico e a inflamação (Luo e Liu, 2016).

Um excelente exemplo de como a expressão aberrante de adipocinas contribui para a patogênese da obesidade é dado pela adiponectina e pela leptina. A adiponectina promove a sensibilidade à insulina sistêmica e melhora o metabolismo de glicose e lipídios no fígado e músculo, bem como a função endócrina pancreática (Stern *et al.*, 2016). Os níveis de adiponectina são reduzidos na obesidade e mostram uma correlação inversa notável com a RI e o DM2 em humanos (Fasshauer e Bluher, 2015). Assim, a perda de efeitos protetores da adiponectina é um importante fator patogênico na obesidade. Por outro lado, a leptina apresenta níveis aumentados na obesidade, e seus efeitos protetores são dificultados pela resistência à sua sinalização no sistema nervoso central (SNC). Embora os efeitos mais potentes da leptina sejam mediados pela regulação da ingestão de alimentos e do gasto energético no SNC, ela modula o metabolismo lipídico e a sensibilidade à insulina em vários tecidos, diretamente ou através do SNC (Stern *et al.*, 2016).

Diferentemente dos adipócitos brancos citados anteriormente, os adipócitos marrons são células que apresentam inúmeras gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos e apresentam um tamanho médio de 30-40 μm de diâmetro. Apresentam citoplasma relativamente abundante e muitas mitocôndrias que liberam calor por meio da oxidação de AG através da ativação da proteína UCP-1 (Cannon e Nedergaard, 2004).

Em roedores, os depósitos de TAM podem ser encontrados na região interescapular, localizada entre os ombros e, em menor grau, nas regiões perirrenal e axilares. Nos seres humanos, o TAM é encontrado na região cervical de lactentes - (Sidossis e Kajimura, 2015), na área supraclavicular e na área perirrenal. Quando a termogênese é ativada, os depósitos de TAM aumentam através de processos hipertróficos e hiperplásticos (Cannon e Nedergaard, 2004).

Com alguma semelhança com adipócitos brancos anos atrás, praticamente até os tempos atuais, o adipócito marrom foi considerado apenas como célula produtora de calor. No entanto, evidências recentes sugerem a necessidade de mudar esse conceito para incorporar o reconhecimento de um papel endócrino específico ao TAM (Villarroya *et al.*, 2013). Classicamente, o único papel endócrino reconhecido do TAM é a sua capacidade de liberar o hormônio tireoidiano ativo triiodotironina (T3), devido

a presença da enzima tiroxina 5'-deiodinase tipo 2 (Dio2), que é fortemente ativa durante a atividade termogênica do tecido (De Jesus *et al.*, 2001).

Hoje se sabe que durante o desenvolvimento ou recrutamento do TAM em resposta à ativação termogênica alguns fatores são liberados por ele, que incluem: o fator de crescimento vascular endotelial - A (VEGF-A), que possivelmente favorece a angiogênese em resposta à ativação/vascularização simpática (Asano *et al.*, 1999), o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e o fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), o que pode aumentar o número de células precursoras de adipócitos marrons (Wang *et al.*, 2015). Em geral, a expressão de citocinas pró-inflamatórias é menor no TAM do que no TAB, possivelmente devido ao fenótipo de células imunes infiltradas. No entanto, a IL-1a e especialmente a IL-6 são expressas e liberadas pelos adipócitos marrons em resposta a estímulos termogênicos (Burysek e Houstek, 1997). Apesar do fígado ser o principal sítio produtor de FGF-21 sob condições basais, o TAM durante a ativação termogênica induz uma alta expressão desse fator (Hondares *et al.*, 2011) e contribui para a ativação do gasto energético.

Hoje se sabe que a ativação termogênica sustentada e fatores químicos liberados por diferentes tecidos, leva ao escurecimento do TAB e, células semelhantes aos adipócitos marrons aparecem nos depósitos de TAB. Essa descoberta se deu a partir de avanços notáveis à respeito de ilhas de adipócitos no TAB que apresentavam um fenótipo marrom, e, que a exposição ao frio ou estimulação adrenérgica era capaz de induzir a expressão de UCP1 nessas ilhas (Cousin *et al.*, 1992). Desde então, surgiu o conceito de escurecimento do TAB e a literatura sobre o assunto aumentou consideravelmente em função do potencial terapêutico destas ilhas.

Morfológica e funcionalmente diferentes dos adipócitos brancos, os adipócitos beges foram recentemente confundidos com células adiposas marrons, pois também apresentam múltiplas gotas lipídicas, um número elevado de mitocôndrias, além de expressarem um conjunto de genes comumente presentes no adipócito marrom. Apesar de apresentarem características similares entre si, como uma termogênese eficiente, adipócitos beges e marrons tem algumas características distintas, principalmente dadas às suas origens progenitoras e aos sinais necessários para a sua ativação/diferenciação, as quais as levam a serem consideradas tipos distintos de células (Rosen e Spiegelman, 2014).

2.2 Adipogênese de adipócitos termogênicos

Os adipócitos são pós-mitóticos e, como resultado, a hiperplasia do TA requer proliferação e diferenciação de células precursoras de adipócitos para formar novos adipócitos maduros durante o desenvolvimento e ao longo da vida (Wang *et al.*, 2013). Durante a diferenciação celular, certos estágios do destino das células são irreversíveis e representam um compromisso com uma determinada linhagem. Presumivelmente, esses estágios correspondem a estados distintos de heterocromatina que permitem o acesso das células a genes que regulam a identidade celular de forma coordenada. O estágio primário é a cascata de diferenciação canônica, desencadeando o comprometimento das células progenitoras mesenquimatosas, para se tornar a linhagem adiposa, isto é, os pré-adipócitos.

Adipócitos marrons clássicos são originários de uma subpopulação de dermomioblastos que também podem dar origem ao músculo esquelético. Um estudo de rastreamento de linhagem descobriu que as células que expressam En1 (*engrailed-1*) no dermomioblasto central se diferenciam para TAM, músculo esquelético e derme (Atit *et al.*, 2006). Outro estudo de rastreamento utilizando o marcador miogênico PAX7 (*Paired box protein7*), revelou que a decisão divergente do destino das células para se tornar gordura marrom ou músculo esquelético ocorre entre os dias embrionários (E) E9.5 e E11.5 durante a gestação (Lepper e Fan, 2010). Vale ressaltar que, o perfil transcricional do adipócito marrom clássico se assemelha ao miócito presente no músculo esquelético (Timmons *et al.*, 2007). Da mesma forma, o perfil proteômico mitocondrial do TAM está mais relacionado ao músculo esquelético do que ao TAB (Forner *et al.*, 2009).

O mapeamento detalhado de vários depósitos de gordura usando Myf5 (*Myogenic factor 5*) e vários outros genes específicos do músculo esquelético (MyoD e Pax3) confirmou a descoberta anterior de que as células UCP1 positivas no depósito de gordura interescapular é da linhagem Myf5 positiva e que células UCP1 positivas no TAB visceral e subcutâneo são de linhagem Myf5 negativa. A análise adicional no mesmo estudo revelou que certos depósitos (por exemplo, o depósito cervical) contêm adipócitos UCP1 positivos de origem Myf5 positivo e negativo (Sanchez-Gurmaches e Guertin, 2014b) (**Figura 3**). Portanto, embora existam alguns desentendimentos quanto à contribuição exata da linhagem Myf5-positiva e Myf5-negativa para cada grupo de adipócitos maduros, o conceito importante é que Myf5 serve apenas como

marcador de linhagem, tanto a diferenciação adipogênica como a capacidade termogênica são independentes da expressão de Myf5.

Figura 3 - Contribuição da linhagem Myf5 para o compartimento celular do precursor de adipócitos

A contribuição da linhagem Myf5 para o pool de precursores em cada depósito de gordura varia de acordo com sua localização anatômica. Adipócitos, recentemente definidos como células CD31-CD45-Terr119-CD29+CD34+Sca1+ foram determinados através de rastreamento de linhagem com camundongos Myf5-Cre, R26R-YFP. Mais de 95% dos precursores na gordura marrom são rotulados com Myf5-Cre. No TAB subcutâneo anterior (incluindo TAB interescapular e axial), quase 50% dos precursores rastreiam os precursores Myf5+ e no TAB perirrenal (um TAB visceral), os precursores Myf5 dão origem a aproximadamente 70% do grupo de células precursoras de adipócitos. Em contraste, a linhagem Myf5 contribui muito pouco para o pool de precursores de adipócitos em TAB inguinal e TAB perigonadal, que são 90-95% de Myf5 negativos. A contribuição da linhagem Myf5 para o pool de precursores adipogênicos intramuscular é muito baixa. A linha pontilhada indica a cavidade abdominal. Fonte: Sanchez-Gurmaches e Guertin (2014a).

Um trabalho recente do pesquisador Bruce Spiegelman e seu grupo mostrou que um subconjunto (10% -15%) de adipócitos bege UCP1-positivos, mas não adipócitos marrons clássicos, surge de precursores que expressam Myh11 (*Myosin Heavy Chain 11*) (Long *et al.*, 2014). Os autores forneceram 3 linhas independentes de evidências: (1) camundongos UCP1-TRAP identificaram a assinatura de genes semelhantes a músculo liso em células bege em vários depósitos de gordura branca; (2) duas abordagens de mapeamento de destino independentes mostraram que os

adipócitos bege surgem a partir de células semelhantes a músculo liso que expressam Myh11 *in vivo*; e (3) a expressão ectópica de PRDM16 (*positive regulatory domain zinc finger protein 16*) converte células do músculo liso em adipócitos UCP1-positivos *in vitro*.

O regulador transcricional PRDM16 controla como um interruptor regulatório os pré-adipócitos, sendo necessário para a diferenciação de adipócitos marrons, e sua superexpressão em precursores miogênicos induz a diferenciação de adipócitos marrons (Seale *et al.*, 2008). Surpreendentemente, a deleção desse fator nos progenitores que expressam Myf5 tem efeitos mínimos sobre o desenvolvimento embrionário do adipócito marrom (Harms *et al.*, 2014), mas resulta em comprometimento da formação de adipócitos bege em resposta à estimulação ao frio ou agonistas β 3-adrenérgicos (Cohen *et al.*, 2014). Além disso, há uma compensação por outras proteínas, incluindo PRDM3 na ausência de PRDM16 (Seale *et al.*, 2008).

O PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*) coordena a adipogênese dos três tipos de adipócitos através de interações com diferentes co-reguladores transcpcionais. O TLE3 (*transducin-like enhancer of split 3*), por exemplo, funciona como um co-ativador do PPAR γ durante a adipogênese branca. Já o fator Ebf2 (*Early B-Cell Factor 2*) pode atuar como um co-regulador da expressão gênica juntamente com PRDM16 (Lynes e Tseng, 2015) via PPAR γ . O EBF2 mostrou-se, recentemente, como um marcador de células brancas e marrons que se compromete com o destino termogênico após a diferenciação (Wang *et al.*, 2014) (**Figura 4**).

Após o comprometimento das células precursoras com uma linhagem de adipócitos, um segundo passo fundamental na formação de adipócitos maduros depende de redes de expressão gênica que completam a diferenciação de células competentes. Criticamente, a diferenciação terminal de pré-adipócitos brancos compartilha um programa comum de transcrição fundamental com a adipogênese marrom e bege que é dependente da expressão de PPAR γ e das proteínas C/EBP $\alpha/\beta/\delta$ (*CCAAT-enhancer-binding proteins $\alpha/\beta/\delta$*).

Alvos a jusante desses fatores de transcrição são fundamentais para a formação de adipócitos maduros comprometidos com a linhagem marrom, bege ou branca. O C/EBP α pode atuar sinergicamente com o PPAR γ na ativação do programa adipogênico, mas também é necessário para manter a expressão de PPAR γ . Assim, a estabilidade do programa de transcrição da adipogênese depende da regulação

cruzada entre PPAR γ e C/EBP α . Além disso, a ativação de ligantes do PPAR γ é suficiente para uma diferenciação adipogênica robusta, como evidenciado pelo acúmulo de lipídios, mudanças morfológicas, expressão de muitos genes característicos de adipócitos e suspensão do crescimento celular (Tontonoz *et al.*, 1994).

Figura 4 - Desenvolvimentos dos diferentes tipos de adipócitos

Os adipócitos branco, bege e marrom são derivados de diferentes linhagens e subpopulações de precursores e sofrem a ação de diferentes reguladores transcricionais para o direcionamento celular final. Fonte: Wu *et al.* (2015).

Outro nível de regulação da adipogênese de adipócitos marrom ou bege inclui modificação pós-traducional de fatores de transcrição, cuja atividade pode ser modulada por modificações covalentes. Este mecanismo pode ser exemplificado pelo eixo AMPK (5' AMP-activated protein kinase) - SIRT1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) - PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) (**Figura 5**) (Mele *et al.*, 2017). A desacetilação da proteína SIRT1 visa a transcrição de múltiplos fatores como PGC-1 α e FOXO1 (Forkhead box protein O1), regulando, assim, o metabolismo oxidativo e a homeostase da glicose (Rodgers *et al.*, 2005). Além do mais, a desacetilação mediada por SIRT1 de PPAR- γ favorece o recrutamento de adipócitos bege no TAB (Qiang *et al.*, 2012). A AMPK é ativada por

fosforilação e funciona como um sensor energético nas células e sua ativação em órgãos metabólicos, incluindo o fígado, músculo esquelético e TAB, inibe o anabolismo e, promove os processos catabólicos. Portanto, evidências apoiam um papel para o eixo AMPK-SIRT1-PGC1 α em adipócitos marrom e bege, visto que a ativação do TAM é frequentemente associada com aumento da fosforilação de AMPK, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mulligan *et al.*, 2007) e sua deleção, especificamente, em adipócitos foi associada com uma redução na termogênese (Mottillo *et al.*, 2016).

Figura 5 - Reguladores transcricionais de adipócito bege e marrom

Fonte: Mele *et al.* (2017). Vide texto para maiores detalhes.

A coexistência de um processo alternativo de transdiferenciação de adipócitos brancos em adipócitos beges foi suportado a partir de um elegante ensaio *in vivo* através de um estudo de rastreamento de linhagens em camundongos transgênicos e através de células com marcadores fluorescentes transitórios e permanentes (Rosenwald *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que os adipócitos bege no TAB inguinal que surgiram de células precursoras durante a adaptação ao frio, eram capazes de perder a sua morfologia e obter perfis de expressão de genes brancos após um período de adaptação em temperaturas quentes. Extraordinariamente, as mesmas células eram capazes de recuperar sua morfologia multilocular e a expressão de genes específicos de adipócitos bege após um segundo período de adaptação ao frio, em um processo que se assemelha a transdiferenciação. Em conjunto, a *de novo*

diferenciação e a transdiferenciação podem coexistir e são processos independentes do tempo (Rosenwald *et al.*, 2013).

Mais evidências para a coexistência de ambos os conceitos de plasticidade de adipócitos foram fornecidas pela identificação de uma população de células precursoras de adipócitos que expressam o PDGFR α (*platelet-derived growth factor receptor α*) e podem diferenciar-se em adipócitos bege ou branco. Especificamente, essas células precursoras bipotenciais desenvolveram-se em adipócitos bege sob estímulo de agonistas dos receptores β 3-adrenérgicos ou em adipócitos brancos em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura. Surpreendentemente, mais um conjunto distinto de precursores de adipócitos bege foi identificado no músculo esquelético. Schulz *et al.* (2011) demonstraram que uma população celular do estroma vascular (Sca1+ CD45– Mac1–) isolada do TAB ou do músculo pode se diferenciar em adipócitos que expressam UCP-1 após a exposição a proteína BMP7 (*Bone morphogenetic protein 7*).

2.3 Termogênese do TA

O TAM está fisiologicamente envolvido com o controle térmico de longo prazo, protegendo os mamíferos da hipotermia e participando da produção de calor que não envolve o tecido muscular, conhecida como termogênese sem tremor (*non-shivering thermogenesis*). Conforme já detalhado, o TAM é frequentemente considerado o órgão termogênico primário, no entanto, hoje já se fala a respeito de células bege termogênicas. Ambas as células apresentam sua função termogênica através da ativação de UCP1.

O gene da UCP1 tem uma região intensificadora complexa acima da região promotora, onde os elementos responsivos a AMPc facilitam o controle transcricional. A região contém locais de ligação para vários fatores de transcrição de receptores nucleares, incluindo PPAR γ , o receptor retinóico X (RXR) e o receptor de hormônio tireoidiano (TR), consistente com a transativação do gene *Ucp1* em resposta aos seus respectivos ligantes (Villarroya *et al.*, 2017). Além disso, o co-ativador de PPAR γ , o PGC1 α , é capaz de se ligar a complexos de PPAR α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*) ou PPAR γ e RXR, que ativam a expressão de *Ucp1* por ligação a elementos responsivos ao PPAR (PPREs) no promotor *Ucp1* (Bartelt e Heeren, 2014).

Existem dois principais reguladores do vazamento de prótons via UCP1: AGs de cadeia longa e nucleotídeos purínicos. Os AGs de cadeia longa ativam o vazamento de prótons dependente de UCP1, enquanto que os nucleotídeos purínicos citosólicos livres de Mg^{2+} (principalmente ATP e ADP (Adenosina difosfato)) são capazes de inibi-la. Apesar do fato desses reguladores terem sido estabelecidos como os principais reguladores da UCP1 desde a década de 1970, o mecanismo exato envolvido ainda é debatido ativamente. Vários mecanismos de vazamento de prótons dependente de AG através da UCP1 foram discutidos mais amplamente ao longo dos últimos anos, como os modelos de competição funcional, co-fator, *cycling* e *shuttling* de AG. De forma geral, os AGs de cadeia longa podem remover nucleotídeos, fornecer grupamentos carboxílicos para a proteína UCP1 ou atuar como carreador real de H^+ via UCP1; em todos os modelos propostos há a dissipação do gradiente de H^+ mitocondrial e a conversão da energia da oxidação do substrato em calor. Veja Crichton *et al.* (2017) para maiores detalhes.

O estímulo fisiológico clássico para a indução das vias termogênicas é a exposição prolongada ao frio. A ativação de nervos simpáticos induz liberação de noradrenalina (NA) nos terminais desses nervos. Esta catecolamina interage com seus receptores e ocasiona um aumento no segundo mensageiro AMPc, relacionado a receptores β , íons cálcio e diacilglicerol, relacionado a receptores α , que ativam vários eventos a jusante que podem ser simplisticamente divididos em duas classes. Uma delas é a regulação funcional das proteínas já expressas em adipócitos marrons, como mencionado anteriormente através da sinalização cAMP- PKA-HSL-Perilipina (**Figura 6**). A outra classe de eventos ocorre através da regulação da expressão gênica. Por exemplo, o aumento do TAM é observado em animais experimentais submetidos ao frio devido a um aumento no número de adipócitos marrons maduros (Bukowiecki *et al.*, 1982). Estes resultados indicam que a estimulação pelo frio, por exemplo, induz uma série de mudanças na expressão de genes que são necessárias para a proliferação e diferenciação de células precursoras de adipócitos marrons no TAM. Essas mudanças na expressão dos genes são necessárias para manter a termogênese efetiva a longo prazo (Watanabe *et al.*, 2008).

A identificação de compostos e condições diferentes da exposição ao frio que podem ser positivas na modulação de UCP1 no TAM e no *browning* do TAB e a compreensão de sua interação com os mecanismos regulatórios que controlam a UCP1 fisiologicamente, é de extremo interesse científico. A lista de substâncias

identificadas ativas neste sentido é grande e crescente, e isso inclui fatores de origem alimentar, além de agentes farmacológicos. A termogênese dependente de UCP1 inclui diferentes componentes fisiológicos, tais como: (i) a termogênese induzida pela dieta; (ii) fatores produzidos fisiologicamente que podem culminar na ativação termogênica e; fatores nutricionais (bioativos específicos) que podem impactar a UCP1 com consequências funcionais para o fenótipo do TA.

Figura 6 - Sinalização e ativação aguda da termogênese dependente de UCP-1

A proteína G α dissociada dos receptores estimulados, ativa a adenilato ciclase, aumentando o AMPc celular, o que leva a mudanças na atividade da UCP1 agudamente e através da regulação transcricional do gene *Ucp1*. Na resposta aguda, o AMPc ativa PKA, que, dentre vários alvos, fosforila a lipase HSL e a proteína perilipina, que protege a gotícula lipídica da degradação por lipase, ativando-as e desativando-as, respectivamente. A lipólise no tecido libera AGL no citosol, que atua como combustível para a oxidação mitocondrial e, como ativador direto da UCP1, induzindo a termogênese no tecido. A UCP1 pode ser inibida por nucleotídeo de purina citosólico (livre de Mg²⁺), sendo ATP e ADP os mais relevantes. Fonte: Crichton *et al.* (2017).

2.4 Componentes envolvidos na indução da termogênese

O gasto energético total de um organismo é determinado pelo tamanho do corpo, a quantidade de massa magra e massa gorda, temperatura ambiente, comportamento alimentar e estilo de vida. Pode ser dividido em três componentes: gasto energético basal, atividade física e a termogênese induzida pela dieta (TID), que por sua vez apresenta elementos obrigatório e facultativo (Westerterp, 2017). O componente obrigatório está associado ao custo de digerir e processar macronutrientes (3% do teor calórico de gorduras ingeridas, 5-10% dos carboidratos e 20-30% da proteína). O componente facultativo, corresponde ao aumento pós-

prandial do gasto energético em excesso às necessidades energéticas de processamento de alimentos. Já o componente facultativo representa em seres humanos de 30-40% da TID total, e tem sido associado à estimulação orofaríngea e parece estar sob o controle do sistema nervoso simpático (SNS) (Bonet *et al.*, 2017).

No entanto, os mecanismos do componente facultativo da TID não têm sido muito bem elucidados há anos, especialmente em seres humanos, sendo uma questão controversa, com muitos achados discrepantes na literatura (De Jonge e Bray, 1997; Granata e Brandon, 2002). Os mecanismos podem incluir o desacoplamento da respiração mitocondrial através da UCP1, a ativação de ciclos metabólicos fúteis e o deslocamento de íons através das membranas.

Na TID o elemento facultativo está diretamente implicado na regulação do balanço energético. Este é o componente que realmente dissipa energia. Um modelo para essa avaliação surgiu no final da década de 1970, chamado de “dieta de cafeteria”. Neste modelo, ratos recebiam um excesso de alimentos mistos e palatáveis ao gosto humano, apresentando hiperfagia substancial. No entanto, esses animais ganharam menos peso do que o esperado pelo conteúdo energético dos alimentos ingeridos. Isto estaria associado ao aumento da termogênese e ao recrutamento do TAM (Rothwell e Stock, 1979).

Uma ligação entre a termogênese do TAM e a obesidade foi ainda sustentada pela demonstração precoce de defeitos na atividade termorreguladora do TAM em modelos induzidos à obesidade, como camundongos *ob/ob*, o que poderia contribuir causalmente ao desenvolvimento da obesidade (Himms-Hagen e Desautels, 1978; Trayhurn e James, 1978). Mais recentemente, camundongos *knockout* para UCP1 quando submetidos a termoneutralidade (30°C para camundongos) tornaram-se obesos mesmo em uma dieta normal e mais obesos do que animais *background* de sua linhagem submetidos a dietas ricas em gordura, indicando um papel central da UCP1 na TID (Feldmann *et al.*, 2009).

A ativação da sinalização β -adrenérgica é um importante estímulo para o termogênese e indução de *browning in vivo*, no entanto, é uma estratégia que se mostrou bastante inespecífica por levar a efeitos colaterais perigosos como a taquicardia e a euforia, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (Santulli e Iaccarino, 2016). Pensando nisso, uma multiplicidade de agentes envolvidos com a ativação termogênica e indução do *browning* do TAB tem sido identificadas (**Figura 7**).

Figura 7 - Fatores indutores de adipócitos marrom e bege

Em roedores, vários tipos de células secretam fatores que regulam a atividade do adipócito marrom e bege através de atuação sistêmica, autócrina e parácrina. Os neurônios e macrófagos alternativamente ativados secretam norepinefrina; o tecido cardíaco secreta peptídeo natriurético; fígado e TAM secretam FGF21; o músculo secreta irisina e a tireoide secreta o hormônio T4 (tiroxina) (que então é convertido em T3). O TAM também produz BMP8 (*Bone Morphogenetic Protein 8b*) e VEGF, que aumentam a função termogênica de maneira autócrina. Além disso, a orexina e o BMP7 promovem o desenvolvimento de gordura marrom, mas sua fonte celular é desconhecida. Fonte: (Harms e Seale, 2013).

No que diz respeito ao SNC, o foco tem sido dado a neurônios no hipotálamo, que constitui o regulador mestre do sistema nervoso autônomo (SNA). Assim como suas funções para o equilíbrio energético, os neuropeptídeos POMC (*Pro-opiomelanocortin*) e AgRP (*Agouti-related protein*) apresentam funções opostas na indução de bege. Os neurônios POMC são capazes de promover o escurecimento do TAB (Dodd *et al.*, 2015), através de uma resposta integrada da melanocortina a fatores periféricos que transmitem o estado energético via sinalização de leptina e insulina. Entretanto, os neurônios AgRP são capazes de inibir esse processo (Ruan *et al.*, 2014) através da sinalização O-GlcNAc (*O-linked N-acetylglucosamine*) nesses neurônios para conservar a energia em resposta ao jejum. Além disso, o GLP1 (*glucagon-like peptide-1*) hipotalâmico e os neurônios de serotonina são capazes de aumentar a

captação de AG no TAB subcutâneo e manter os níveis do RNAm da *Ucp1*, respectivamente (Kooijman *et al.*, 2015; Mcglashon *et al.*, 2015).

O sistema imunológico foi recentemente implicado no escurecimento do TAB. Um estudo recente demonstrou que células ILC2 (*Type-2 innate lymphoid cells*) quando ativadas por IL-33 produzem IL-5, o que, por sua vez, ativam os eosinófilos presentes no TA para liberar IL-4. A presença de IL-4 no TA é capaz de ativar macrófagos para produzir NA, que iniciam os eventos de *browning* do TAB. Além disso, IL4 e IL-13 parecem ter propriedades diretas de escurecimento (Qiu *et al.*, 2014; Brestoff *et al.*, 2015).

Diversos hormônios circulantes secretados de vários tecidos incluindo fígado, músculo esquelético ou coração, apresentam efeitos na ativação termogênica e *browning* do TAB, enfatizando que a programação termogênica do TAB é, pelo menos em parte, mediada por uma conversa entre diversos tecidos.

A expressão de FGF21 no TAB após a exposição ao frio e ativação β 3-adrenérgica, tem sugerido um importante papel fisiológico para o FGF21 no recrutamento de adipócitos bege, captação de glicose, melhora na sensibilidade à insulina e redução do peso corporal. O exercício físico de resistência, também, está associado ao *browning* do TAB, demonstrando o papel de atividade muscular na biologia de adipócitos bege através do aumento do gasto energético pela indução de PGC1 α nas células musculares, o que corrobora com uma indução da biogênese mitocondrial e troca de tipo de fibra muscular. Além disso, o músculo é capaz de liberar o hormônio irisina que participa no *browning* do TAB (Bartelt e Heeren, 2014).

A maioria dos estudos identificou mecanismos diretos que causam o escurecimento do TAB ou ativação do programa termogênico. Os PPARs, PPAR α e PPAR γ , são capazes de induzir a formação de células beges possivelmente pela indução de irisina e pela ativação direta de elementos responsivos na região promotora ou através da estabilização da proteína PRDM16, respectivamente, (Petrovic *et al.*, 2010; Rachid *et al.*, 2015). Regulações epigenéticas como modificações no DNA, principalmente pela metilação do DNA, modificações em histonas, assim como por miRNA, também são capazes de modular a indução de células beges e do programa termogênico (Sambeat *et al.*, 2017).

Evidências emergentes sugerem que fatores dietéticos também podem servir como reguladores ambientais críticos da ativação do TAM e de adipócitos beges para ativação da termogênese (Okla *et al.*, 2017).

2.5 Alimentos funcionais na obesidade – conhecendo a planta *Camellia sinensis*

Devido a variação da eficácia, perfil de efeitos colaterais e a baixa taxa de sucesso dos medicamentos anti-obesidade utilizados na medicina tradicional atual (simpaticomiméticos, inibidores de lipases pancreáticas, ativadores de receptores GABA-A (*ácido gama-aminobutírico A*), agonistas de receptores de serotonina 2C, antagonistas opióides inibidores de re-captção de dopamina-norepinefrina, e agonistas de GLP-1) (Bessesen e Van Gaal, 2017). Há um grande interesse na busca de alimentos à base de plantas como uma nova abordagem protetora e até terapêutica para o manejo da obesidade, devido aos seus componentes bioativos e poucos efeitos colaterais.

Desde tempos remotos, diversas plantas foram usadas como medicamento para muitas doenças, e até os dias atuais são a base de um sistema de medicina tradicional em diferentes culturas (Cragg e Newman, 2013). Além disso, os compostos naturais são percebidos como seguros e aceitáveis para o paciente (Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Muitas plantas apresentam substâncias bioativas com propriedades funcionais no metabolismo, atuando no crescimento, desenvolvimento e manutenção, o que as define como alimentos funcionais. Uma variedade de alimentos está incluída nessa definição, tais como, grãos, raízes, frutos, vegetais e chás (Hasler *et al.*, 2009).

O chá é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis*, membro da família Theaceae, pode ser distinguido em três tipos que diferem entre si pelo grau de inativação das enzimas foliares durante o seu processamento. Existem duas variedades primárias da planta *C. sinensis*, *C. sinensis sinensis* que produz os chás branco, oolong, verde e preto e *C. sinensis assamica* que produz os chás oolong, preto e o pu'erh chá. A planta *C. sinensis* é um arbusto pequeno que pode expandir até 9m de altura, mas é geralmente cortado em 0,5-1,5m. Suas flores são brancas e contêm estames amarelos brilhantes. No entanto, a floração é impedida durante o cultivo, retirando-se suas folhas (Graham, 1992; Chowdhury *et al.*, 2016).

Os diferentes tipos de chá são classificados de acordo com o grau de fermentação que ocorre durante o processamento das folhas e dão origem aos 3 principais tipos de chá, chá oolong (2%), chá verde (CV) (20%) ou chá preto (78%) (Graham 1992). O CV não é fermentado; o chá oolong é semi-fermentado e chá preto é totalmente fermentado (Chan *et al.*, 2011).

Esses tipos básicos de chá apresentam diferentes características de qualidade, incluindo aparência, aroma, gosto e cor. O processo de fabricação do chá é projetado para impedir ou permitir que os compostos polifenólicos presentes sejam oxidados naturalmente pela enzima polifenol oxidase presente nas folhas da planta *C.sinensis*. O chá verde é produzido pela inativação da enzima termo-lábil polifenol oxidase nas folhas frescas aplicando calor ou vapor, o que evita a oxidação enzimática dos flavonóides presentes, as catequinas (Babu e Liu, 2008). As folhas de chá são, então, enroladas, secas e embaladas.

A composição química do CV é complexa: proteínas perfazem de 15-20% do peso seco sendo que as enzimas constituem uma fração importante; os aminoácidos correspondem a 1-4% do peso seco entre eles a teanina ou 5-N-etilglutamina, ácido glutâmico, triptofano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina e lisina são os mais abundantes; os carboidratos representam 5-7% do peso seco do extrato sendo os principais a celulose, pectinas, glicose, frutose e sacarose; os minerais e oligoelementos (5% peso seco) como cálcio, magnésio, cromo, ferro, manganês, cobre, zinco, selênio, sódio, fósforo, cobalto, estrôncio, níquel, potássio, flúor, alumínio e vestígios de lipídios (ácidos linoléico e α -linolênico), esteróis (estigmasterol), vitaminas (B, C, E), cafeína, teofilina, pigmentos (clorofila, carotenóides), e compostos voláteis (aldeídos, álcoois, ésteres, lactonas, hidrocarbonetos) (Graham, 1992).

O CV contém polifenóis, que incluem flavanóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos; estes compostos podem representar até 30% do peso seco das folhas. Os produtos derivados do CV são principalmente extratos de CV em forma líquida ou em pó que variam na proporção de polifenóis (45-90%) e no teor de cafeína (0.4-10%) (Chacko *et al.*, 2010).

A diversidade e a ampla distribuição de polifenóis nas plantas levaram a diferentes maneiras de categorizar esses compostos que ocorrem naturalmente. Os polifenóis foram classificados pela origem, função biológica e estrutura química. Além disso, a maioria dos polifenóis nas plantas existem como glicosídeos com diferentes unidades de açúcar acilados em diferentes posições no esqueleto dos polifenóis (Tsao, 2010). Os polifenóis apresentam uma estrutura contendo mais de um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel e são derivados metabolicamente do ácido chiquímico e fenilpropanóide (Robards *et al.*, 1999). Nas plantas, encontram-se armazenados nos vacúolos, no estado reduzido ou

frequentemente como heterosídeos, que não são tóxicos às plantas (Beckman, 2000).

Dentre os polifenóis presentes no CV se destacam os flavonóides, um grande grupo de metabólitos secundários. Este grupo de compostos naturais é altamente diversificado e contém vários sub-grupos. Os flavonóides (**Figura 8**) tem o esqueleto estrutural geral formado por C6-C3-C6, sendo composto por três anéis fenólicos, o anel benzeno (A) que é condensado com o sexto membro do anel C, o qual é portador de um anel fenil benzeno na segunda posição, como um substituinte em que as duas unidades C6 (anel A e anel B) são de natureza fenólica (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Figura 8 - Estrutura geral dos flavonóides

Fonte: Kumar e Pandey (2013).

Flavanols ou flavan-3-ols são comumente chamados de catequinas (**Figura 9**) e podem variar seu teor no vegetal dependendo dos fatores externos aos quais o mesmo é submetido, como o processamento das folhas antes da secagem, a localização geográfica do plantio e as condições de cultivo (Chacko *et al.*, 2010). Diferentes preparações de CV contêm quantidades variáveis de catequinas. Nos últimos anos, muitos dos efeitos benéficos à saúde do CV foram atribuídos ao seu principal componente bioativo, a epigallocatequina-3-galato (EGCG), que perfaz cerca de 50% a 80% dos polifenóis presentes no chá (Bode e Dong, 2009).

A molécula de catequina tem dois centros quirais nos carbonos 2 e 3. Portanto, possui quatro diastereoisômeros com 2 dos isômeros na configuração trans, e os outros 2 em configuração cis. Os isômeros trans e cis são referidos como catequina e

epicatequina (EC), respectivamente. Como exemplificado na **Figura 9**, as catequinas são caracterizadas pela presença dos vários grupamentos hidroxila nos anéis A e B (Babu e Liu, 2008). A EC possui um grupo orto-dihidroxila no anel B em carbono 3' e 4' e um grupo hidroxila no carbono 3 no anel C. A epigalocatequina (EGC) difere da EC, por possuir um grupo tri-hidroxila nos carbonos 3', 4' e 5' no anel B. Por sua vez, a epicatequina galato (ECG) difere da EC pela sua porção galato posicionada no carbono 3 do anel C. No entanto, a EGCG é composta de grupos tri-hidroxilas no anel B e uma porção de galato localizada no carbono 3 do anel C. Na EGCG, estes grupos tri-hidroxilas estão localizados nos carbonos 3', 4' e 5' no anel B (Yilmaz, 2006).

Figura 9 - Estrutura química das principais catequinas encontradas no CV

Fonte: Lambert *et al.* (2007).

O sabor característico do extrato de CV é feito de uma mistura de amargo, adstringente, carnudo ("umami"), doçura e ligeira acidez. Nakagawa (1970) sugeriu a importância relativa dessas cinco sensações gustativas no CV da seguinte maneira: adstringência 4.17, amargor 3.44, umami 1.42, doçura 0.53, salinidade e acidez <0.3. Além disso, seus resultados indicaram que a adstringência e amargura da infusão se

devem principalmente ao conteúdo de catequinas e por outros compostos fenólicos presentes. Alguns aminoácidos (como arginina, alanina, etc.) também contribuem para o amargor da infusão de CV. O sabor umami ocorre devido a alguns aminoácidos, como a teanina e serina, entre outros e a doçura pelos açúcares presentes (Nakagawa, 1970).

Dentre os aspectos necessários para entender a atividade biológica das catequinas, é preciso compreender sua farmacocinética. Após a ingestão, as catequinas são hidrolisadas por enzimas e pelas bactérias presentes na microflora e durante a absorção, os metabólitos são produzidos por conjugação por ação das enzimas de fase II no intestino delgado, enterócitos e fígado (Sang *et al.*, 2011).

A biodisponibilidade dos polifenóis do chá seguem a previsão da "Regra dos 5" de Lipinski" (Lipinski *et al.*, 2001). De acordo com esta regra, os compostos que têm 5 ou mais doadores de ligação de hidrogênios (grupos hidroxila (OH) e amina (NH)), 10 ou mais aceptores de ligação de hidrogênio (notavelmente nitrogênio (N) e oxigênio (O)), um peso molecular superior a 500 e logP maior do que 5 são geralmente pouco absorvidos após a administração oral. Os polifenóis de uma forma geral apresentam valores de P menores do que 5, no entanto, muitos violam essa regra (Yang *et al.*, 2008). Estudos em humanos e animais mostraram que a biodisponibilidade de EC (PM = 290 e 5 grupos fenólicos) é maior do que a da EGCG (PM = 458 e 8 grupos fenólicos) (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002).

A biodisponibilidade de muitos compostos polifenólicos é regulada por muitos transportadores de membrana, especialmente por transportadores de efluxo. A proteína associada a resistência de múltiplas drogas do tipo 2 (MRP2), localizada na superfície apical do intestino e do fígado, medeia o transporte de alguns polifenóis para o lúmen e bile, respectivamente (Jemnitz *et al.*, 2010). A EGCG e seus metabólitos, sofrem efluxo do enterócito para o lúmen intestinal, ou sofrem efluxo do fígado para a bile e são excretadas nas fezes, com pequena quantidade na urina (Monagas *et al.*, 2010).

A EGCG e outras catequinas de chá passam por uma extensa biotransformação, sendo metiladas pela COMT (Catecol O-Metiltransferase), glucuronizadas por UDP-glucuronosil transferases e sulfatadas por sulfotransferases (Sang *et al.*, 2011). Esses processos diminuem a hidrofilicidade das catequinas, promovendo a sua excreção via bile e urina e melhorando a sua absorção via difusão

passiva (Lu *et al.*, 2003). Os microrganismos presentes no trato intestinal são responsáveis por degradar as catequinas e transformá-las nos metabólitos 5- (3', 4', 5'-trihidroxifenil) - γ -valerolactona, 5- (3', 4'-di-hidroxifenil) - ϵ -valerolactona e 5- (3', 5'-di-hidroxifenil) - ϵ -valerolactona, que podem ser encontrados em amostras de urina e plasma de humanos e camundongos (Sang *et al.*, 2011). Estes compostos podem sofrer uma degradação adicional dos ácidos fenilacético e fenilpropiónico e apresentam atividades biológicas menores que os compostos originais.

Observações recentes demonstraram resultados que afastaram mitos e confirmaram os benefícios na saúde em relação ao consumo regular de CV, demonstrando que o mesmo tem propriedades funcionais e que, quando incluído na alimentação diária pode trazer benefícios fisiológicos, devido aos seus componentes (Bode e Dong, 2009).

2.6 Ação biológica dos compostos polifenólicos da planta *Camellia sinensis* – sua utilização como alimento funcional no manejo da obesidade

Atuando como alimento funcional, as catequinas do CV apresentam efeitos em diversas condições patológicas incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, hepáticas, diabetes, obesidade entre outras (**Figura 10**). Sua utilização nessas patologias se deve as suas propriedades como hipoglicemiante, anti-inflamatória, antioxidante e termogênica. Seus efeitos não são específicos, possuindo atividade pleiotrópica e os mecanismos de ação são complexos e não totalmente entendidos (Kim *et al.*, 2014).

Entre os vários benefícios do CV, uma enorme atenção foi direcionada ao seu uso para o tratamento na obesidade. Como já evidenciado pela literatura, a condição inflamatória tem se mostrado intimamente relacionada com a adiposidade excessiva, e acredita-se que o CV gere efeitos benéficos porque induz uma cadeia de eventos anti-inflamatórios. Os efeitos anti-inflamatórios do CV baseiam-se principalmente na supressão da via inflamatória mediada por NF- κ B (Ravindranath e Ravindranath, 2011). A EGCG bloqueia a fosforilação do fator nuclear I κ B- α (*NF-kappa-B inhibitor alpha*) através da quinase I κ B e consequentemente inibe o NF- κ B, além de aumentar a expressão de Tollip, um regulador negativo da via TLR (*Toll like receptors*) (Hong Byun *et al.*, 2010), reduzindo a transcrição das citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6.

Figura 10 - Efeito dos polifenóis presentes no CV na saúde

Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2014).

Nosso grupo de pesquisa, assim como outros estudos, evidenciou uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em ratos submetidos a uma dieta rica em gordura e carboidrato e suplementados com 500 mg/Kg de extrato de CV por 12 semanas. Após as 12 semanas de intervenção, observou-se uma redução das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 por linfócitos e neutrófilos, possivelmente por sua ação imunomodulatória (Molina *et al.*, 2015; Albuquerque *et al.*, 2016). Além disso, nós também observamos que as catequinas do CV, sozinhas ou em combinação, são capazes de suprimir a ativação da sinalização TLR-4/NF κ B p65 em neutrófilos humanos (Marinovic *et al.*, 2015).

Um importante mecanismo frequentemente ignorado ao considerar os efeitos biológicos dos polifenóis é a capacidade de interagir com receptores capazes de iniciar a sinalização celular. A EGCG se liga diretamente aos componentes da membrana, incluindo proteínas e lipídios e regula as atividades dos receptores do fator de crescimento da superfície celular, especialmente receptores tirosina quinase, incluindo o EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), VEGFR (*vascular endothelial growth fator*) e InsR (*insulin receptor*) (Kondo *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2006). A EGCG é capaz de aumentar a fosforilação de tirosina no InsR e IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) através de mecanismos redox, como o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Waltner-Law *et al.*, 2002).

Hoje se sabe que os polifenóis podem apresentar propriedades antioxidantes e/ou pró-oxidantes com base na sua estrutura química e no contexto redox celular. Zhou *et al.* (2017) demonstrou que o tratamento com EGCG proporciona um efeito protetor para a apoptose em células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) induzidas por angiotensina II, diminuindo o estresse oxidativo e melhorando a lesão mitocondrial. Nosso grupo, também evidenciou o papel antioxidante do extrato de CV, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e melhorando o estado redox em linfócitos de ratos induzidos a obesidade (Molina *et al.*, 2015). Por outro lado, a EGCG também apresenta propriedades oxidativas. Um dos mecanismos na promoção de citotoxicidade em células tumorais dessa catequina envolve a produção de H_2O_2 , redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} , desencadeando a reação de Fenton (Nakagawa *et al.*, 2004) e através da geração de EROs pela reciclagem redox de íons de cobre (Farhan *et al.*, 2016). Outro efeito positivo da ação oxidativa da EGCG foi observada no nematódeo *C. elegans*, em que esta catequina está envolvida com o processo de *mitohormesis* e na indução da sinalização redox, ativando a via AMPK/SIRT1/FOXO para prolongar a vida útil saudável do verme (Xiong *et al.*, 2017).

Também foi identificado um possível receptor de superfície celular para a catequina EGCG que pode mediar suas ações celulares (Tachibana *et al.*, 2004; Fujimura *et al.*, 2012). O receptor de laminina 67 kDA (67LR) é uma não-integrina de superfície celular (Menard *et al.*, 1997) que apresenta um importante papel na adesão celular para a membrana basal e a metástase de células tumorais (Tanaka *et al.*, 2000). Fujimura *et al.* (2012) evidenciou que a EGCG, mas não as outras catequinas presentes no chá, se liga diretamente a esse receptor. Nosso grupo de pesquisa evidenciou que esse receptor parece não estar envolvido com os efeitos antioxidantes das catequinas (Marinovic *et al.*, 2015). Bao *et al.* (2015) demonstrou que a EGCG suprime a indução de TLR4 e atenua a captação de glicose estimulada por insulina pela diminuição de GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) em adipócitos da linhagem 3T3-L1.

Além dos mecanismos já citados, é sugerido que muitos polifenóis exercem alguns dos seus efeitos benéficos através de remodelação da cromatina e modificações epigenéticas (Rahman e Chung, 2010). Os efeitos benéficos dos polifenóis podem estar associados à sua capacidade de modular Histona deacetilases (HDACs) e DNA metiltransferases (DNMTs), bem como outros

mecanismos epigenéticos, como a indução ou supressão de miRNA (Milenkovic *et al.*, 2013). Muitos polifenóis, assim como as catequinas, modulam a expressão de NF- κ B e a remodelação da cromatina através da regulação das HDAC e DNMTs (Rahman e Chung, 2010).

Além dos efeitos já mencionados, os polifenóis do CV, também são capazes de modular a obesidade devido aos seus efeitos no gasto energético. Os flavonóides do CV separadamente e/ou sinergicamente com a cafeína podem atuar aumentando a termogênese e a oxidação de gordura, através da modulação da NA pelo SNS, evitando, dessa forma, o aumento no tamanho e na quantidade de adipócitos, prevenindo o depósito de gordura no organismo e consequentemente regulando o peso corporal (Hursel e Westerterp-Plantenga, 2010).

Alguns estudos mostram que as catequinas desempenham um papel importante no controle do TA, principalmente pela regulação que a EGCG exerce sobre algumas enzimas relacionadas ao anabolismo e catabolismo lipídico, como a acetil-CoA carboxilase, AG sintetase, lipase pancreática, lipase gástrica e lipooxigenase (Lin e Lin-Shiau, 2006). As catequinas do CV podem inibir a COMT, uma enzima responsável pela degradação da NA, levando a inúmeros caminhos que culminam na estimulação da via lipolítica. Nosso grupo de pesquisa evidenciou que o extrato de CV estimula a oxidação de AG no TAB epididimal, através do aumento da expressão do RNAm de adiponectina e da ativação de AMPK induzindo, assim, a degradação de AG pelos processos de lipólise e oxidação (Rocha *et al.*, 2016).

Sae-Tan *et al.* (2015) demonstraram pela primeira vez a capacidade do extrato de CV descafeinado (77 mg/g por 16 semanas) em induzir a expressão de genes relacionados a conversão de adipócitos brancos do TAB em adipócitos bege, comprovando a habilidade do CV em reduzir a absorção e aumentar a termogênese. No entanto, este trabalho utilizou o TAB epididimal, um tecido em que uma pequena fração das células bege expressam UCP1. Hoje se sabe, que este tecido utiliza o ciclo fútil de creatinina como principal mecanismo de termogênese (Bertholet *et al.*, 2017). Recentemente, outro trabalho demonstrou a capacidade do CV em induzir o fenótipo termogênico no TAB (Neyrinck *et al.*, 2017). No entanto, em ambos os trabalhos não há uma investigação dos mecanismos envolvidos na ativação desse fenótipo *in vivo* e *in vitro*.

3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial efeito de indução da termogênese e do fenótipo bege no TAB subcutâneo *in vivo* e *in vitro* pelo extrato de CV e pelas catequinas e suas consequências no metabolismo de animais induzidos a obesidade por dieta de cafeteria.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Avaliação dos efeitos metabólicos do tratamento com o extrato de CV em camundongos alimentados com dieta de cafeteria

- ✓ Avaliação da composição corporal por meio da determinação do peso dos depósitos de tecido adiposo;
- ✓ Avaliação do balanço energético: ingestão alimentar semanal, modulação hipotalâmica, gasto energético por calorimetria indireta e capacidade termogênica;
- ✓ Quantificação de parâmetros bioquímicos plasmáticos;
- ✓ Determinação da tolerância à glicose e à insulina;
- ✓ Avaliação do perfil inflamatório.

3.1.2. Caracterização do perfil fenotípico e genotípico dos adipócitos de animais tratados com o extrato de CV e induzidos a obesidade

- ✓ Avaliação histológica dos depósitos de TA com o intuito de caracterizar a morfologia dos adipócitos;
- ✓ Avaliação do perfil de ERE nos tecidos envolvidos na termogênese;
- ✓ Determinação da expressão dos genes envolvidos no perfil termogênico.

3.1.3. Avaliar o efeito do extrato de CV e do mix de catequinas sobre a identidade de adipócitos em experimentos *in vitro*

- ✓ Quantificação do acúmulo de lipídios (mensuração da coloração por *Oil Red O* e mensuração do conteúdo de TG);
- ✓ Avaliação do consumo de oxigênio;
- ✓ Avaliação da expressão dos genes envolvidos na via termogênica;
- ✓ Avaliação do agonismo do PPAR γ pelas catequinas do CV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS ---

4.1 Animais

Foram utilizados nesse estudo camundongos C57Bl6 (*Mus musculus*) machos com peso inicial médio de 28 ± 2 g obtidos do biotério da Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas (Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade II (biotério de camundongos) - e com 3 meses de vida. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante as 16 semanas experimentais. Os animais foram mantidos em sala com temperatura constante de 23 ± 2 °C, sob ciclo de iluminação de 12/12 horas. Após este período, os animais sofreram eutanásia por decapitação entre 9:00 e 12:00 horas, para a posterior realização dos experimentos. O projeto foi aprovado pela comissão de ética para uso de animais em pesquisa da Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas (Protocolo nº 135/2013) e da Universidade Cruzeiro do Sul (004/2015).

4.2 Indução à obesidade e suplementação com CV – Design experimental

O modelo de indução de obesidade que mais se assemelha a grande parte da obesidade humana é o modelo de obesidade exógena, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico, através de uma sobrecarga de carboidratos ou de gordura, isoladamente ou em associação. Esta dieta é denominada dieta “ocidentalizada”, de *fast-food* ou ainda dieta de cafeteria (Cesaretti e Kohlmann Junior, 2006; Macedo *et al.*, 2012). Neste projeto a preparação da dieta de cafeteria (**Tabela 1 e Figura 11**) foi realizada em colaboração com o laboratório de Técnica Dietética e Gastronomia da Universidade Cruzeiro do Sul. A composição escolhida torna a dieta de cafeteria hipercalórica (424,64 kcal/100g) e hiperlipídica (46% Kcal/100g), quando comparada a ração padrão de roedores (288 kcal/100g e 13% Kcal/100g).

Figura 11 - Proporção dos ingredientes utilizados na preparação da dieta de cafeteria (A) e foto da preparação da ração (B)

A

B

Tabela 1 - Composição energética da dieta de cafeteria

Composição básica dos nutrientes	%Kcal/100g			
	DC	DP	DC	DP
<i>Valor Energético (Kcal/100g)</i>	424,64*	288		
<i>Proteínas (g/100g)</i>	15,44	23	15	32
<i>Carboidratos (g/100g)</i>	41,4	39,6	39	55
<i>Lipídios (g/100g)</i>	21,92	4,16	46	13
<i>Fibras, minerais, umidade (g/100g) – qsp</i>	100	100	100	100

(DC- dieta de cafeteria; DP- dieta padrão; * ↑47% vs Dieta padrão)

O estudo seguiu o *design* experimental proposto abaixo (**Figura 12**). No presente estudo os animais receberam sua respectiva dieta por 4 semanas e após esse período iniciou-se a suplementação diária (2^a a 6^a feira - entre 17 e 18h) com extrato aquoso de CV na dose diária de 500 mg/Kg de peso corporal, através de gavagem intragástrica. O período total de suplementação com extrato de CV foi de 12 semanas (3 meses). Neste período os animais foram suplementados com extrato de CV e dieta padrão ou dieta de cafeteria.

Análises feitas pelo nosso grupo demonstraram que o conteúdo total de polifenóis do extrato de CV utilizado neste estudo está em torno de 39% (392 µg/mg de extrato de CV). Análises de HPLC demonstraram que dentre os polifenóis presentes no CV o conteúdo de catequinas representa em torno de 30% (117 µg/mg). Essa análise também mostrou que a soma de EGC e EGCG contribuem com mais de 85% das catequinas totais do extrato. O conteúdo de cafeína é de 0,4% e o de quercetina está em torno de 1,5% do peso seco (Rocha *et al.*, 2016). O extrato foi pesado diariamente de acordo com os pesos corporais dos animais, e então solubilizado em água a 70°C para posterior administração intragástrica. Decorrido o período de suplementação os animais foram eutanasiados por decapitação.

Figura 12 - Design Experimental *in vivo*

A escolha da concentração do extrato de CV baseou-se no estudo de Lambert *et al.* (2003). O estudo demonstrou os parâmetros de farmacocinética da EGCG, além de demonstrar que humanos e camundongos apresentam biodisponibilidade semelhantes entre si e maiores do que ratos.

4.3 Grupos experimentais

Os animais (n=10 por grupo) foram divididos nos seguintes grupos:

- (I) Controle – Cont (dieta padrão + gavagem com água);
- (II) Obeso – OB (dieta de cafeteria + gavagem com água);
- (III) Obeso + CV - OB+CV (dieta de cafeteria + gavagem com extrato de CV).

4.4 Taxa de metabolismo basal

A taxa de metabolismo basal dos camundongos foi avaliada após 10 semanas de experimentação por calorimetria indireta de circuito aberto (Columbus Instruments, Ohio, USA, modelo Oximax) no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram aclimatados por 24h em gaiolas individuais sob ciclo de 12h claro/escuro, com água e ração *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições para o período de avaliação de 24h. Os camundongos foram submetidos ao monitoramento não-invasivo de troca gasosa e atividade física. Foram determinados os índices de consumo de oxigênio (VO₂) e troca respiratória (RER – *respiratory exchange ratio*). O deslocamento do animal foi avaliado através de sensores de luz instalados na base das gaiolas. A contribuição da oxidação de gordura para o gasto energético foi calculado utilizando-se a seguinte equação: % contribuição da gordura = $(468.6 \bullet (1 - \text{RER})) / (5.047 \bullet (\text{RER} - 0.707) + 4.686 \bullet (1 - \text{RER}))$ (Lusk, 1926).

4.5 Exposição ao frio

O experimento de exposição ao frio agudo foi realizado com camundongos individualizados em mini-isoladores, expostos por 4 horas a 6°C na câmara fria após 11 semanas experimentais, sem acesso a ração e água *ad libitum* sob ciclo claro-escuro controlado na câmara fria do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A temperatura retal dos animais foi constantemente

monitorada através do termômetro retal RET-3 (Physitemp) e ao sinal de qualquer estresse ou hipotermia, eles foram imediatamente retirados da câmara fria e colocados sobre uma placa de aquecimento à 37°C.

4.6 Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar

Durante todo o período experimental os animais foram pesados semanalmente em balança semi-analítica. A ingestão alimentar foi calculada semanalmente pela diferença entre a quantidade ofertada inicial e a quantidade restante e expressa pelo consumo total durante todo o período experimental em gramas e em Kcal. O coeficiente da eficácia alimentar (CEA) e do ganho de peso por consumo calórico (GPCC) foram calculados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{CEA} = (\text{PF} - \text{PI}) / \text{TA ingerido}$$

$$\text{GPCC} = (\text{PF} - \text{PI}) / \text{kcal ingerido}$$

onde: PF = peso final (g) do animal; PI = peso inicial (g) do animal; TA: quantidade total de alimento ingerido no período em gramas; Kcal = ingestão de calorias calculado baseado no consumo de ração.

4.7 Avaliação do índice de adiposidade, histologia do TA e tamanho dos adipócitos

Imediatamente após a eutanásia dos animais foi realizada uma laparotomia mediana para extração do TAB (epididimal e subcutâneo), TAM e fígado. Os diferentes tecidos foram pesados em uma balança analítica. Após a pesagem, os tecidos de gordura foram normalizados pelo peso do respectivo grupo e, então, foi feita a somatória do peso de cada depósito e utilizado como índice de adiposidade (IA).

Após a pesagem do TA epididimal, subcutâneo e marrom e o tecido hepático, os mesmos foram fixados em paraformaldeído a 4%. As amostras fixadas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, limpas em xileno e emblocadas em parafina. As amostras foram, então, seccionadas e os cortes histológicos (5 µm) foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica

(ProgRes, Jenoptik optical system, Germany). Para avaliação do tamanho médio do adipócito epididimal e subcutâneo, foram contadas 100 células e analisadas em microscópio óptico com objetiva graduada em escala micrométrica.

4.8 Análises plasmáticas

Aproximadamente 1mL de sangue total foi coletado em tubos EDTA-Vacutainer (5,4 mg de K₂EDTA seco por pulverização, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e centrifugado durante 10 min, 300 × g à temperatura ambiente. A fração de plasma foi removida e estocada em microtubos Eppendorf de 1,5 mL a -80 ° C para análises adicionais. Os níveis plasmáticos de ácido úrico, creatinina, Gama GT, AST (Aspartato aminotransferase), ALT (Alanina aminotransferase) e TG foram analisados utilizando-se o kit comercial de detecção obtido pela empresa Bioclin (Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, assim como para mensuração do conteúdo de AGLs no plasma (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, EUA).

O conteúdo plasmático de insulina e leptina, citocinas/quimiocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL17, IFN- γ (*Interferon gamma*), MCP-1) e adiponectina foram medidos usando os painéis de multi-analitos Milliplex MAP [Mouse Cytokine/Chemokine Panel I (Cat. No. MCYTOMAG-70K), Mouse Adipokine (Cat. No. MADKMAG-71K), Mouse Adiponectin Single Plex (Cat No. MADPNMAG-70K-01), respectivamente, (Millipore, Billerica, MA, EUA)] com base na tecnologia MAGPIX xMAP e seguindo as instruções do fabricante.

4.9 Glicemia de jejum, Teste de Tolerância à glicose (GTT), Teste de Tolerância à Insulina (ITT), taxa de decaimento da glicose (*Kitt*) e índice HOMA

A glicose em jejum dos animais foi mensurada após 15 semanas de experimentação. Os animais foram mantidos em jejum noturno de 8h e então, o sangue foi obtido através de uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal e a glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, E.U.A). O ensaio de GTT foi realizado uma semana antes da eutanásia dos animais mantidos em jejum noturno de 8h. Este teste foi realizado através de mensuração de glicose após a administração intraperitoneal de glicose (1g glicose/Kg do peso corpóreo em solução a 20% de glicose em salina 0,9%).

O teste de ITT foi realizado em animais com 6h de jejum através de mensuração de glicose após administração intraperitoneal de insulina (Humulin R, Lilly, 0,5 UI/kg de peso corpóreo). Os testes foram realizados em diferentes dias da mesma semana e as amostras de sangue foram coletadas através de uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal antes da aplicação de glicose ou insulina (tempo 0) e a 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a aplicação. A glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, E.U.A). Foi calculada a área total sob a curva (AUC) da concentração plasmática de glicose entre os grupos. A taxa de decaimento da glicose plasmática (K_{ITT}) foi calculada através do *slope* de regressão obtido pela transformação logarítmica dos valores de glicemia obtidos entre os tempos 5 e 30 min. após a administração da insulina intraperitoneal (Bonora *et al.*, 1989). O índice HOMA-IR (*homeostatic model assessment*) foi calculado através do cálculo $[\text{concentração da insulina em jejum (mU/L)} \times \text{concentração de glicose em jejum (mg/dL)} \times 0.05551] / 22.5$ (Kwon *et al.*, 2015).

4.10 Cultivo Celular e diferenciação celular

Foram utilizados nesse estudo pré-adipócitos brancos de linhagem 3T3-F442A. Essas células foram cultivadas até atingirem uma confluência de 90-100% (dia 0) e, após 2 dias, as células foram cultivadas com o meio de diferenciação contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Sigma), 10% SFB (soro fetal bovino) (Sigma), 850 nM de insulina (Sigma), 1 μM de rosiglitazona (Sigma), 1 nM T3 (Sigma), 0,5 mM isobutilmetilxantina (Sigma), 1 μM dexametasona (Sigma) e 125 mM indometacina (Sigma) por 2 dias (dia 2). Após esse período, as células foram mantidas em DMEM, 10% SFB, 850 nM insulina, 1 μM de rosiglitazona e 1nM T3 durante mais 2 dias (dia 4) e depois com 850 nM insulina e 1 μM de rosiglitazona por mais 2 dias (dia 6), como anteriormente descrito por Ye *et al.* (2013). As células foram divididas em 3 grupos: 1) Cont, 2) Mix de catequinas (4 μM) e 3) Extrato de CV (0.19%). As células foram tratadas com o mix de catequinas ou o extrato de CV durante todo período de diferenciação (dias 2 a 8). O mix de catequinas foi preparado a fresco contendo as quatro principais catequinas encontradas no CV na seguinte proporção: EGCG – 2 μM ; EGC – 1 μM ; ECG – 0.6 μM ; EC – 0.4 μM (Sigma). As células foram usadas nos

dias 4, 6 e 8 para as análises de expressão gênica, ensaios de acúmulo de lipídios e/ou consumo de oxigênio (**Figura 13**).

Figura 13 - Design experimental *in vitro*

4.11 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio basal de adipócitos foi medido com respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k, OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Áustria). 100 μ L de suspensão de adipócitos foram pipetados em 2 mL de tampão MIR05 (110 mM de sacarose, 60 mM lactobionato de potássio, 0,5 mM EGTA, 3 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mM de taurina, 10 mM de KH_2PO_4 , 20 mM de Hepes, 1 g/L de BSA-faf (Labsynth), para células intactas 5 mM de malato, pH 7,1 a 37°C, conforme descrito por OROBOROS INSTRUMENTS).

4.12 Coloração de Oil Red O

Após a cultura celular para diferenciação, as células foram fixadas em formalina 10% durante 1 h e em seguida coradas com solução de *Oil Red O* (5g/L de *Oil Red O* em álcool isopropílico 60%; Sigma) durante 10 min à temperatura ambiente. As células coradas foram lavadas três vezes com água e visualizadas com um microscópio

óptico. A mensuração da densidade óptica foi realizada a 500 nm utilizando-se álcool isopropílico 100% como branco (Janderova *et al.*, 2003).

4.13 Avaliação do papel agonista dos compostos presentes no extrato de CV sobre o PPAR γ

Para avaliar o efeito agonista dos compostos do extrato de CV sobre o PPAR γ , pré-adipócitos da linhagem 3T3F442A foram cultivados até atingirem uma confluência de 90 - 100% (dia 0) e, após o período total de diferenciação (8 dias) foram tratados com o agonista de PPAR γ , Rosiglitazona (Sigma), (5 μ M) e com o mix de catequinas (4 μ M) ou o extrato de CV (0.19%) por 24h (**Figura 14**).

Para avaliar o papel agonista dos compostos do CV na modulação gênica do PPAR γ , ainda nas fases iniciais da adipogênese, pré-adipócitos da linhagem 3T3F442A foram cultivados até atingirem uma confluência de 90-100% considerado dia 0; após 2 dias essas células foram tratadas até o dia 6 da diferenciação com o meio de diferenciação contendo DMEM (descrito previamente) acrescido do inibidor de PPAR γ , GW9662 (Sigma) (10 μ M). Neste protocolo, as células foram tratadas com o mix de catequinas (4 μ M) ou o extrato de CV (0.19%) durante todo o período de diferenciação (dia 2 ao dia 8) (**Figura 15**). Em ambas as avaliações, após o período experimental, as células foram, então, utilizadas para análise de expressão gênica.

Figura 14 - Efeito agonista sobre o PPAR γ exercido pelos compostos do extrato de CV após o período de diferenciação

Figura 15 - Efeito agonista do PPAR γ dos compostos do extrato de CV na etapa inicial da adipogênese

4.14 Extração, Quantificação do RNA total e Reação de RT (reverse transcriptase)

O RNA total das células após a diferenciação bem como dos tecidos foi obtido utilizando-se Trizol Reagente, uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, seguindo o procedimento proposto pelo fabricante. Inicialmente foi adicionado 1mL do reagente ao pellet de células (1×10^7) ou a 50-100 mg de tecido, que foi homogeneizado por maceração com o auxílio de um pistilo seguido de agitação em vórtex. O homogenato foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Foi adicionado 200 μ L de clorofórmio, mantido sob agitação contínua por 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 3 minutos, seguido de centrifugação por 15 minutos, 4°C e 10.000 $\times$ g, favorecendo a formação de três fases. A fase aquosa superior contendo o RNA foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 500 μ L de isopropanol, e posterior incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 4°C e 10.000 $\times$ g. O sedimento foi lavado com a adição de 1 mL de etanol a 75%, seguido de centrifugação por 5 minutos, a 4°C e 7.500 $\times$ g. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em água DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*).

A quantificação do RNA total foi realizada utilizando-se NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NadroDrop Technologies, Wilmington, DE) e sua integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. O RNA foi, então, armazenado em freezer -80°C para futuras análises de RT-qPCR (*Polymerase Chain Reaction*).

As amostras de RNA (2 µg) foram submetidas ao procedimento de inativação de eventuais moléculas de DNA presentes na amostra, utilizando DNase (5U/mg). Para a transcrição do RNA para cDNA, foi adicionado às amostras “random primers” (Sigma) (5 µM), trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTP, 2 mM) (Sigma) e a enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Thermo Fisher Scientific). O processo de transcrição foi realizado em um termociclador (Veriti, AppliedBiosystems) seguindo protocolo do fabricante.

4.15 RT-qPCR

A quantificação da expressão gênica foi feita por meio de RT-qPCR. Foi utilizado na reação 250 nM de cada primer (sense e antisense) (Sigma), 25 ng de cDNA e 1x HOT FIREPol® Evagreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne), para um volume final de reação de 10 µL. A expressão gênica foi avaliada em um Sistema de Detecção de Sequências Agilent Aria Mx sob as seguintes condições: 50°C -2 min, 95°C -10 min, e 40 ciclos de 95°C -15s, 60°C -20s, e 72°C -30s. Protocolos de dissociação foram usados para testar a eficácia dos primers em amplificar os genes especificamente. Em nossos experimentos, utilizamos primers com sequências dos nossos genes de interesse e de gene constitutivo como controle endógeno (18S e 36B4). A expressão do RNAm foi determinada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A sequência dos primers utilizados se encontra na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Sequência dos nucleotídeos dos primers utilizados

Gene (Mus Musculus)	Primer sense (5' – 3')	Primer anti-sense (3'-5')
<i>18S</i>	CGCTCCACCAACTAAGAACG	CTCAACACGGGAAACCTCAC
<i>36b4</i>	CGACCTGGAAGTCCAACTAC	ATCTGCTGCATCTGCTTG
<i>Npy</i>	GCATTCTGGCTGAGGGGTA	GGCGTTTTCTGTGCTTTCTT
<i>Pomc</i>	ATGCCGAGATTCTGCTACAG	CATCTCCGTTGCCAGGAAAC
<i>Agrp</i>	GCAGACCGAGCAGAAGAAGT	ATTGAAGAAGCGGCAGTAGC
<i>Leprb</i>	GTAATTGGAGCAGTCCAGCCT	CCCATTGTGGGCAGTACGAT
<i>Hspa5</i>	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TACGCCTCAGCAGTCTCCTT
<i>Ddit3</i>	CTGCCTTTTACCTTGGAGAC	GGACGCAGGGTCAAGAGTAG
<i>Xbp1</i>	GGGTCCAACCTTGCCAGAATGC	TTACGAGAGAAAACCTCATGGGC
<i>Xbp1s</i>	TTACGAGAGAAAACCTCATGGGC	GGGTCCAACCTTGCCAGAATGC
<i>Ppara</i>	TGCTGCTGTTCTGTTTTTC	TCTTGCAGCTTCGATCACAC
<i>Cpt1a</i>	CTTCCATGACTCGGCTCTTC	AGCTTGAACCTCTGCTCTGC
<i>Adrb3</i>	TCCTTCTACCTTCCCCTCCTT	GCGCTTAGCCACAACGAACAC
<i>Irf4</i>	ACAAGAGCAATGACTTTGAGGAA	GTTATGAACCTGCTGGGCTG
<i>Ppargc1a</i>	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTTC
<i>Pparg</i>	TCAGCTCTGTGGACCTCTCC	ACCCTTGCATCCTTCACAAG
<i>Cidea</i>	TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
<i>Dio2</i>	CAGTGTGGTGCACGTCTCCAATC	TGAACCAAAGTTGACCACCAG
<i>Nduf</i>	GTTTCATAGGGTCAGAGGTCAAG	TCCATTAAGATGTCCTGTGCG
<i>Pde1b</i>	GCTGACTGATGTGGCAGAAA	CTCACAGGGGGACAGTTCAT
<i>Ucp1</i>	CCGGTGGATGTGGTAAAAAC	ATCCGAGTCGCAGAAAAGAA
<i>Lxr</i>	TTTGTGGGGACCTGGAAACT	TGGTGGTGCAGCTTTCCATCC
<i>Th</i>	CCAAGGTTTCATTGGACGGC	CTCTCCTCGAATACCACAGCC
<i>Prdm16</i>	ACATCCGTGTAGCGTGTTCC	GCACCAACAGTTCCTCTCCA
<i>Tmem26</i>	CAAACCCTGTCATCCCACA	AGCAGGAGTGTTTGGTGGAG
<i>Lpl</i>	CCAGCTGGGCCTAACTTTGA	AACTCAGGCAGAGCCCTTTC
<i>Cd36</i>	TGGAGCTGTTATTGGTGCAG	TGGGTTTTGCACATCAAAGA
<i>Slc2a4 - Glut4</i>	TGATTCTGCTGCCCTTCTGT	GGACATTGGACGCTCTCTCT
<i>Fasn</i>	GAGGACACTCAAGTGGCTGA	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT
<i>Acaca - Acc</i>	GAGAGGGGTCAAGTCCTTCC	TGCTGCCGTCATAAGACAAG
<i>Pnpla2 - Atgl</i>	GAGTGCAGTGTCTTCAC	CAGTTCCACCTGCTCAGACA
<i>Slc2a1 - Glut1</i>	CAGTTCGGCTATAAACTGGTG	GCCCCGACAGAGAAGATG
<i>Adipoq</i>	TATAAGCGGCTTCTCCAGGTC	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG
<i>Fabp4 – Ap2</i>	AAGGTGAAGAGCATCATAACCCT	TCACGCCTTTCATAACACATTCC
<i>Rxrb</i>	AGTGTCCAAAATGCGTGACA	GCTGCTCAGGGTACTTCTGC

4.16 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA One-way com Tukey como pós-teste ou através de Teste T não-pareado. Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para verificar a normalidade e variância dos dados, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os softwares SPSS/Windows versão 22 (SPSS Inc., Chicago, IL) e GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 O extrato de CV reverte os marcadores de obesidade

Nós inicialmente investigamos o potencial efeito do extrato de CV em modular os marcadores característicos da obesidade através de um estudo pré-clínico. No início da fase experimental, os animais não apresentavam diferenças de peso entre si (**Figura 16 A**). Como esperado, a dieta de cafeteria aumentou o peso corporal, o ganho de peso e o índice de adiposidade, enquanto, o tratamento com o extrato de CV significativamente melhorou esses parâmetros após as 16 semanas de indução a obesidade (**Figura 16 B-D**). Além disso, o tratamento com o extrato de CV foi eficaz em reduzir significativamente os depósitos de gordura branca (epididimal e subcutânea) quando comparado aos animais que receberam a dieta de cafeteria (**Figura 16 E**). A histologia do TAB epididimal confirmou a hipertrofia dos adipócitos dos animais induzidos a obesidade e a redução promovida pelo tratamento com o extrato de CV. O diâmetro dos adipócitos dos animais obesos apresentou um tamanho aproximado de 170 μm , enquanto, o tratamento retornou o tamanho aos valores do controle (100 μm) (**Figura 16 F-G**). Além disso, os animais alimentados com a dieta de cafeteria apresentaram níveis elevados de leptina comparado aos animais controle (**Figura 16 H**). O tratamento com o extrato de CV foi eficaz em reduzir os valores plasmáticos de leptina e aumentar os valores de adiponectina no plasma dos animais obesos (**Figura 16 H e I**).

5.2 O Extrato de CV não interfere com a ingestão alimentar

Para assegurar que o efeito do extrato de CV em diminuir o peso corporal não estava relacionado à toxicidade, nós monitoramos alguns parâmetros bioquímicos no plasma desses animais. A dieta de cafeteria aumentou os níveis de ácido úrico e gama GT, e o tratamento com extrato de CV foi eficaz em diminuir esses parâmetros demonstrando que o mesmo não apresentou toxicidade nos animais (**Figura 17 A**). Além disso, a concentração plasmática do marcador de lipotoxicidade hepática ALT foi significativamente diminuída pelo tratamento com o extrato de CV em comparação ao grupo com dieta de cafeteria apenas (**Figura 17 A**). A análise da morfologia do tecido hepático revelou que o acúmulo de microgotículas lipídicas induzido pela dieta de cafeteria foi revertido pelo tratamento com o extrato de CV (**Figura 17 B**).

Para compreender como o extrato de CV previne o ganho de peso e de adiposidade nos animais submetidos à dieta de cafeteria, nós avaliamos a ingestão e a eficiência alimentar nesses animais. Apesar da ingestão alimentar não ter sido alterada pela dieta, a mesma foi capaz de aumentar o CEA e o GPCC (**Figura 17 C-E**). O tratamento com o extrato de CV não modulou nenhum desses parâmetros. Para elucidar a contribuição dos neurocircuitos hipotalâmicos no efeito anti-obesidade do extrato de CV, avaliamos os neuropeptídeos relacionados a fome e à saciedade nos animais e observamos que o extrato de CV não foi capaz de modular esse circuito. A razão entre o RNAm de *Npy/Pomc* e *Agrp/Pomc* no hipotálamo não foram alterados pelo tratamento (**Figura 17 F-G**). No entanto, o extrato de CV foi capaz de aumentar o RNAm *Leprb* no hipotálamo dos animais induzidos a obesidade, consistente com a diminuição previamente observada no plasma (**Figura 17 H**).

5.3 A tríade RI × inflamação × estresse de retículo endoplasmático (ERE) induzida pela dieta é revertida pelo extrato de CV

O acúmulo de gordura, principalmente intra-abdominal (epididimal), induzida por dieta é usualmente associada com a RI. Após 15 semanas do início da indução da obesidade, a fim de caracterizar o processo de RI induzida pela dieta de cafeteria e o possível efeito modulador do tratamento com o extrato de CV, foram avaliados alguns parâmetros relacionados com a homeostase glicêmica dos animais. Os resultados de GTT, ITT e K_{ITT} demonstraram que o tratamento com o extrato de CV significativamente melhora a homeostase glicêmica prejudicada pela dieta de cafeteria (**Figura 18 A-C**). Os níveis de insulina e glicose plasmática foram aumentados pela dieta de cafeteria, corroborando com o aumento no índice HOMA e foram significativamente diminuídos pelo tratamento com extrato de CV (**Figura 18 D-F**).

Está bem caracterizado que na obesidade há uma interligação em diversos pontos entre as vias de RI, inflamação e ERE (Hotamisligil, 2010). Com base nessa informação, nós avaliamos as principais citocinas pró-inflamatórias no plasma dos animais. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-17, IFN- γ e MCP-1 foram aumentadas significativamente no plasma dos animais induzidos a obesidade, enquanto, que o tratamento com o extrato de CV foi capaz de restaurar esses parâmetros aos valores do controle (**Figura 18 G**). Nós avaliamos o envolvimento do ERE através da expressão do RNAm das principais proteínas envolvidas na via: BIP

(*Hspa5*), CHOP (*Ddit3*), XBP1t e XBP1s nos dois TA envolvidos com o gasto energético (TAB subcutâneo e TAM) (**Figura 18 H-I**). O tratamento com o extrato de CV foi eficaz em diminuir a expressão do RNAm da *Hspa5* no TAB subcutâneo e no TAM, além de aumentar a expressão do RNAm da *Xbp1s*, diminuída pela obesidade em ambos os tecidos. A dieta e o tratamento não modularam a expressão de *Ddit3* em ambos os tecidos avaliados. Por outro lado, o tratamento com o extrato de CV aumentou a expressão de *Xbp1* em relação aos animais controle e obeso no TAB subcutâneo.

5.4 O extrato de CV induz o aumento no gasto energético em camundongos obesos

Um fator chave para controlar a homeostase energética é o equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017). Para isso, nós avaliamos o consumo de O₂, o gasto energético, o deslocamento ambulatorial e a preferência na utilização de AG ou carboidrato como fonte energética (RER) após 10 semanas de experimentação através de calorimetria indireta.

Os animais induzidos à obesidade pela dieta de cafeteria mostraram taxas elevadas no consumo de O₂ e no gasto energético nos ciclos claro e escuro em comparação aos animais que receberam a dieta padrão (**Figura 19 A e C**). Por outro lado, os camundongos que receberam o tratamento com o extrato de CV apresentaram um aumento significativo desses parâmetros e no deslocamento ambulatorial durante o período de administração do extrato (ciclo claro) (**Figura 19 A-F**). Interessantemente, este aumento foi significativamente maior após a administração intragástrica do extrato de CV (**Figura 19 B, D e F**).

O coeficiente respiratório, e/ou a taxa de troca respiratória (RER), permite avaliar a preferência energética comparada a valores de referência (0,7 até 1,0), sendo que valores mais próximo a 0,7 sugerem maior utilização de lipídios, e quanto mais próximo a 1, considera-se que seja maior a utilização de carboidratos para a produção de energia (Seidell *et al.*, 1992). Neste dado observamos que o RER dos animais induzidos à obesidade por dieta de cafeteria diminuiu significativamente apenas no ciclo escuro, enquanto que os animais tratados com o extrato de CV apresentaram valores menores durante todo o período de avaliação (ciclo claro e escuro) (**Figura 19 G**). Nós também verificamos que o tratamento com o extrato de CV é capaz de induzir

uma maior contribuição da oxidação de AG para o gasto energético de forma crônica e aguda (**Figura 19 H e I**).

Para investigar se o aumento do gasto energético foi acompanhado por um aumento na temperatura corporal, realizamos o teste de tolerância ao frio para avaliar a termogênese adaptativa, outro componente importante do gasto energético. Em 4 horas de exposição ao frio, os animais obesos tratados ou não com o extrato de CV apresentaram maior temperatura corporal em relação aos animais controle (**Figura 19J**). Independentemente do menor teor de gordura dos animais obesos tratados com extrato de CV em relação aos animais obesos e dos valores similares em relação aos animais controles (**Figura 16 D**), os animais obesos tratados com o extrato de CV foram capazes de manter a mesma temperatura que os animais obesos não tratados e capazes de aumentar em 3 graus a temperatura em comparação aos animais controles, o que significa que a suplementação com o extrato de CV é capaz de modular a temperatura corporal frente à exposição ao frio.

5.5 O extrato de CV previne o *whitening* do TAM e induz genes termogênicos no TAB subcutâneo de camundongos obesos

Em concordância com a redução do peso corporal, os animais induzidos à obesidade e tratados com o extrato de CV apresentaram adipócitos marrons menores, com acúmulo substancialmente menor de lipídios nessas células (**Figura 20 A**). O tratamento com o extrato de CV nos animais obesos não apresentou incrementos em toda a via termogênica avaliada no TAM (**Figura 20 B-D**). No entanto, o extrato de CV foi eficaz em restaurar a expressão do RNAm da *Ucp1* no TAM dos animais induzidos a obesidade por dieta (**Figura 20 D**).

Em linha com as observações realizadas de todo o perfil metabólico nos animais obesos tratados com o extrato de CV, nós nos questionamos se haveria uma modulação das células do TAB para um perfil termogênico. Corroborando com os achados já descritos como o menor ganho de peso, aumento da concentração de adiponectina plasmática, melhora da homeostase glicêmica, aumento do consumo de O₂ e na oxidação de AG, o tratamento com o extrato de CV induziu fortemente a ativação de uma gama de genes que controlam os programas termogênicos, mitocondrial e de oxidação de AG no TAB subcutâneo. A análise histológica do TAB subcutâneo demonstrou um menor acúmulo de lipídios no tecido subcutâneo dos

animais induzidos à obesidade e tratados com o extrato de CV (**Figura 20 E**). Corroborando com o menor depósito de lipídios no tecido subcutâneo, nós observamos um aumento nos genes relacionados à oxidação de AG (*Ppara* e *Cpt*) nos animais tratados com o extrato de CV e induzidos à obesidade (**Figura 20 F**). A expressão gênica de marcadores termogênicos como *Adrb3*, *Th* (*Tiroxina hidroxilase*), *Irf4*, *Ppargc1a* e *Cidea* foi fortemente ativada nesse tecido nos animais tratados com o extrato de CV e alimentados com dieta de cafeteria (**Figura 20 G**). Os genes relacionados à ativação mitocondrial (*Nduf*, *Pde1b*, *Ucp1* e *Lxr*) também foram intensamente induzidos pelo tratamento com CV na condição de obesidade (**Figura 20 H**). Apesar do tratamento não aumentar a expressão do RNAm de *Prdm16* nos animais induzidos à obesidade, a ativação de toda a via termogênica corroborou com a maior expressão do marcador de células bege *Tmem26* nesses animais (**Figura 20 I**).

5.6 As catequinas presentes no extrato de CV induzem um ciclo fútil *in vivo* e *in vitro*

Durante situações de elevada atividade termogênica como na exposição ao frio é observado, juntamente com o aumento da lipólise, um aumento da geração de glicerol-3-fosfato através de glicerolquinase, gliceroneogenesis e/ou pela rápida glicólise, juntamente com um aumento da captação de TG da circulação via LPL, além da *de novo* lipogênese intracelular (Bartelt *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2017) para ser usado como substrato para a UCP1. Dessa maneira, nós avaliamos o conteúdo de AGL e TG no plasma dos nossos animais e observamos uma diminuição pelo tratamento com o extrato de CV na condição de obesidade (**Figura 21 A**), em paralelo com uma maior captação pelo TAB subcutâneo (**Figura 21 B e C**) e maior oxidação já descrito anteriormente (**Figura 20 F**). Além disso, nós observamos que o tratamento com o extrato de CV induz uma maior captação de glicose e aumenta a expressão dos genes envolvidos na síntese de AG como a *Fasn* e *Acc* (*Acaca*) (**Figura 21 D-E**). O gene envolvido com lipólise, *Atgl* (*Phpla2*), também foi aumentado pelo tratamento com extrato CV (**Figura 21 F**).

Um perfil semelhante foi observado *in vitro*. O tratamento com o mix de catequinas e o extrato de CV diminuiu o acúmulo de lipídios através da avaliação por *Oil-red O* e induziu uma maior captação de lipídios indicado pelo aumento da

expressão de *Cd36* (**Figura 21 G-H**). Embora a expressão do RNAm do Glut4 (*Slc2a4*) não tenha sido alterada, assim como do Glut1 (*Slc2a1*), a mistura de catequinas e extrato de CV induziram fortemente a expressão de *Fasn* e *Acaca* (*Acc*) (**Figura 21 I-J**). A expressão de *Atgl* (*Pnpla2*) não foi alterada pelo tratamento (**Figura 21 K**).

5.7 As catequinas do CV induzem o consumo de oxigênio *in vitro* e modulam parâmetros iniciais da adipogênese

Para explorar o mecanismo pelo qual os polifenóis do CV, especialmente as catequinas, induzem a ativação do *browning* no TA, pré-adipócitos da linhagem 3T3-F442A foram diferenciados na presença do extrato de CV e do mix contendo as 4 principais catequinas encontradas no extrato de CV, a fim de verificar se esses compostos têm algum potencial autônomo neste processo. Os tratamentos foram eficazes em induzir diretamente um aumento no consumo de oxigênio basal (**Figura 22 A**). Corroborando com o aumento no consumo de oxigênio, nós observamos um aumento significativo na oxidação de AG indicado pelo aumento de *Ppara*, assim como em toda a via termogênica avaliada (*Adrb3*, *Ppargc1a*, *Cidea* e *Ucp1*) (**Figura 22 B e F**).

Apesar dos diversos indutores de *browning* já descritos na literatura, pouco se sabe sobre como os compostos presentes nos alimentos funcionais podem modular processos iniciais da adipogênese que favoreçam o comprometimento celular.

O PPAR γ , assim como o C/EBP β , é um componente essencial para a adipogênese. Nosso grupo sugere que as catequinas presentes no CV e o próprio extrato de CV atuam como agonistas de PPAR γ . Nós, inicialmente, observamos que células da linhagem 3T3F442A tratadas com o mix de catequinas ou com o extrato de CV após o período de diferenciação apresentam um incremento na expressão do gene alvo da sinalização do PPAR γ , *Adiponectina* (*Adipoq*) (**Figura 22 C**). Outros genes alvos da sinalização de PPAR γ como *cd36*, *Acaca* (*ACC*) e *Fasn* também foram modulados positivamente pelos tratamentos (**Figura 21 H e J**).

Para fortalecer ainda mais o papel da ativação direta do PPAR γ pelos compostos do CV no potencial adipogênico e termogênico nós determinamos sua expressão temporal e observamos que os compostos do CV são capazes de induzir um incremento na expressão desse fator apenas após 4 dias de diferenciação (**Figura 22 D**). Com base na modulação temporal da expressão de PPAR γ , nós tratamos as

células durante os 4 primeiros dias da diferenciação com o antagonista de PPAR γ , GW9662. Como era de se esperar, o antagonista do PPAR γ da maneira como foi utilizado não apresentou diferenças na expressão dos genes alvos avaliados e permitiu a diferenciação do pré-adipócito em adipócito. Por outro lado, a presença do antagonista possivelmente impossibilitou o agonismo das catequinas do CV, demonstrando, assim, que as catequinas do CV parecem atuar via PPAR γ para exercerem seus efeitos na indução dos genes característicos do adipócito e no principal marcador envolvido na termogênese, a *Ucp1* (**Figura 22 E e F**). A capacidade das catequinas atuarem no PPAR γ para comprometer o destino celular fica ainda mais evidente ao avaliar a expressão temporal de *Sirt1* que apresentou um aumento significativo no final do período de diferenciação (**Figura 22 G**), possivelmente para atenuar na adipogênese e induzir o programa de transcrição de genes metabólicos de oxidação de AG mitocondriais via PGC-1 α (Gerhart-Hines *et al.*, 2007).

A ativação do PPAR γ na adipogênese envolve uma cascata transcricional que inclui membros da família do C/EBP. É descrito na literatura que o PPAR γ atua em conjunto com o C/EBP α e, regulam mútua e positivamente a expressão um do outro para promover a adipogênese. Além disso, após a ligação do ligante ao PPAR γ existe a formação de heterodímeros com outro receptor nuclear ativado por ligantes, o RXR, que, então, permite sua ligação a sequências específicas do DNA localizadas na região promotora de genes-alvos conhecidas como PPREs. Com base nessas informações, nós avaliamos esses fatores nos dias 4 e 6 da diferenciação celular e observamos que a expressão de *Cebpa* segue a mesma cronologia da expressão de PPAR γ , enquanto que a expressão de *Rxr* é restabelecida após 4 dias de tratamento com o mix de catequinas (**Figura 22 H**). Como mencionado previamente, o regulador transcricional PRDM16 interage de forma direta com o PPAR γ para favorecer o comprometimento celular. Nós observamos que o tratamento com o mix de catequinas induz o aumento na expressão de PRDM16 no dia 6^o dia de diferenciação, corroborando com as mudanças já observadas (**Figura 22 I**).

Recentemente, o fator de transcrição Tbx15 (*T-box 15*) foi identificado como um fator essencial para a diferenciação completa do adipócito marrom e bege no início da diferenciação (Gburcik *et al.*, 2012). Assim, nós avaliamos a expressão temporal desse fator e observamos que nossos tratamentos, em especial o extrato de CV, são capazes de induzir o aumento em sua expressão (**Figura 22 J**). Esse dado

associado aos demais já citados, demonstra a contribuição dos compostos do CV no comprometimento final celular, que conduz ao fenótipo bege.

Figura 16 - O extrato de CV reverte os marcadores de obesidade.

(A) Peso corporal inicial e (B) Curva do ganho de peso corporal semanal. (C) Ganho de peso corporal final em 16 semanas. (D) Índice de adiposidade (mg/g PC) e (E) Peso dos tecidos adiposos (mg/g PC). (F) Análises morfométricas de adipócitos epididimais e (G) Imagens representativas da histologia do TAB epididimal (ampliação 10x). (H) Níveis plasmáticos de leptina (pg/mL) e (I) adiponectina (pg/mL). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figura 17 - O extrato de CV não interfere com a ingesta alimentar

A) Avaliação plasmática dos parâmetros bioquímicos (Ácido úrico, Creatinina, Gama GT, AST e ALT). **(B)** Imagens histológicas do tecido hepático (ampliação 10×). **(C)** Ingestão alimentar (g/animal e Kcal/animal). **(D)** CEA e **(E)** CPCC. **(F)** Avaliação da expressão gênica hipotalâmica da razão *Npy/Pomc*, **(G)** *Agrp/Pomc* e **(H)** *Lepr*. Os resultados estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Figura 18 - A tríade RI x inflamação x ERE induzido pela dieta é revertida pelo extrato de CV

(A) Teste de tolerância à glicose (GTT), (B) Teste de tolerância à insulina (ITT) e (C) Cálculo da constante de decaimento da glicose na corrente sanguínea (K_{ITT}). (D) Níveis plasmáticos de insulina (pg/mL) e (E) glicose (mg/dL). (F) Índice HOMA. (G) Análise plasmática das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e MCP-1). (H) Análise da expressão gênica de *Hspa*, *Ddit3*, *Xbp1* e *Xbp1s* no TAM e no (I) TAB subcutâneo. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figura 19 - O extrato de CV induz aumento no gasto energético em camundongos obesos

(A) Consumo de Oxigênio (VO₂), (C) Gasto energético e (E) Deslocamento ambulatorial. (B), (D) e (F) Representação do pico de VO₂, gasto energético e deslocamento, respectivamente, após administração intragástrica do extrato de CV. (G) Taxa de troca respiratória (RER) e (H) % contribuição da oxidação de AG para o gasto energético crônico e (I) agudo. (J) Exposição aguda ao frio durante 4h. A seta nos gráficos indica o momento da gavagem com o extrato de CV. Os resultados estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Figura 20 - O extrato de CV previne o *whitening* do TAM e induz genes termogênicos no TAB subcutâneo de camundongos obesos

(A) Imagens histológicas do TAM (ampliação 40×) e (E) do TAB subcutâneo (ampliação 10×). (B e F) Avaliação da expressão de genes relacionados à oxidação de AG (*Ppara* e *Cpt*), (C e G) Marcadores termogênicos (*Adrb3*, *Irf4*, *Ppargc1a*, *Pparg*, *Cidea* e *Dio2*) e (D e H) à mitocôndria (*Nduf*, *Pde1b*, *Ucp1* e *Lxr*) no TAM e TAB subcutâneo, respectivamente. (I) Avaliação do RNAm dos marcadores de células bege, *Prdm16* e *Tmem26*. Os resultados estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figura 21 - As catequinas do extrato de CV induzem ciclo fútil *in vivo* e *in vitro*

(A) Níveis plasmáticos de AGL (μM) e TG (mg/dL). Análise da expressão gênica de (B) *Lpl*, (C) *Cd36*, (D) *Slc2a4 - Glut4*, (E) *Fasn* e *Acaca - Acc* e (F) *Pnpla2 - Atgl* no TAB subcutâneo. (G) Avaliação do conteúdo de lipídios através da avaliação de *Oil Red O*. (H) Expressão gênica de *Cd36*, (I) *Slc2a4 - Glut4* e *Slc2a1 - Glut1*, (J) *Fasn* e *Acaca - Acc* e (K) *Pnpla2 - Atgl* em adipócitos diferenciados. Os resultados estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 6 avaliações por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Figura 22 - As catequinas do extrato de CV induzem o consumo de oxigênio *in vitro* e modulam parâmetros iniciais da adipogênese

(A) Consumo de oxigênio e (B) Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação de AG (*Ppara*) e na via termogênica (*Adrb3*, *Ppargc1a* e *Cidea*) em adipócitos diferenciados. (C) Avaliação do efeito agonista do PPAR γ na expressão de *Adipoq* após o dia 8 de diferenciação. (D) Avaliação temporal da expressão de *Pparg* e (E) Efeitos do agonismo de PPAR γ na expressão de seus genes alvos, *Ap2*, *cd36*, *Acaca - Acc* e *Fasn* e (F) do papel do PPAR γ na indução da via termogênica através da expressão de *Ucp1*. A linha pontilhada no gráfico E representa o grupo Cont. (G) Avaliação da expressão temporal de *Sirt1*, (H) *Cebpa*, *Rxr*, (I) *Prdm16* e (J) *Tbx15*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 4 experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o método fatorial ANOVA One-Way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós sugerimos que os compostos presentes no extrato de CV podem induzir alterações fenotípicas e metabólicas no TAM e no TAB subcutâneo que suportam a indução do fenótipo bege, aumentando o gasto energético e a termogênese. Nós observamos que o efeito do CV ocorre de forma autônoma em adipócitos, independentemente da produção de qualquer outro fator indutor do fenótipo bege. Além disso, somos os primeiros a propor que o extrato de CV induz a *de novo* lipogênese para otimizar o armazenamento de substrato para a indução da termogênese. Evidenciamos a atuação das catequinas do CV nas etapas iniciais do processo de adipogênese direcionando a célula para o destino final termogênico via um balanço temporal da expressão de *Pparg*.

É descrito na literatura que a ativação de receptores β -adrenérgicos durante a exposição ao frio aumenta simultaneamente a síntese e oxidação de AG no TAM (Yu *et al.*, 2002). Este tecido é responsável pela depuração de até 75% do TG e 50% da glicose circulante total em camundongos (Bartelt *et al.*, 2011). Como não observamos uma ativação termogênica significativa no TAM nos camundongos induzidos à obesidade, assumimos que esta função foi reprogramada para o TAB subcutâneo que apresentou aumento da captação de TG e na expressão de genes envolvidos na oxidação de AG e ativação termogênica/mitocondrial. Além disso, a expressão do marcador seletivo de adipócitos bege, *Tmem26*, aumentou após o tratamento com o extrato de CV. Esses dados suportam fortemente a ideia de que o extrato de CV promove a formação de adipócitos bege através do *browning* do TAB subcutâneo. Essas descobertas corroboram com uma recente publicação que relata a conversão de adipócitos brancos a bege no TAB pelo tratamento com extrato de CV (Neyrinck *et al.*, 2017).

A relevância fisiológica do *browning* por polifenóis do CV no TAB subcutâneo em relação ao gasto energético corporal e à homeostase metabólica, precisa ainda de uma maior elucidação. Embora a contribuição das células bege para o gasto energético global seja muito menor do que pelos adipócitos do TAM, evidências emergentes sugerem que o aumento do *browning* do TAB sozinho é suficiente para reduzir a obesidade em camundongos (Cohen *et al.*, 2014). Nossos resultados indicam que o extrato de CV aumenta o gasto energético em camundongos imediatamente após a administração e persiste por aproximadamente 4 horas, consistente com o perfil farmacocinético das catequinas presentes no extrato,

especialmente a EGCG (Lambert *et al.*, 2003). Deve-se notar que o aumento do consumo de O₂, produção de calor e oxidação lipídica pode ser devido à ativação do TAB subcutâneo pelos polifenóis presentes no extrato de CV. Além disso, o tratamento contribui para a perda de peso através do maior gasto energético por aumento na atividade ambulatorial. Ambos os processos, são capazes de induzir o aumento da oxidação de lipídios, o que gera um gradiente de prótons nas mitocôndrias, que posteriormente pode ser eliminado via UCP1 para geração de calor.

Lipólise e lipogênese são tipicamente vistas como caminhos independentes e opostos (Mottillo *et al.*, 2014). É consenso concordar que a lipólise desempenha um papel central na atividade catabólica do TAM e TAB. Nosso grupo já evidenciou o papel lipolítico do CV na condição de obesidade no TAB epididimal (Rocha *et al.*, 2016). Neste trabalho, nós também confirmamos esse papel no TAB subcutâneo. Por outro lado, sugerimos pela primeira vez que a indução da *de novo* lipogênese pelo extrato de CV estaria associada à ativação de um ciclo fútil nos adipócitos. A ativação do ciclo fútil teria como objetivo a dissipação de energia sob a forma de calor, contribuindo assim para a ativação termogênica observada *in vivo* e *in vitro*.

Sanchez-Gurmaches *et al.* (2017) forneceram evidências de que o frio moderado induz fortemente a *de novo* lipogênese e o remodelamento lipídico no TAM através da via AKT2-ChREBP, melhorando a termogênese. Evidências semelhantes demonstram que o tratamento de 7 dias com o ativador β 3 adrenérgico CL 316,243, aumenta drasticamente o *turnover* da *de novo* lipogênese e o conteúdo de TG em diferentes depósitos adiposos, apesar das grandes diferenças na abundância de UCP1 (Mottillo *et al.*, 2014). Este aumento no volume de lipídios foi seguido por uma regulação positiva dos genes envolvidos na síntese e oxidação de AG. Esses dados corroboram com os nossos resultados, uma vez que mostramos um aumento significativo nos genes envolvidos na *de novo* lipogênese ao passo que o tecido apresentava adipócitos menores, o que sugere que, apesar da nova síntese de AG, o TAB subcutâneo, assim como o TAB epididimal, não acumula lipídios, mas, de fato, aumenta a oxidação e a utilização dos mesmos. Estudos envolvendo a incorporação de acetato ou glicose marcada podem corroborar ainda mais com evidências futuras para o ciclo fútil nos adipócitos gerados pelo tratamento com extrato de CV.

De acordo com estudos com camundongos transgênicos que demonstram a importância do GLUT4 no TA como regulador da sensibilidade à insulina corporal (Abel *et al.*, 2001), o aumento na expressão de GLUT4 pelo extrato de CV está associado com a melhora da RI e apoia fortemente a noção de que esse transportador promove a sensibilidade à insulina possivelmente como um marca-passo da *de novo* lipogênese observado nos adipócitos de camundongos obesos tratados com o extrato de CV. O GLUT4 não só fornece substrato para a *de novo* lipogênese, como é crítico para o fator de transcrição lipogênica ChREBP, que é ativado no aumento do fluxo de glicose (Herman *et al.*, 2012; Eissing *et al.*, 2013).

O tratamento com o extrato de CV reduziu significativamente os níveis plasmáticos de AGL, com um aumento simultâneo da absorção pelo TAB subcutâneo, o que pode ter levado a uma redução da lipotoxicidade hepática ao diminuir o fluxo de AGL para o fígado. Além disso, houve remodelamento do TAB como uma resposta adaptativa ao excesso de mobilização de AG, através da qual o PPAR α e seus alvos elevam o catabolismo de AG e suprimem a sinalização pró-inflamatória, observada pela diminuição plasmática de várias citocinas inflamatórias nos animais tratados com o extrato de CV na obesidade. Li *et al.* (2005) demonstraram que camundongos deficientes de PPAR α apresentam comprometimento na indução de genes envolvidos na função mitocondrial ao mesmo tempo em que, apresentam uma exacerbação na sinalização inflamatória. Esses dados indicam que o PPAR α desempenha um papel fundamental na adaptação metabólica do TA à mobilização sustentada de lipídios, expandindo sua capacidade catabólica.

Nossos dados também sugerem fortemente que as catequinas do CV são agonistas de PPAR, em especial do PPAR γ , e podem, assim, induzir o *browning* do TAB. As TZD, agonistas totais do PPAR γ , são classicamente potentes antidiabéticos que apresentam como efeito adverso a indução da maior eficiência metabólica, aumento da massa gorda e aumento de peso corporal (Soccio *et al.*, 2014). Apesar de induzir *browning* do TAB era comumente descrito na literatura que as TZDs não eram capazes de aumentar a termogênese adaptativa e o gasto energético (Cannon e Nedergaard, 2004) devido a reduzida atividade simpática e da ação do hormônio tireoideano, T3, em resposta à ativação total de PPAR γ no TAM (Festuccia *et al.*, 2008). No entanto, Merlin *et al.* (2018) recentemente evidenciou que o tratamento com rosiglitazona aumenta os níveis de UCP1 através da indução de adrenoreceptores β 3

sem afetar a captação de glicose no TAM, assim como, os adipócitos derivados de depósitos inguinal, que apresentaram maior capacidade de *browning* através da regulação positiva da expressão e da função adrenoreceptores $\beta 3$ pelo tratamento com rosiglitazona.

As catequinas do CV atuam potencialmente através do agonismo parcial do PPAR γ , visto que previnem os efeitos adversos observados pelo agonismo total. Shin *et al.* (2009) demonstrou que baixas doses de (-)-catequina, ao contrário do seu enantiômero (+)-catequina, promove a diferenciação de adipócitos e aumenta a sensibilidade à insulina através da ligação direta ao sítio de ligação do ligante de PPAR γ e pelo aumento da expressão de adiponectina. No entanto, os autores não descrevem o tipo de agonismo que esta catequina apresenta no PPAR γ . Zoechling *et al.* (2011) também evidenciou que os compostos presentes em diferentes vinhos australianos apresentam uma alta afinidade ao PPAR γ , o que resulta nos efeitos benéficos na saúde já observados na literatura. Além disso, o estudo evidenciou que a EGC e o ácido elágico são os ligantes mais potentes para o receptor de PPAR γ nos vinhos avaliados.

Nós demonstramos com sucesso que uma mistura de catequinas *in vitro* induz o consumo de oxigênio e o fenótipo bege através de regulação autônoma. No entanto, uma questão que continua pertinente é a forma como as catequinas do CV induzem a adipogênese celular para um destino final termogênico. A conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros envolve uma rede complexa de fatores de transcrição que demonstram atuar através de dois componentes principais, C/EBP e PPAR γ (Cristancho e Lazar, 2011; Inagaki *et al.*, 2017). O momento exato da expressão desses fatores é crucial para a sua função na diferenciação adipogênica. Nós evidenciamos que o PPAR γ apresenta um papel fundamental na decisão celular inicial para o comprometimento adipogênico e termogênico pelas catequinas do CV, que modulam de forma temporal a expressão do *Pparg*, *Cebpa* e *Rxr* nos 6 primeiros dias da diferenciação celular. Desta forma, fica evidente que a ativação da via adipogênica e termogênica pelas catequinas ocorre via sinalização de PPAR γ .

Como já descrito, o PPAR γ é um fator chave para a adipogênese branca e marrom, regulando a expressão de vários programas envolvidos na formação e armazenamento de gotículas lipídicas, lipogênese e secreção de adipocinas características do tecido (Gross *et al.*, 2017). Parece que a ativação do PPAR γ por

seus ligantes, como as catequinas do CV, pode reprogramar a expressão gênica de modo que os adipócitos brancos adotem um fenótipo termogênico. Esse processo parece envolver a indução de genes como a UCP-1 que são normalmente silenciados no adipócito branco.

Vernochet *et al.* (2009) identificou um subconjunto de genes característicos de adipócitos brancos que inclui o angiotensinogênio, chemerina, proteína de tipo Wdnm1, Pank3 e resistina, que são seletivamente reprimidos *in vitro* e *in vivo* por agonistas sintéticos do PPAR γ . O estudo evidenciou que a repressão desses genes envolve participação do C/EBP α e dois membros da família de proteína de ligação carboxi-terminal, CtBP1 e CtBP2. Além disso, o uso do agonista sintético de PPAR γ demonstra sua participação na expressão do fenótipo marrom em adipócitos brancos através da indução de genes característicos dos adipócitos marrons, estimulação da biogênese mitocondrial e do consumo de oxigênio. Ohno *et al.* (2012) demonstraram que os ligantes de PPAR γ , como as TZDs, requerem o agonismo total para induzir o programa termogênico no TAB subcutâneo e que esse processo ocorre via ativação de PRDM16. Surpreendentemente, os autores evidenciaram que os ligantes de PPAR γ causam um aumento no acúmulo de PRDM16 devido ao incremento do tempo de meia-vida da proteína, não alterando, assim, a expressão do RNAm. Uma fragilidade do nosso estudo está no fato de termos avaliado apenas a expressão gênica do PRDM16, o que pode sugerir que modulações proteicas podem, também, ter ocorrido pelo tratamento com as catequinas do CV.

Assim como Vernochet *et al.* (2009) nós acreditamos que para facilitar uma mudança tão dramática na expressão de genes alvos do PPAR γ , o agonista deve reconfigurar a molécula de PPAR γ para que a mesma possa ser ligada na região promotora por elementos reguladores anteriormente mascarados e/ou facilitar a associação com diferentes co-ativadores ou co-repressores que permitam o direcionamento para o comprometimento termogênico como destino final da célula. Mais estudos devem ser conduzidos para demonstrar quais seriam os fatores que as catequinas do CV modulam que estão envolvidos na reprogramação da expressão gênica. Além disso, nós observamos que as catequinas do CV alteram o balanço entre PPAR γ e C/EBP α nas etapas iniciais da adipogênese, o que pode favorecer a preferência para o comprometimento do destino celular.

Em resumo, nós demonstramos que os polifenóis do CV, numa condição de obesidade, são capazes de prevenir o *whitening* do TAM e ativam uma resposta termogênica no TAB subcutâneo, aumentando assim o gasto energético e diminuindo o ganho de peso e acúmulo de gordura. Seus efeitos ocorrerem de forma autônoma na célula adiposa através da modulação de caminhos envolvidos nos estágios iniciais da adipogênese, via ativação da sinalização de PPAR γ . Além disso, nós sugerimos que nosso tratamento induz a ativação de um ciclo fútil na célula adiposa que culmina na geração de substrato para ativação da via termogênica, o que por sua vez promove uma melhora na sensibilidade à insulina. Neste cenário, nossos resultados apoiam fortemente que a ativação do PPAR γ pelas catequinas do CV, possíveis agonistas parciais, desprovidas de efeitos desfavoráveis relacionados ao agonismo completo, pode ser uma estratégia para induzir o *browning* do TAB e, assim, tratar a obesidade e suas comorbidades (**Figura 23**).

7 CONCLUSÕES

- ✓ A dieta de cafeteria induz um acúmulo de TAB nos diferentes depósitos dos animais, aumentando assim o IA, o tamanho dos adipócitos e alterando parâmetros bioquímicos plasmáticos e hepáticos. O tratamento com o extrato de CV é eficaz em diminuir esses parâmetros;
- ✓ Os animais submetidos à dieta de cafeteria apresentam menor responsividade à insulina por apresentarem maiores taxas de glicose e insulina em jejum e alteração no GTT. O tratamento com o extrato de CV na condição de obesidade é eficiente em diminuir essas taxas, além de normalizar o ITT;
- ✓ O tratamento com o extrato de CV foi eficaz em restaurar todos os parâmetros envolvidos no processo inflamatório e de ERE induzidos pela dieta de cafeteria;
- ✓ O tratamento com o extrato de CV modula de forma aguda o metabolismo basal dos animais induzidos à obesidade e favorece a oxidação de AG através de um maior aporte e síntese pela *de novo* lipogênese;
- ✓ O tratamento com extrato de CV previne o *whitening* do TAM e induz a ativação da cascata termogênica no TAB subcutâneo, atuando de forma autônoma nos adipócitos, aumentando o consumo de oxigênio e a via termogênica em pré-adipócitos diferenciados;
- ✓ Os compostos presentes no extrato de CV são capazes de induzir a *de novo* lipogênese com o intuito de criar um ciclo fútil celular eficiente para gerar substrato para a ativação termogênica;
- ✓ Os efeitos descritos anteriormente pelas catequinas do CV ocorrem devido suas ações como agonistas parciais de PPAR γ nas etapas iniciais da adipogênese.

REFERÊNCIA^{1*}

ABEL, E. D. et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, v. 409, n. 6821, p. 729-33, Feb 8 2001.

ALBUQUERQUE, K. F. et al. Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 3, p. 1261-74, Apr 2016.

ASANO, A.; KIMURA, K.; SAITO, M. Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. **J Vet Med Sci**, v. 61, n. 4, p. 403-9, Apr 1999.

ATIT, R. et al. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. **Dev Biol**, v. 296, n. 1, p. 164-76, Aug 1 2006.

BABU, P. V.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 18, p. 1840-50, 2008.

BAO, S. et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) activity via 67 kDa laminin receptor (67LR) in 3T3-L1 adipocytes. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 10, p. 2811-9, Mar 18 2015.

BARTELT, A. et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nat Med**, v. 17, n. 2, p. 200-5, Feb 2011.

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 1, p. 24-36, Jan 2014.

BARTELT, A. et al. Effects of adipocyte lipoprotein lipase on de novo lipogenesis and white adipose tissue browning. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 5, p. 934-42, May 2013.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 9// 2000.

BERTHOLET, A. M. et al. Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. **Cell Metab**, v. 25, n. 4, p. 811-822 e4, Apr 04 2017.

BESSESEN, D. H.; VAN GAAL, L. F. Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy. **Lancet Diabetes Endocrinol**, Sep 14 2017.

BODE, A. M.; DONG, Z. Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 2, n. 6, p. 514-7, Jun 2009.

BONET, M. L.; MERCADER, J.; PALOU, A. A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. **Biochimie**, v. 134, p. 99-117, Mar 2017.

¹ * De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, Feb 1989.

BRESTOFF, J. R. et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 242-6, Mar 12 2015.

BUKOWIECKI, L. et al. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. **Am J Physiol**, v. 242, n. 6, p. E353-9, Jun 1982.

BURKERT, N. T. et al. The influence of socioeconomic factors on health parameters in overweight and obese adults. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65407, 2013.

BURYSEK, L.; HOUSTEK, J. beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. **FEBS Lett**, v. 411, n. 1, p. 83-6, Jul 07 1997.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004.

CASTRO, E.; SILVA, T. E. O.; FESTUCCIA, W. T. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 31, n. 2, Sep 01 2017.

CESARETTI, M. L.; KOHLMANN JUNIOR, O. [Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 190-7, Apr 2006.

CHACKO, S. M. et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. **Chin Med**, v. 5, p. 13, 2010.

CHAN, E. W. et al. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. **Pharmacognosy Res**, v. 3, n. 4, p. 266-72, Oct 2011.

CHEN, L. et al. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metab Dispos**, v. 25, n. 9, p. 1045-50, Sep 1997.

CHOWDHURY, A. et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. **Biomed Pharmacother**, v. 78, p. 50-9, Mar 2016.

COHEN, P. et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 304-16, Jan 16 2014.

COUSIN, B. et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. **J Cell Sci**, v. 103 (Pt 4), p. 931-42, Dec 1992.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, Jun 2013.

CRICHTON, P. G.; LEE, Y.; KUNJI, E. R. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. **Biochimie**, v. 134, p. 35-50, Mar 2017.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 722-34, Sep 28 2011.

DE JESUS, L. A. et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 108, n. 9, p. 1379-85, Nov 2001.

DE JONGE, L.; BRAY, G. A. The thermic effect of food and obesity: a critical review. **Obes Res**, v. 5, n. 6, p. 622-31, Nov 1997.

DODD, G. T. et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p. 88-104, Jan 15 2015.

DUNCAN, R. E. et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 79-101, 2007.

EISSING, L. et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. **Nat Commun**, v. 4, p. 1528, 2013.

FARHAN, M. et al. Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen species. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 2, p. 37, Feb 04 2016.

FASSHAUER, M.; BLUHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 36, n. 7, p. 461-70, Jul 2015.

FELDMANN, H. M. et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell Metab**, v. 9, n. 2, p. 203-9, Feb 2009.

FESTUCCIA, W. T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2121-30, May 2008.

FORNER, F. et al. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. **Cell Metab**, v. 10, n. 4, p. 324-35, Oct 2009.

FUJIMURA, Y. et al. Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37942, 2012.

GBURCIK, V. et al. An essential role for Tbx15 in the differentiation of brown and "brite" but not white adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 8, p. E1053-60, Oct 15 2012.

GERHART-HINES, Z. et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. **EMBO J**, v. 26, n. 7, p. 1913-23, Apr 4 2007.

GONZALEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17034, Jun 15 2017.

GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev Med**, v. 21, n. 3, p. 334-50, May 1992.

GRANATA, G. P.; BRANDON, L. J. The thermic effect of food and obesity: discrepant results and methodological variations. **Nutr Rev**, v. 60, n. 8, p. 223-33, Aug 2002.

GROSS, B. et al. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 1, p. 36-49, Jan 2017.

HAMDY, O.; PORRAMATIKUL, S.; AL-OZAIRI, E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. **Curr Diabetes Rev**, v. 2, n. 4, p. 367-73, Nov 2006.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252-63, Oct 2013.

HARMS, M. J. et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 593-604, Apr 01 2014.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C.; AMERICAN DIETETIC, A. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **J Am Diet Assoc**, v. 109, n. 4, p. 735-46, Apr 2009.

HERMAN, M. A. et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 333-8, Apr 19 2012.

HIMMS-HAGEN, J.; DESAUTELS, M. A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold by an increase in binding. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 83, n. 2, p. 628-34, Jul 28 1978.

HONDARES, E. et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. **J Biol Chem**, v. 286, n. 15, p. 12983-90, Apr 15 2011.

HONG BYUN, E. et al. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 33-45, Jul 01 2010.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900-17, Mar 19 2010.

HURSEL, R.; WESTERTEP-PLANTENGA, M. S. Thermogenic ingredients and body weight regulation. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. 4, p. 659-69, Apr 2010.

INAGAKI, T.; SAKAI, J.; KAJIMURA, S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 8, p. 527, Aug 2017.

JANDEROVA, L. et al. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. **Obes Res**, v. 11, n. 1, p. 65-74, Jan 2003.

JEMNITZ, K. et al. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. **Drug Metab Rev**, v. 42, n. 3, p. 402-36, Aug 2010.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2548-56, Jun 2004.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biol**, v. 2, p. 187-95, 2014.

KONDO, T. et al. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. **Cancer Lett**, v. 180, n. 2, p. 139-44, Jun 28 2002.

KOOIJMAN, S. et al. Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. **Diabetologia**, v. 58, n. 11, p. 2637-46, Nov 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

KWON, E. Y. et al. Luteolin attenuates hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue in mice with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1658-69, May 2015.

LAFONTAN, M. Advances in adipose tissue metabolism. **Int J Obes (Lond)**, v. 32 Suppl 7, p. S39-51, Dec 2008.

LAMBERT, J. D. et al. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. **J Nutr**, v. 133, n. 12, p. 4172-7, Dec 2003.

LAMBERT, J. D.; SANG, S.; YANG, C. S. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. **Mol Pharm**, v. 4, n. 6, p. 819-25, Nov-Dec 2007.

LEE, M. J. et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 10 Pt 1, p. 1025-32, Oct 2002.

LEPPER, C.; FAN, C. M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. **Genesis**, v. 48, n. 7, p. 424-36, Jul 2010.

LI, P. et al. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, n. 4, p. E617-26, Oct 2005.

LIN, J. K.; LIN-SHIAU, S. Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. **Mol Nutr Food Res**, v. 50, n. 2, p. 211-7, Feb 2006.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 01 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LONG, J. Z. et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. **Cell Metab**, v. 19, n. 5, p. 810-20, May 06 2014.

LU, H.; MENG, X.; YANG, C. S. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 5, p. 572-9, May 2003.

LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **J Endocrinol**, v. 231, n. 3, p. R77-R99, Dec 2016.

LUSK, G. Animal calorimetry: analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrates and fat. . **J Biol Chem** v. 59, p. 41-42, 1926.

LYNES, M. D.; TSENG, Y. H. The Thermogenic Circuit: Regulators of Thermogenic Competency and Differentiation. **Genes Dis**, v. 2, n. 2, p. 164-172, Jun 2015.

MACEDO, I. C. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 189-96, Nov 2012.

MARINOVIC, M. P.; MORANDI, A. C.; OTTON, R. Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFkappaB p65 signal pathway. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1766-78, Oct 2015.

MCGLASHON, J. M. et al. Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. **Cell Metab**, v. 21, n. 5, p. 692-705, May 05 2015.

MCSHEA, S. Obesity: "Can the Battle Be Won?". **Physician Assist Clin**, v. 2, p. 87-106, 2017.

MELE, L. et al. Dietary (Poly)phenols, Brown Adipose Tissue Activation, and Energy Expenditure: A Narrative Review. **Adv Nutr**, v. 8, n. 5, p. 694-704, Sep 2017.

MENARD, S. et al. New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. **J Cell Biochem**, v. 67, n. 2, p. 155-65, Nov 1 1997.

MERLIN, J. et al. The PPARgamma agonist rosiglitazone promotes the induction of brite adipocytes, increasing beta-adrenoceptor-mediated mitochondrial function and glucose uptake. **Cell Signal**, v. 42, p. 54-66, Jan 2018.

MILENKOVIC, D.; JUDE, B.; MORAND, C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. **Free Radic Biol Med**, v. 64, p. 40-51, Sep 2013.

MOLINA, N.; BOLIN, A. P.; OTTON, R. Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 2, p. 985-96, Oct 2015.

MONAGAS, M. et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food Funct**, v. 1, n. 3, p. 233-53, Dec 2010.

MOTTILLO, E. P. et al. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation. **J Lipid Res**, v. 55, n. 11, p. 2276-86, Nov 2014.

MOTTILLO, E. P. et al. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. **Cell Metab**, v. 24, n. 1, p. 118-29, Jul 12 2016.

MULLIGAN, J. D. et al. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. **J Physiol**, v. 580, n. Pt. 2, p. 677-84, Apr 15 2007.

NAKAGAWA, H. et al. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1567-74, Sep 2004.

NAKAGAWA, M. Constituents in Tea Leaf and Their Contribution To The Taste of Green Tea Liquor. **Jpn. Agric. Res**, v. 5, p. 43-47, 1970.

NEYRINCK, A. M. et al. A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice. **J Nutr Biochem**, v. 49, p. 15-21, Jul 24 2017.

OHNO, H. et al. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. **Cell Metab**, v. 15, n. 3, p. 395-404, Mar 7 2012.

OKLA, M. et al. Dietary Factors Promoting Brown and Beige Fat Development and Thermogenesis. **Adv Nutr**, v. 8, n. 3, p. 473-483, May 2017.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 10, p. 7153-64, Mar 05 2010.

QIANG, L. et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 620-32, Aug 03 2012.

QIU, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292-308, Jun 05 2014.

RACHID, T. L. et al. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 402, p. 86-94, Feb 15 2015.

RAHMAN, I.; CHUNG, S. Dietary polyphenols, deacetylases and chromatin remodeling in inflammation. **J Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 3, n. 4-6, p. 220-30, 2010.

RAVINDRANATH, N. H.; RAVINDRANATH, M. H. Green tea catechins suppress NF-kappaB-mediated inflammatory responses: relevance to nutritional management of inflammation. **Br J Nutr**, v. 105, n. 12, p. 1715-7, Jun 28 2011.

RAY, I.; MAHATA, S. K.; DE, R. K. Obesity: An Immunometabolic Perspective. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 157, 2016.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 11, p. 633-643, Nov 2017.

RISK FACTOR COLLABORATION, N. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, Apr 02 2016.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 9// 1999.

ROCHA, A. et al. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 7, p. 2231-44, Oct 2016.

RODGERS, J. T. et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 113-8, Mar 03 2005.

RODRIGUEZ, A. et al. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 309, n. 8, p. E691-714, Oct 15 2015.

RODRIGUEZ, S. K. et al. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. **Int J Cancer**, v. 118, n. 7, p. 1635-44, Apr 01 2006.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 20-44, Jan 16 2014.

ROSENWALD, M. et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 659-67, Jun 2013.

ROSENWALD, M.; WOLFRUM, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. **Adipocyte**, v. 3, n. 1, p. 4-9, Jan 01 2014.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 31-5, Sep 06 1979.

RUAN, H. B. et al. O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 306-17, Oct 09 2014.

SAE-TAN, S.; ROGERS, C. J.; LAMBERT, J. D. Decaffeinated Green Tea and Voluntary Exercise Induce Gene Changes Related to Beige Adipocyte Formation in High Fat-Fed Obese Mice. **J Funct Foods**, v. 14, p. 210-214, Apr 01 2015.

SAMBEAT, A. et al. Epigenetic Regulation of the Thermogenic Adipose Program. **Trends Endocrinol Metab**, v. 28, n. 1, p. 19-31, Jan 2017.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D. A. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 340-51, Mar 2014a.

_____. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. **Nat Commun**, v. 5, p. 4099, Jun 19 2014b.

SANCHEZ-GURMACHES, J. et al. Brown Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Storage and Thermogenesis. **Cell Metab**, Nov 15 2017.

SANG, S. et al. The chemistry and biotransformation of tea constituents. **Pharmacol Res**, v. 64, n. 2, p. 87-99, Aug 2011.

SANTULLI, G.; IACCARINO, G. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. **Maturitas**, v. 93, p. 65-72, Nov 2016.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26746-9, Nov 10 1995.

SCHULZ, T. J. et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 1, p. 143-8, Jan 04 2011.

SEALE, P. et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 961-7, Aug 21 2008.

SEIDELL, J. C. et al. Fasting respiratory exchange ratio and resting metabolic rate as predictors of weight gain: the Baltimore Longitudinal Study on Aging. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 16, n. 9, p. 667-74, Sep 1992.

SHIMIZU, M. et al. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 334, n. 3, p. 947-53, Sep 02 2005.

SHIN, D. W. et al. (-)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR gamma transactivation. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 1, p. 125-33, Jan 1 2009.

SIDOSSIS, L.; KAJIMURA, S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. **J Clin Invest**, v. 125, n. 2, p. 478-86, Feb 2015.

SOCCIO, R. E.; CHEN, E. R.; LAZAR, M. A. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. **Cell Metab**, v. 20, n. 4, p. 573-91, Oct 7 2014.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metab**, v. 23, n. 5, p. 770-84, May 10 2016.

SWIERCZYNSKI, J. et al. Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. **Metabolism**, v. 49, n. 5, p. 594-9, May 2000.

TACHIBANA, H. et al. A receptor for green tea polyphenol EGCG. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 4, p. 380-1, Apr 2004.

TAN, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 5, p. 935-40, Oct 2008.

TANAKA, M. et al. Expression of the 37-kDa laminin binding protein in murine lung tumor cell correlates with tumor angiogenesis. **Cancer Lett**, v. 153, n. 1-2, p. 161-8, May 29 2000.

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. **Cell Metab**, v. 17, n. 5, p. 644-656, May 07 2013.

TIMMONS, J. A. et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 11, p. 4401-6, Mar 13 2007.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147-56, Dec 30 1994.

TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutr Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 49-65, Feb 2015.

TRAYHURN, P.; JAMES, W. P. Thermoregulation and non-shivering thermogenesis in the genetically obese (ob/ob) mouse. **Pflugers Arch**, v. 373, n. 2, p. 189-93, Feb 22 1978.

TREMMELE, M. et al. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. **Int J Environ Res Public Health**, v. 14, n. 4, Apr 19 2017.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-46, Dec 2010.

VERNOCHET, C. et al. C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 17, p. 4714-28, Sep 2009.

VILLARROYA, F.; PEYROU, M.; GIRALT, M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. **Biochimie**, v. 134, p. 86-92, Mar 2017.

VILLARROYA, J.; CERREIJO, R.; VILLARROYA, F. An endocrine role for brown adipose tissue? **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 5, p. E567-72, Sep 01 2013.

WALDEN, T. B. et al. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 1, p. E19-31, Jan 01 2012.

WALTNER-LAW, M. E. et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **J Biol Chem**, v. 277, n. 38, p. 34933-40, Sep 20 2002.

WANG, G. X.; ZHAO, X. Y.; LIN, J. D. The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 5, p. 231-7, May 2015.

WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1338-44, Oct 2013.

WANG, W. et al. Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 40, p. 14466-71, Oct 07 2014.

WATANABE, M. et al. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 5, p. 775-84, May 2008.

WESTERTERP, K. R. Control of energy expenditure in humans. **Eur J Clin Nutr**, v. 71, n. 3, p. 340-344, Mar 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Obesity and overweight. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

WU, J.; JUN, H.; MCDERMOTT, J. R. Formation and activation of thermogenic fat. **Trends Genet**, v. 31, n. 5, p. 232-8, May 2015.

XIONG, L. G. et al. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitohormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*. **Redox Biol**, v. 14, p. 305-315, Sep 29 2017.

YANG, C. S. et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. **Mol Nutr Food Res**, v. 52 Suppl 1, p. S139-51, Jun 2008.

YE, L. et al. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 30, p. 12480-5, Jul 23 2013.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 64-71, 2006.

YU, X. X. et al. Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. **FASEB J**, v. 16, n. 2, p. 155-68, Feb 2002.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 01 1994.

ZHOU, X. et al. Epigallocatechin-3-Gallate Ameliorates Angiotensin II-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells through the Activation of Nrf2/Caspase-3 Signaling. **J Vasc Res**, v. 54, n. 5, p. 299-308, 2017.

ZOECHLING, A.; LIEBNER, F.; JUNGBAUER, A. Red wine: a source of potent ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Food Funct**, v. 2, n. 1, p. 28-38, Jan 2011.