



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

VICTOR AZEVÊDO VIEIRA

**ALTERAÇÕES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO FÍGADO DURANTE A
TERMOGÊNESE ADAPTATIVA**

Ribeirão Preto – SP

2023

VICTOR AZEVÊDO VIEIRA

**ALTERAÇÕES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO FÍGADO DURANTE A
TERMOGÊNESE ADAPTATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto – SP

2023

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

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP
Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Ficha Catalográfica

Vieira, Victor Azevêdo.

Alterações do metabolismo lipídico no fígado durante a termogênese adaptativa. Ribeirão Preto, 2023. 90 p., 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Leiria, Luiz Osório Silveira.

1. Termogênese adaptativa. 2. Fígado. 3. VLDL. 4. Metabolismo.

Autor: Victor Azevêdo Vieira

Título: Alterações do metabolismo lipídico no fígado durante a termogênese adaptativa.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

Aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

*“Nem tudo o que reluz é ouro,
Nem todos os que vagueiam estão perdidos;
O velho que é forte não murcha,
Raízes profundas não são atingidas pela
geada.*

*Das cinzas um fogo deve ser acordado,
Uma luz das sombras brotará;
Renovada será a lâmina que estava quebrada,
O sem coroa novamente será rei.”*

(J.R.R. Tolkien)

AGRADECIMENTOS

Início esta sessão de agradecimentos, dedicando este trabalho a Deus e agradecendo a Ele por estar comigo durante toda essa caminhada. É Ele quem me fortalece, me sustenta, onde encontro paz, e sei que nele eu sou mais que vencedor. Em Deus, tive o conforto em saber que minha dedicação e todo o esforço durante o mestrado, seriam recompensados.

Agradeço imensamente a minha esposa, Layana Vieira. Só Deus sabe o quão importante e necessária foi a tua companhia, de São Luís do Maranhão para Ribeirão Preto - São Paulo, para encararmos este desafio juntos. Você não teve dúvidas em nenhum momento, na verdade era seu desejo também, que mesmo recém casados, fôssemos de encontro a este desafio, essa experiência totalmente nova em nossas vidas, em uma cidade que não conhecíamos ninguém. Te agradeço por toda paciência, carinho, cuidado e por cada palavra amorosa que não me permitiu desanimar, e sim permanecer no propósito. Hoje, não sei como seria a minha saúde mental e física sem você por perto durante este período do mestrado. Te amo.

Agradeço ao meu mentor, Luiz Osório Silveira Leiria, pelas orientações semanais, encontros empolgados para discutirmos experimentos e resultados, por suas lições através da sua carreira e também pelas experiências de vida. Obrigado também pela paciência, confiança e inspiração.

Agradeço aos laboratórios e professores parceiros que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial, o Laboratório de Lipídeos Modificados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Agradeço também, a

disponibilidade e as contribuições dos professores que aceitaram fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Gratidão também aos meus pais, Júnior e Luciana, que foram o meu amparo durante a vida. Obrigado pela criação, sustento e o incentivo a buscar os desejos do meu coração, sendo justo e honesto, em tudo que eu fosse fazer.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Doenças Metabólicas (LPDM), que tornaram esta caminhada muito mais leve, pelo acolhimento, ajuda nos experimentos, nas discussões, e o suporte nos momentos difíceis. Agradeço em especial, a Nayara Pereira, pela grande amizade construída, que seguirá muito além da vida acadêmica.

Reconhecimento do Financiamento FAPESP: Este trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através da concessão da bolsa de mestrado e auxílio bancada – Processo nº 2021/01311-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Com esta bolsa de mestrado tive a manutenção financeira necessária para que eu realizasse o presente trabalho, sob a responsabilidade do meu orientador Luiz Osório Silveira Leiria, referente ao período de vigência da bolsa – 01/04/2021 a 31/03/2023. Destaco que durante este período, sobretudo no ano de 2021, ainda enfrentávamos a pandemia de Coronavírus (COVID-19) que abalou o mundo, e além disso, em nosso país, vivemos períodos de tamanho estímulo à descrença na ciência e na pesquisa por parte de alguns políticos. Sobre este último ponto, me solidarizei com os colegas que tiveram suas bolsas cortadas e agradei pela manutenção da minha bolsa fornecida pela FAPESP.

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

VIEIRA, V. A. **Alterações do metabolismo lipídico no fígado durante a termogênese adaptativa**. 2023. Dissertação (Mestrado Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

RESUMO

O crosstalk entre tecido adiposo (TA) e fígado é essencial para a manutenção da homeostase metabólica frente a diferentes condições de demanda energética. O fluxo de ácidos graxos (AGs) que são secretados pelo TA por meio de lipólise, migram para o fígado, onde então impactam o metabolismo lipídico e da glicose. Em situações de balanço energético negativo, como na exposição ao frio, este fluxo é aumentado sob estímulo adrenérgico, mas não resulta em esteatose hepática, além de ser necessário para atividade termogênica executada no Tecido Adiposo Marrom (TAM). Com base nessas evidências, e no fato de que o fígado exporta triglicérides (TGs) veiculados em VLDL para o TAM durante o frio, nos questionamos que alterações do metabolismo lipídico hepático ocorrem frente ao estresse térmico por frio e que por sua vez, influenciam o lipidoma do VLDL. Para tal, aventamos a hipótese de que o processo de termogênese adaptativa induz alterações metabólicas e de perfil lipídico no fígado que permitem que o mesmo não acumule gordura e exporte VLDL para sustentar a atividade termogênica do TAM. Sendo assim, avaliamos as alterações do metabolismo lipídico que ocorrem no fígado durante a termogênese adaptativa. Camundongos foram divididos igualmente em 4 grupos: Controle (tempo zero): Animais sob condição de termoneutralidade (30 °C); Grupos de 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio (5 °C). Nossos resultados revelam que a aclimação ao frio levou a redução de genes envolvidos na *de novo* lipogênese do fígado, principalmente *Scd1*. Observamos aumento da presença de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), especialmente aqueles do ômega-3, no fígado, apenas de forma crônica de desafio ao frio, ao mesmo tempo que vimos a normalização dos níveis de TGs, que sob estímulo agudo, estiveram aumentados. A lipidômica dos fígados destes animais revelou alterações profundas no perfil de AGs que incorporam os TGs. Na termoneutralidade, há predominância de ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e saturados (AGSs), enquanto que, após 7 dias de aclimação ao frio, AGPIs tais como: DHA, EPA, e ARA, estão predominantemente incorporados ao TG ao invés de AGMIs e AGSs. A expressão gênica e proteica da enzima taxa limitante para a biossíntese dos AGPIs supracitados, a *Fads2*, foi aumentada frente ao frio no TA branco, enquanto não houve alteração no fígado e no TAM. Avaliando consumo de oxigênio do fígado, observamos aumento da oxidação fosforilativa (OXPHOS), mas notamos decaimento da beta-oxidação nos tempos de aclimação ao frio. Este dado foi corroborado pelo aumento de coenzima Q (CoQ) e pelo acúmulo de acilcarnitinas. Em etapa final, avaliamos o perfil lipídico da fração de VLDL. Mais uma vez, notamos mudanças quanto ao perfil de incorporação de AGs aos TGs. AGPIs estão incorporados ao TG em maiores quantidades frente o desafio do frio já sob estímulo agudo e permanecem durante maior tempo de aclimação. Os dados de maneira geral, nos sugerem que o fígado durante a termogênese adaptativa, molda o seu metabolismo lipídico a fim de poupar espécies específicas de AGs que foram captados com o aumento da lipólise e da atividade de *Fads2* no TAB. O perfil desses AGs é modificado para incorporação em novos TGs que serão exportados na forma de VLDL, e que sustentarão a atividade termogênica do TAM.

Palavras-chave: Termogênese adaptativa. Fígado. VLDL. Metabolismo.

VIEIRA, V. A. **Changes in lipid metabolism in the liver during adaptive thermogenesis**. Dissertation (Master of Sciences in Pharmacology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

ABSTRACT

The crosstalk between adipose tissue (AT) and liver is essential for maintaining metabolic homeostasis in different conditions of energy demand. The flow of fatty acids (FAs) that are secreted by the AT through lipolysis migrate to the liver, where they then impact lipid and glucose metabolism. In situations of negative energy balance, such as exposure to cold, this flow is increased under adrenergic stimulation but does not result in hepatic steatosis, in addition to being necessary for thermogenic activity performed in brown adipose tissue (BAT). Based on this evidence, and on the fact that the liver exports triglycerides (TGs) conveyed in VLDL to the BAT during cold weather, we wonder what alterations in hepatic lipid metabolism occur in the face of cold heat stress and which, in turn, influence the lipids that make VLDL. To this end, we hypothesize that the process of adaptive thermogenesis induces metabolic and lipid profile changes in the liver that allow it not to accumulate fat and export VLDL to sustain the thermogenic activity of BAT. Therefore, we evaluated the changes in lipid metabolism that occur in the liver during adaptive thermogenesis. Mice were equally divided into 4 groups: Control (zero time): Animals under thermoneutral condition (30 °C); Groups of 1, 3 and 7 days of acclimatization to the cold (5 °C). Our results prove that acclimatization to cold led to the reduction of genes involved in new liver lipogenesis, mainly *Scd1*. We observed an increase in the presence of polyunsaturated fats (PUFAs), especially those of omega-3, in the liver, only in a chronic form of cold challenge, at the same time that we saw the normalization of TGs levels, which under acute stimulus, restrictions increased. Lipidomics of the livers of these animals revealed profound changes in the profile of FAs that incorporate TGs. In thermoneutrality, there is a predominance of monounsaturated fats (MUFAs) and saturated fats (SFAs), while, after 7 days of acclimatization to the cold, PUFAs such as DHA, EPA and ARA are predominantly incorporated into TG instead of MUFAs and SFAs. The gene and protein expression of the rate-limiting enzyme for the biosynthesis of the above-mentioned PUFAs, *Fads2*, was increased in front of the cold in the white AT, while there was no alteration in the liver and in the BAT. Evaluating the oxygen consumption of the liver, we observed the increase in the phosphorylative presentation (OXPHOS), but we noticed the decay of beta-oxidation in the times of acclimatization to the cold. This data was corroborated by the increase in coenzyme Q (CoQ) and acylcarnitine accumulation. In the final step, we evaluated the lipid profile of VLDL extraction. Once again, we noticed changes regarding the incorporation profile of FAs to TGs. PUFAs are incorporated into the TG in greater uses in face of the cold challenge already under acute stimulus and remain during longer acclimatization time. The data in general suggest that the liver, during adaptive thermogenesis, shapes its lipid metabolism in order to spare specific species of FAs that were captured with the increase in lipolysis and *Fads2* activity in WAT. The profile of these FAs is modified for incorporation into new TGs that will be exported in the form of VLDL, and that will sustain the thermogenic activity of BAT.

Keywords: Adaptive thermogenesis. Liver. VLDL. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura da lipoproteína	19
Figura 2	– <i>De novo</i> Lipogênese Hepática.....	22
Figura 3	– Classificação de lipídeos	25
Figura 4	– Esquema resumido da via de Sprecher	27
Figura 5	– Conversa entre fígado e tecido adiposo numa situação de balanço energético negativo como a exposição ao frio	29
Figura 6	– Ativação do metabolismo de ácidos graxos e o <i>nonshivering</i> termogênese no tecido adiposo marrom (TAM)	31
Tabela 1	– Sequência dos <i>primers</i> utilizados	38
Figura 7	– Genes da via lipogênica	50
Figura 8	– Histologia das amostras de fígado de animais que permaneceram em condição de termoneutralidade.....	51
Figura 9	– Lipidômica do fígado de camudongos mantidos em termoneutralidade ou em frio	52
Figura 10	– Análise de lipidômica do fígado que revela o aumento da incorporação de AGPIS em TAGS	53
Figura 11	– Análise de lipidômica do fígado de camundongos expostos ao frio por sete dias (7d) ou que estiveram sob condição de termoneutralidade	54
Figura 12	– Ensaio de ELISA para expressão proteica de Fads2 do Fígado	56
Figura 13	– Medida de LEAK, OXPHOS e ETS de amostras de fígado.....	58
Figura 14	– Quantificação de coenzima Q-9, coenzima Q-10 e coenzima-Q total	59
Figura 15	– Atividade Citrato Sintase, Cardiolipinas e Total Oxphos	60
Figura 16	– Expressão relativa de genes associados a dinâmica mitocondrial no fígado.....	61

Figura 17 – Imagens de hepatócitos captadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	62
Figura 18 – Quantificação de mitocôndrias e seus parâmetros morfológicos em hepatócitos.....	62
Figura 19 – Análise de componentes principais das frações de VLDL.....	64
Figura 20 – Análise isolada de AGPIs incorporados em TG na fração de VLDL	66
Figura 21 – Análise isolada de triglicérides totais, colesterol livre e vitamina E detectados em fração de VLDL	67
Figura 22 – Esquema da entrada de ácidos graxos na mitocôndria pelo transportador acilcarnitina/carnitina	75
Figura 23 – Esquema do modelo hipotético proposto.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	– Acetil-CoA Carboxilase
ACLY	– ATP-dependent Citrate Lyase
ADP	– Adenosina Difosfato
AGMI	– Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPIS	– Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGS	– Ácido Graxo Saturado
ALA	– Ácido α -linoleico
AMPC	– Adenosina Monofosfato Cíclico
AMPK	– Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
ARA	– Ácido Araquidônico
ATGL	– Adipose Triglyceride Lipase
ATP	– Adenosina Trifosfato
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETP	– Proteína de Transferência de Éster de Colesterol
ChREBP	– Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein
COA	– Coenzima A
CPT1A	– Carnitina Palmitoiltransferase I
CPT2	– Carnitina Palmitoiltransferase II
CS	– Citrato Sintase
DHA	– Ácido Docosaheptaenóico
DHGNA	– Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica
DNL	– De Novo Lipogênese
EHNA	– Esteatohepatite Não-alcoólica
ELISA	– Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ELOVL – Elongase

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

FADS – Fatty acid desaturase

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FASN – Ácido Graxo Sintase

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FT – Fator Transcricional

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

HL – Lipase Hepática

HSL – Hormone-sensitive Lipase

LA – Linoneic Acid

LPDM – Laboratório de Pesquisa em Doenças Metabólicas

L-PK – Liver-piruvate Kinase

LPL – Lipoprotein Lipase

MTTP – Microsomal Triglyceride Transfer Protein

OXPPOS – Oxidação Fosforilativa

PDH – Pyruvate Dehydrogenase Complex

PKA – Protein Kinase A

PLTP – Proteína de Transferência de Fosfolipídeos

PPAR – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid

RT-QPCR – Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

SCD – Stearoyl-CoA Desaturase

SCD1 – Estearoil-CoA Desaturase

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SREBP – Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TA – Tecido Adiposo
TAB – Tecido Adiposo Branco
TAM – Tecido Adiposo Marrom
TCA – Tricarboxylic Acid Cycle
TGS – Triglicérides
TRLS – Triglyceride-rich Lipoproteins
UCP1 – Uncoupling Protein 1
VLDL – Very Low-Density Lipoprotein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	LIPOGÊNESE HEPÁTICA	19
1.2	PUFAS E A FADS2	24
1.3	COMUNICAÇÃO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO	27
1.4	FÍGADO INFLUENCIA O METABOLISMO LIPÍDICO NO TAM DURANTE EXPOSIÇÃO AO FRIO DE CURTO PRAZO	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO FRIO	36
3.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR	37
3.3	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	39
3.4	ENSAIO DE <i>ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY</i> (ELISA) ..	40
3.5	ENSAIO DE RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO	40
3.6	ENSAIO DE β -OXIDAÇÃO	41
3.7	ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE	42
3.8	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS	43
3.9	ANÁLISE DE PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (GC-MS)	43
3.10	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E ANÁLISE LIPIDÔMICA DO FÍGADO	44
3.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	45
3.12	FRACIONAMENTO DO VLDL	46

3.13	HISTOLOGIA DO FÍGADO	47
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4	RESULTADOS	48
4.1	EXPOSIÇÃO AO FRIO ALTERA GENES DA VIA LIPOGÊNICA HEPÁTICA	48
4.2	ACLIMATAÇÃO AO FRIO ALTERA O PERFIL DO METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO	51
4.3	O FRIO MODULA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA ENZIMA FADS2 NO TAB	55
4.4	OS HEPATÓCITOS REDUZEM SUA TAXA DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS APÓS ACLIMATAÇÃO AO FRIO	57
4.5	OS HEPATÓCITOS ADAPTAM A CAPACIDADE DE OXPHOS AUMENTANDO OS NÍVEIS DE COENZIMA-Q	58
4.6	ACLIMATAÇÃO AO FRIO ALTERA O PERFIL LIPÍDICO DO VLDL	63
	5 DISCUSSÃO	69
	6 CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

A prevalência global das doenças metabólicas aumentou ao longo das duas últimas décadas, sobretudo diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a obesidade, que não só tiveram aumento da ocorrência como também não houve redução da taxa de mortalidade. Foram relatados mais de 43,8 milhões de casos de DM2 e mais de 5 milhões de óbitos relacionados a obesidade, apenas no ano de 2019 (CHEW *et al.*, 2023). As perturbações da homeostase da glicose, bem como alterações do metabolismo lipídico e do sistema imune, são exemplos de eventos que promovem o estresse metabólico, e que favorecem o desenvolvimento das doenças cardiometabólicas, tais como: DM2, dislipidemias, obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e aterosclerose (CHEW *et al.*, 2023; SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021; YIP *et al.*, 2023). Para desenvolver estratégias terapêuticas efetivas no combate dessas doenças, é imprescindível o maior entendimento dos mecanismos sistêmicos e moleculares associados ao estado metabólico saudável e patológico.

O fígado é um órgão que desempenha diversas funções vitais para o funcionamento ideal do organismo. É responsável por realizar a desintoxicação de inúmeras substâncias, armazenar nutrientes, gerenciar e produzir substratos energéticos, participar na promoção e resolução da inflamação, e principalmente, é um órgão central na manutenção da homeostase metabólica (KALRA *et al.*, 2018; PRIEST; TONTONNOZ, 2019; YAN; LI; LI, 2014). No âmbito do metabolismo lipídico, o fígado se destaca por ser um órgão capaz de captar, formar e exportar lipoproteínas para a circulação, sendo esta a principal forma de transporte dos lipídeos plasmáticos (FEINGOLD, 2022).

As lipoproteínas são compostas por micelas heterogêneas, possuindo

diferentes tamanhos, composição lipídica, conteúdo de apolipoproteína (APO) e tecido de origem. São partículas contendo um núcleo lipoproteico, hidrofóbico, com a presença de triglicerídeos (TG), ésteres de colesterol e vitaminas lipossolúveis, que é circundado por lipídeos de membrana na superfície, predominantemente fosfatidilcolina e colesterol não esterificado (**Figura 1**) (FEINGOLD, 2022; HEEREN; SCHEJA, 2021). Com base nas diferenças supracitadas, as lipoproteínas plasmáticas são divididas em sete tipos: quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e a lipoproteína A (FEINGOLD, 2022; HEEREN; SCHEJA, 2021).

A via de produção de lipoproteína exógena se inicia pela incorporação de lipídeos dietéticos aos quilomícrons (CM) ricos em TG, que são montados em torno de APOB48 no intestino delgado. Já a via endógena, é realizada no fígado pela produção de VLDL, que é formado em torno da APOB100, a versão completa da APOB produzida em hepatócitos. Os TG formados em hepatócitos são transferidos para APOB100 através da atividade da proteína *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTTP) formando então o VLDL, embora o mecanismo exato não seja totalmente elucidado (**Figura 2**) (GORDON; JAMIL, 2000; RAABE *et al.*, 1999).

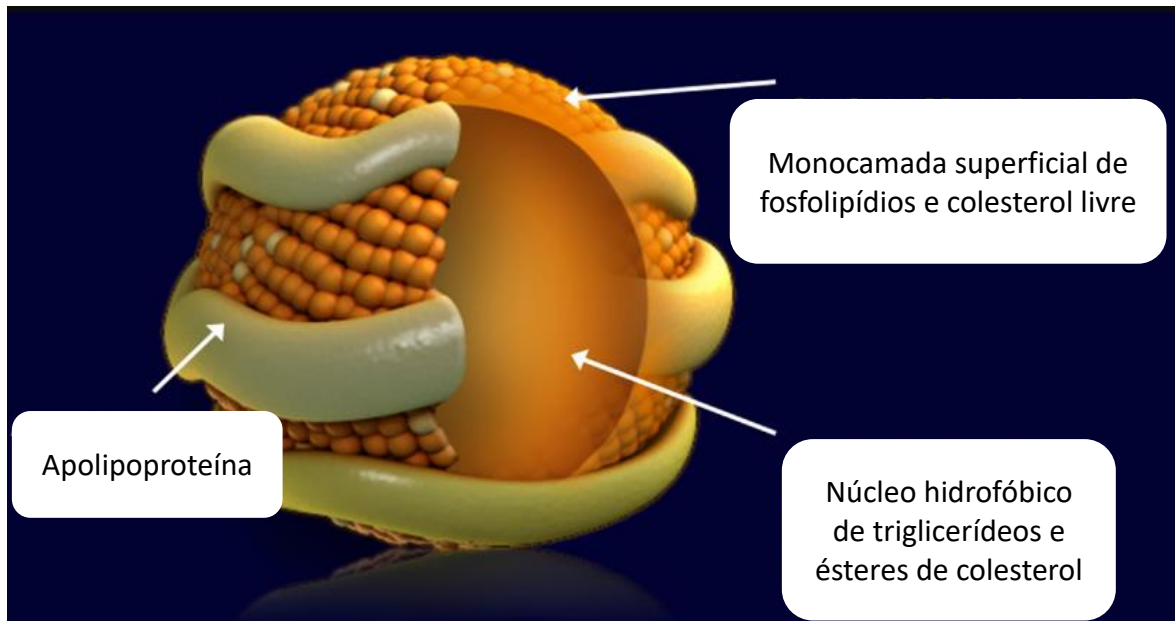
As lipoproteínas ricas em TG fazem o transporte de ácidos graxos pela circulação, onde são hidrolisadas pela lipoproteína lipase (LPL) com a presença do cofator APOC2, liberando ácidos graxos livres (AGs) no lúmen capilar de órgãos periféricos como tecidos adiposos, músculo esquelético e coração, onde esses AGs serão armazenados ou oxidados para geração de energia (BASU; GOLDBERG, 2020; VOS; VAN DE SLUIS, 2021). As lipoproteínas ao serem parcialmente degradadas pelas LPL, diminuem o seu conteúdo lipídico, tornando-se lipoproteínas

remanescentes, menores e enriquecidas com colesterol, que serão absorvidas no fígado por endocitose mediada por receptor (VOS; VAN DE SLUIS, 2021).

Uma fração considerável do VLDL remanescente é o IDL, que continua perdendo TG sob ação das lipases e também por processamento de enzimas como a lipase hepática (HL), proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e proteína de transferência de fosfolípídeos (PLTP), formando então o LDL rico em colesterol, no qual, parte do colesterol será entregue a órgãos periféricos e o restante retorna ao fígado (FEINGOLD, 2021; HEEREN; SCHEJA, 2021).

O fígado também é responsável pela produção de APOA1, a proteína estrutural fundamental na formação do HDL (HEEREN; SCHEJA, 2021). Esta é a lipoproteína de menor tamanho que, em seu estágio maduro de acúmulo de colesterol livre obtido das superfícies celulares, e de síntese de ésteres de colesterol, fará eventualmente a entrega destes ésteres de colesterol aos hepatócitos para serem digeridos no compartimento endolisossomal, sendo esse processo conhecido como transporte reverso do colesterol (FEINGOLD, 2021; HEEREN; SCHEJA, 2021; OUIMET; BARRETT; FISHER, 2019; POWNALL *et al.*, 2021). Deste modo, o fígado é intimamente relacionado ao controle do metabolismo lipídico, não só pela produção de VLDL que fará parte da entrega de AGs para órgãos periféricos, mas também por ser ponto focal na captação de AGs e captação/exportação de lipoproteínas.

Figura 1 – Estrutura da lipoproteína. A superfície das lipoproteínas é uma membrana hidrofílica que consiste em fosfolipídios, colesterol livre e apolipoproteínas que envolve um núcleo hidrofóbico central de lipídios apolares, principalmente ésteres de colesterol e triglicerídeos.



Fonte: Adaptada de Feingold (2021).

1.1 LIPOGÊNESE HEPÁTICA

O acúmulo de lipídeos hepáticos pode ser gerado através dos lipídeos advindos da dieta, da captação dos AGs circulantes e também pela lipogênese hepática *de novo* (DNL). A desregulação do equilíbrio entre a DNL e o catabolismo de ácidos graxos pela beta-oxidação, está diretamente associada ao favorecimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que é caracterizada pelo acúmulo patológico de triglicerídeos e outros lipídios nocivos aos hepatócitos, e que pode progredir aos estágios de Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e cirrose ou até mesmo hepatocarcinoma, sendo esses dois últimos estágios irreversíveis com terapia medicamentosa ou por mudança de hábitos (HEEREN; SCHEJA, 2021).

A via de lipogênese no fígado é fortemente regulada por fatores transcricionais (FTs), principalmente *Sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c) e *Carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP), que regulam a

expressão de genes lipogênicos e que são respectivamente responsivos aos níveis de insulina e xilulose-5-fosfato ou glicose-6-fosfato (DENTIN *et al.*, 2012; LINDEN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2015).

A proteína de ligação do elemento regulador de esteróis possui 3 isoformas envolvidas no metabolismo lipídico, sendo a SREBP1c, a isoforma mais expressa no fígado e capaz de ativar genes importantes para síntese de AGs, TGs e enzimas chave nesse processo (LINDEN *et al.*, 2018). Esse FT promove essa ativação por meio de reguladores de esteróis em áreas reguladoras dos genes lipogênicos, e é induzido por ação da insulina (CHEN *et al.*, 2004; SEO *et al.*, 2009). A insulina ativa a transcrição de mRNA do SREBP1c, assim como o processo proteolítico do seu precursor, para que então tenha a conformação com o N-terminal ativo, necessário para sua entrada no núcleo, e para que assim feito, possa realizar o papel da expressão gênica lipogênica (CHEN *et al.*, 2004; FORETZ *et al.*, 1999; LINDEN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2015).

De forma complementar e tão importante quanto a ativação de SREBP1c, é a indução de ChREBP para o estímulo cooperativo de genes glicolíticos e lipogênicos frente o estímulo insulínico e da glicose (KOO; DUTCHER; TOWLE, 2001). ChREBP é sensível a glicose e é amplamente expresso em tecidos metabólicos como o fígado. A isoforma ChREBP- β , recentemente descoberta, é induzida de forma constitutiva a partir da ação da glicose sobre a isoforma canônica ChREBP- α , mas também ativada por outros monossacarídeos, principalmente frutose, por mecanismos ainda pouco esclarecidos (HERMAN *et al.*, 2012; LINDEN *et al.*, 2018; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Deste modo, muitas enzimas que estão envolvidas na DNL e na síntese de TG, tem suas atividades influenciadas pelos FTs supracitados. A respeito destas

enzimas, participam do processo lipogênico a *fatty acid synthase* (FASN), *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), *ATP-citrate lyase* (ACLY), *Stearoyl-CoA desaturase-1* (Scd1) (WANG *et al.*, 2015).

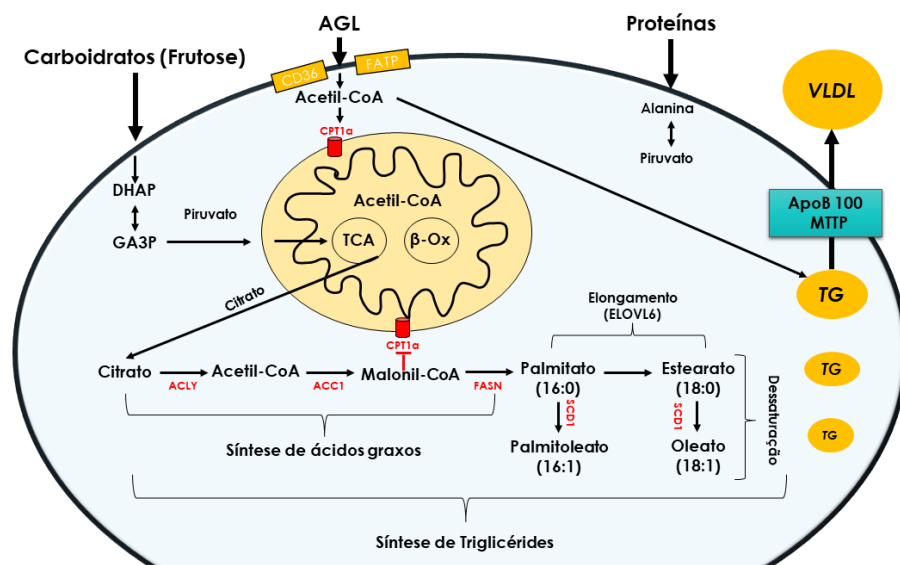
Na DNL, a geração de TG é realizada através do acúmulo de carboidratos como a glicose e frutose, que pela via da glicólise e ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH), são transformados em grandes quantidades de Acetil-CoA mitocondrial. O excesso de Acetil-CoA mitocondrial é exportado da matriz para o citoplasma na forma de citrato, após a passagem pelas reações do Ciclo do Ácido Cítrico (**Figura 2**). No hepatócito, o citrato é transformado novamente em Acetil-CoA pela ACLY. Além disso, o citrato é um ativador alostérico da ACC que promove a formação do Malonil-CoA a partir do Acetil-CoA, por adição do grupamento carboxilato (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016) (**Figura 2**).

Existem duas isoformas da ACC, 1 e 2, e ambas catalisam a conversão de Acetil-CoA em Malonil-CoA, sendo que ACC1 é expressa principalmente em tecidos lipogênicos, como no fígado, e é uma etapa limitante da velocidade na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa; já a ACC2 é expressa principalmente em tecidos oxidativos, como o coração, especificamente na membrana externa de mitocôndrias, onde o seu produto Malonil-CoA é capaz de inibir a carnitina palmitoiltransferase la (CPT1a), enzima que pode converter acil-CoA de cadeia longa em acilcarnitina, para que ocorra a transferência do AGs através da membrana mitocondrial para subsequente β -oxidação. Deste modo, a oxidação de AGs é limitada, enquanto a via lipogênica está atuante (WANG *et al.*, 2015; WU; HUANG, 2019).

Malonil-CoA é uma fonte de carbono muito importante para a síntese endógena de AGs, e a partir dele, a FASN adiciona dois carbonos estendendo a cadeia de acil graxo e formando o palmitato, um ácido graxo saturado de 16 carbonos

(C16:0) e principal produto da síntese de AGs (**Figura 2**). A partir do palmitato, várias etapas de modificação de cadeia ocorrem (elongação e dessaturação), onde a cadeia carbônica de ácido graxo é aumentada e duplas ligações são inseridas (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016) (**Figura 2**). Após essas modificações, os AGs formados são esterificados, juntamente a molécula de glicerol para formação dos TG, que são armazenados ou exportados na forma de VLDL (**Figura 2**) (HELLERSTEIN; SCHWARZ; NEESE, 1996; HODSON; GUNN, 2019).

Figura 2 – *De novo* Lipogênese Hepática. Esta figura destaca as alternativas de síntese e exportação de TG em hepatócitos, em especial a *de novo* lipogênese. Carboidratos como principalmente a frutose, passam por etapas de glicólise onde é formado o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e piruvato. O GA3P é utilizado para síntese de glicerol enquanto o piruvato adentra na mitocôndria, onde será convertido em citrato no ciclo de Krebs (TCA). A geração de Acetil-CoA mitocondrial em excesso, geralmente é presente em um cenário de balanço energético positivo, podendo também ser formado a partir da captação de ácidos graxos, por transportadores (FATPs) e receptores CD36, ou também gerado a partir do metabolismo de proteínas. O Acetil-CoA mitocondrial em excesso é exportado para o citosol na forma de citrato, onde é convertido novamente em Acetil-CoA por ação da ATP-citrato liase. Em seguida, o Acetil-CoA é convertido em Malonil-CoA por ação da Acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1). A ácido graxo sintase (FASN) realiza reações de adição de carbonos para a produção do palmitato, que passa por reações de alongamento e dessaturação. As etapas de alongamento são realizadas através da ELOVL6, e as etapas de dessaturação através da ação da enzima SCD1. Essas etapas de processamento geram ácidos graxos que serão incorporados ao glicerol por atividade de enzimas como GPAT, AGPAT, LIPIN1 e DGAT2 (não mostrado na figura), resultando nas moléculas de triacilglicerídeos, que podem ser incorporados a apolipoproteína B100 a partir da atividade da *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTTP) para a exportação como VLDL.



Fonte: Adaptada de Softic, Cohen e Kahn (2016).

Na etapa de dessaturação das cadeias de carbono dos AG, a atividade da enzima SCD1 é essencial para o processo de lipogênese. Ela é descrita como uma dessaturase $\Delta 9$, por inserir uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 em relação a extremidade carboxila. Através dessa atividade, ela catalisa a conversão do palmitato (C16:0) e o estearato (18:0), ácidos graxos saturados (AGS) gerados a partir do Malonil-CoA, em palmitoleato (C16:1) e oleato (C18:1) respectivamente, tornando-os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI).

Deste modo, uma forma de mensuração indireta do grau de atividade da enzima SCD1 é pela razão de AGMI/AGS presentes no hepatócito, no qual a razão é diretamente proporcional a sua atividade. Tanto AGS quanto AGMI são incorporados em diferentes espécies lipídicas, incluindo TG e os fosfolípidos durante a lipogênese, logo, o aumento da atividade da SCD1 é um indicativo do aumento da DNL no fígado. Já a diminuição da atividade de SCD1 está associada a melhora da sensibilidade insulínica e redução da lipogênese (ALJOHANI; SYED; NTAMBI, 2017; HYUN *et al.*, 2010).

A deficiência hepática de SCD1 causa redução significativa na expressão de genes lipogênicos no fígado e reduz a DNL associada a secreção reduzida de TG (ALJOHANI; SYED; NTAMBI, 2017; HYUN *et al.*, 2010). O fígado de animais obesos exibe elevada expressão e atividade da SCD1, enquanto em animais com menor atividade desta enzima há maior proteção contra o acúmulo de gordura hepática induzida por frutose (MIYAZAKI *et al.*, 2007). Assim sendo, diminuir a atividade desta enzima pode ser um alvo terapêutico para controle da obesidade e outras doenças metabólicas, incluindo DM2 e esteatose hepática (ALJOHANI; SYED; NTAMBI, 2017; HYUN *et al.*, 2010). Neste sentido, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) da família ômega 3 são descritos como potenciais agentes

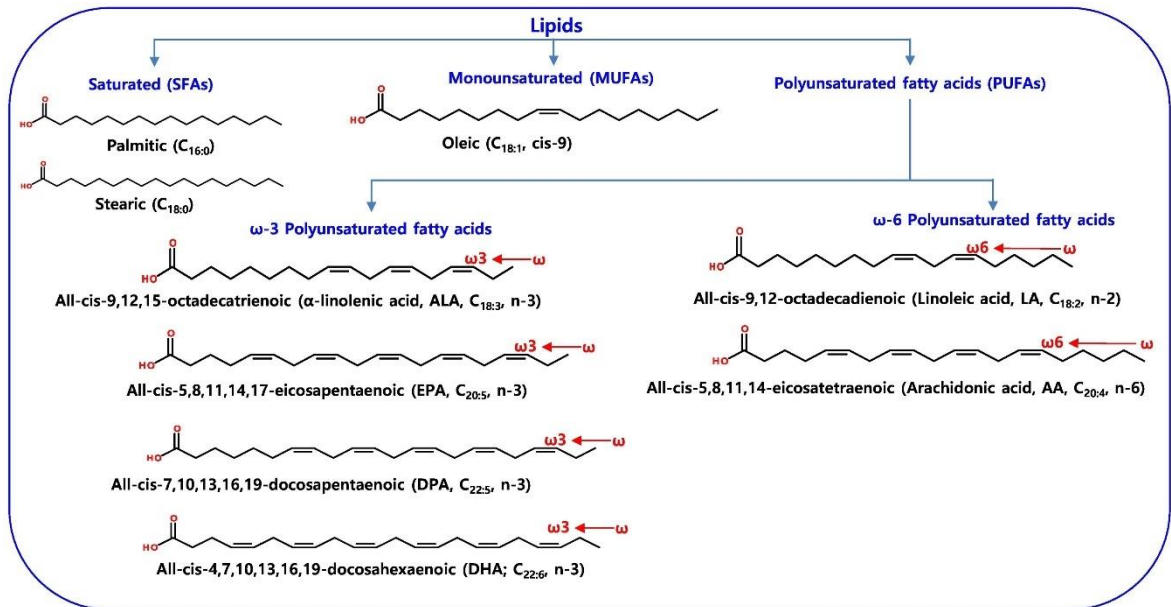
anti-lipogênicos, inibindo atividade da SCD1, seja pelo aumento de seus níveis no hepatócito, ou pela inibição dos fatores de transcrição SREBP1c e ChREBP (DENTIN *et al.*, 2005; TAKEUCHI *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2019).

1.2 PUFAS E A FADS2

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), ou também conhecidos como PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*, são ácidos graxos essenciais e não essenciais, obtidos em sua grande maioria a partir da dieta, onde são o principal componente do óleo de peixe e também estão presentes em outros alimentos, como óleos vegetais e castanhas em geral (KUMAR; BUTT; LEVENSON, 2016). Eles podem ser classificados, segundo a posição de duplas ligações deste modo, como da família ômega 3 (n-3 AGPI), ômega 6 (n-6 AGPI), ômega 9 (n-9 AGPI), e são caracterizados como ácidos graxos de cadeia longa que apresentam mais que uma dupla ligação (instauração) entre os carbonos de sua cadeia. O que determina a classificação da família, é o local onde está inserida a primeira dupla ligação em relação a extremidade do terminal metil da cadeia (**Figura 3**) (SAINI; KEUM, 2018).

Nos últimos anos, os AGPIs da família ômega 3 foram propostos como uma suplementação necessária, com potencial efeito protetor sobre doenças cardiovasculares e metabólicas, que foram relacionadas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de serem necessários na composição lipídica de membranas celulares (LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Sobre o fígado, os n-3 AGPIs parecem exercer um efeito supressor da lipogênese, principalmente nos estágios iniciais da DHGNA, por inibirem SREBP1c, ChREBP e SCD1 (DENTIN *et al.*, 2005; TAKEUCHI *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2019).

Figura 3 – Classificação de lipídeos. Os lipídeos podem ser classificados com base no número de ligações duplas presentes nas cadeias laterais: ácidos graxos saturados, monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados (na figura representados pelas siglas SFAs, MUFAs e PUFAs respectivamente). Na figura consta alguns dos principais representantes de cada classe, como por exemplo o ácido palmítico, oleico e os AGPIs EPA e DHA da família ômega 3. Os AGPIs podem ser classificados em ômega 3, 6 e 9 (este último não representado na figura), a depender da proximidade da primeira dupla ligação em relação a extremidade da cadeia contendo metil.



Fonte: Saiani e Keum (2018).

Os mecanismos de ação dos AGPIs sobre a lipogênese hepática ainda não são totalmente elucidados, mas sabe-se que são espécies lipídicas que possuem efeito regulatório essencialmente sobre a expressão gênica envolvida na lipogênese (JUMP *et al.*, 2008). É proposto que o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3) tenha ação supressora sobre a degradação proteossômica da forma precursora do SREBP-1c nuclear, que por consequência inibe a lipogênese (BOTOLIN *et al.*, 2006). Um outro mecanismo, é de que o DHA, assim como o ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3), podem diminuir a atividade do ChREBP, através do aumento da degradação do mRNA do ChREBP e alterando a translocação do ChREBP do citosol para o núcleo (DENTIN *et al.*, 2005).

Esses mecanismos controlam o aspecto de abundância nuclear desses FTs,

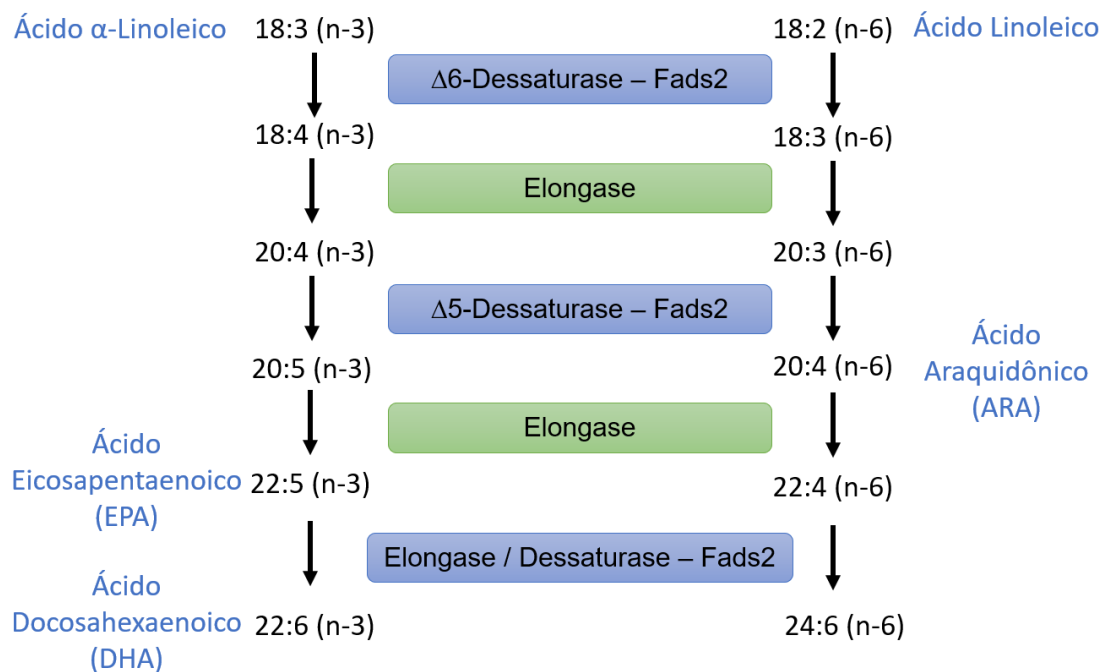
mas também é aceito que AGPIs podem atuar sobre os receptores PPAR, sigla inglês para *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*. Esses receptores possuem subtipos (α , β/δ , $\gamma 1$ e $\gamma 2$) e são regulados por ácidos graxos saturados e insaturados variando de comprimento entre 16 a 20 carbonos, sendo o PPAR α o subtipo mais abundante no fígado (XU *et al.*, 1999). No fígado, AGPIs, principalmente o EPA, podem se ligar a este receptor controlando sua atividade em relação a múltiplos genes-alvo envolvidos no transporte, ligação e metabolismo de ácidos graxos, evitando o acúmulo excessivo dos mesmos (JUMP *et al.*, 2008; XU *et al.*, 1999). AGPIs aparentemente, podem também suprimir a transcrição do gene *Liver-piruvate kinase* (L-PK) devido a supressão de ChREBP, indicando uma regulação da lipogênese mediada pelo controle da glicólise (DENTIN *et al.*, 2005; JUMP *et al.*, 2008).

O ácido α -linolênico (ALA) e o ácido linoleico (LA de *Linoleic acid*) são AGPIs precursores dos AGPIs ômega 3 e 6, respectivamente. O LA pode ser metabolizado em ácido araquidônico (ARA; 20:4 n-6), e o ALA pode ser metabolizado em ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3), que são os principais representantes da família ômega 3 (YANG *et al.*, 2019).

Apesar de limitada, a produção de AGPIs DHA e EPA, pode ocorrer a partir da conversão do ALA obtido por dieta, devido a atividade de enzimas dessaturases da família FADS1 e FADS2, e elongases (ELOVL2 e ELOVL5) (CASTRO; TOCHER; MONROIG, 2016). A via metabólica mais aceita para o processo de geração de PUFAs é a via de Sprecher (VOSS *et al.*, 1991) (**Figura 4**), onde as enzimas dessaturases e elongases, realizam modificações de alongamento e inclusão de duplas ligações na cadeia de ácidos graxos, que resulta na formação de várias espécies lipídicas de cadeia longa e poliinsaturada, incluindo DHA, EPA e ARA. Os níveis sanguíneos desses PUFAs são fortemente associados com a suplementação

dietética, mas também pela maior atuação de genes *Fads1* e *Fads2* que codificam as enzimas delta-5 dessaturase e delta-6 dessaturase, respectivamente (GLASER; HEINRICH; KOLETZKO, 2010), sendo a *Fads2* a principal enzima limitante da produção de PUFA. Estas enzimas atuam principalmente no tecido adiposo branco (TAB), tendo em vista que este é o principal reservatório de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) (LIN; CONNER, 1990).

Figura 4 – Esquema resumido da via de Sprecher. Esta figura mostra a principais etapas da via metabólica de conversão do ácido α -linoleico (ALA) em ácido eicosapentaenóico (C22:5, EPA) e docosahexaenóico (C22:6, DHA) a esquerda. A direita, temos a via de conversão do ácido linoleico em ácido araquidônico (ARA), dentre outros PUFA ω 6. Nestas vias, temos a participação fundamental de enzimas elongases e dessaturases, sobretudo a *Fads2*.



Fonte: Adaptada de Oboh *et al.* (2017).

1.3 COMUNICAÇÃO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO

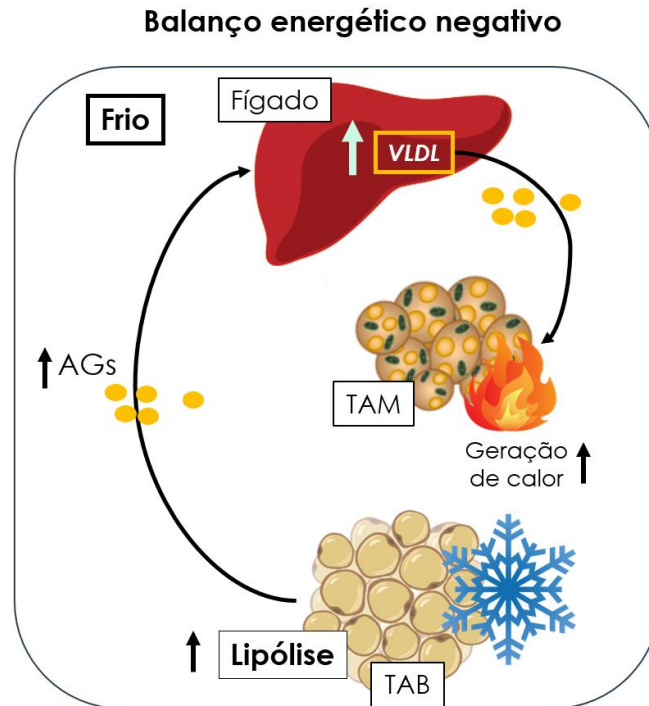
A comunicação entre fígado e tecido adiposo (TA) é essencial para a regulação da homeostase metabólica, sobretudo do metabolismo de lipídeos, tendo

em vista que eles são órgãos centrais no papel do armazenamento, produção e distribuição de lipídeos aos demais órgãos, frente a diferentes condições de demanda energética (HEEREN; SCHEJA, 2021; PRIEST; TONTONNOZ, 2019).

O fluxo de AGs, secretados pelo TAB por meio da lipólise é direcionado ao fígado, onde o metabolismo lipídico e da glicose são impactados (PRIEST; TONTONNOZ, 2019). Este fluxo, está presente tanto em situações de balanço energético positivo (p. ex. na resistência à insulina associada a obesidade) como em situações de balanço energético negativo (p. ex. exposição ao frio ou jejum prolongado) (**Figura 5**), sendo que nestes cenários, o TAB visceral e subcutâneo possuem maior relevância metabólica (SCHEJA; HEEREN, 2016; SIMCOX *et al.*, 2017).

Na primeira situação, os adipócitos hipertróficos e resistentes à insulina secretam citocinas pró-inflamatórias, mais AGs e menos adiponectina para o fígado, contribuindo para o quadro de esteatose hepática. Já na segunda situação (p. ex. exposição ao frio), o fluxo de AGs para o fígado é sustentado pelo aumento da lipólise no TAB, mas sem ocorrência do acúmulo de lipídeos no fígado. Neste caso, os AGs são esterificados na forma de TG, os quais serão utilizados na formação do VLDL que rapidamente é captado pelo tecido adiposo marrom (TAM) termogênico. Além disso, ocorre o aumento da gliconeogênese hepática fornecendo glicose para o TAM, e também o aumento da produção de ácidos biliares que estimulam a termogênese adaptativa, promovendo o escurecimento do TAB. Este *crosstalk* com o TAM evidencia o fígado como um órgão essencial para a termoregulação (ABUMRAD, 2017; SCHEJA; HEEREN, 2016; SIMCOX *et al.*, 2017).

Figura 5 – Conversa entre fígado e tecido adiposo numa situação de balanço energético negativo como a exposição ao frio. Durante a exposição ao frio, o fluxo de ácidos graxos (AG) para o fígado é sustentado pelo aumento da lipólise no tecido adiposo branco (TAB). No fígado, a produção de VLDL é fundamental para a entrega de AG como substrato energético que alimentará a atividade termogênica exercida no tecido adiposo marrom (TAM).



Fonte: Adaptada de Abumrad (2017).

A termogênese induzida pela exposição ao frio é um processo energeticamente exigente. O sistema nervoso simpático (SNS) estimula a liberação de catecolaminas, como noradrenalina e adrenalina, que sinalizam via receptores β 3-adrenérgicos em adipócitos brancos e marrons (HOEKE *et al.*, 2016). Essa sinalização ativa o eixo de síntese de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), que ativa a proteína cinase A (PKA), que por sua vez estimula o aumento da lipólise, principalmente a partir da ação da *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) e *Hormone-sensitive lipase* (HSL), as quais realizam a hidrólise de TGs para que haja maior captação de ácidos graxos livres e ativação da termogênese nos adipócitos marrons (**Figura 6**) (CARPENTIER *et al.*, 2018; HOEKE *et al.*, 2016; RAMSEYER; GRANNEMAN, 2016; SIMCOX *et al.*, 2017).

No TAM, as células de gordura são especializadas na regulação da homeostase energética. Uma maneira de regulação é através da captação dos AGs para sustentação da termogênese. O TAM pode captar AGs de algumas maneiras: através da circulação, quando transportadores específicos permitem a entrada destes AGs para o interior da célula; através da captação do VLDL, que pode ser endocitado mediado por receptor próprio, mas também, pode passar pelo processamento de LPL liberando AGs; e também a partir de partículas de *triglyceride-rich lipoproteins* (TRLs) previamente processadas por LPL em células endoteliais adjacentes aos adipócitos, que podem ser captadas por receptores CD36 do tipo *scavenger* (SHIN *et al.*, 2022; SIMCOX *et al.*, 2017; SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022).

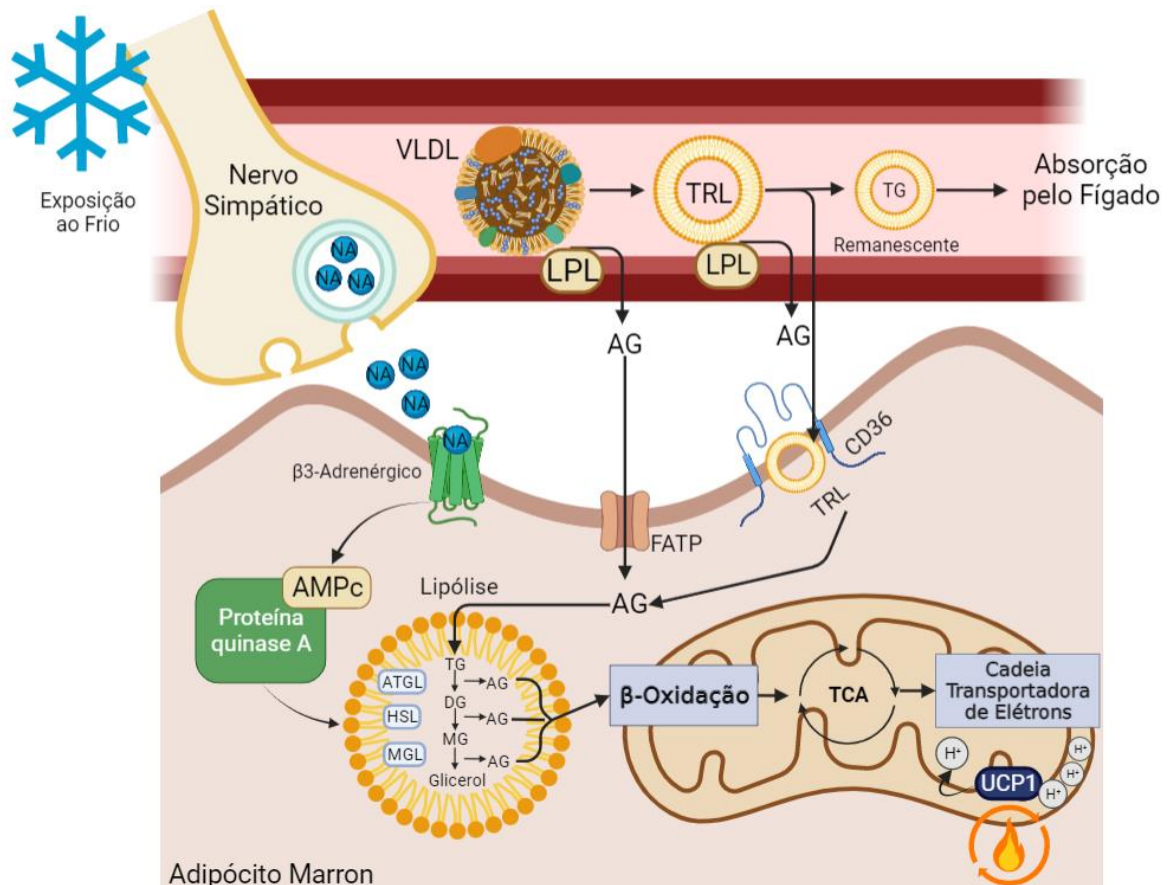
Além disso, o adipócito marrom se utiliza dos AGs que são lançados no citosol a partir da atividade lipolítica acentuada durante a exposição ao frio. Assim, os AGs podem ser utilizados como combustível necessário para a sustentação da produção de calor, através da beta-oxidação e do aumento da atividade da *Uncoupling Protein 1* (UCP1), num processo conhecido como termogênese adaptativa (**Figura 6**) (SHIN *et al.*, 2022; SIMCOX *et al.*, 2017; SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022).

Importante ressaltar, que o catabolismo da glicose é também necessário para sustentação da produção de calor na gordura termogênica mediante exposição a diferentes estímulos, como exposição ao frio, agonismo β -adrenérgico ou por dieta (SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022).

Os adipócitos marrons, são células ricas em mitocôndrias e que dissipam energia na forma de calor por meio de mecanismos dependentes e independentes da UCP1. Se tratando do principal mecanismo para geração de calor, a UCP1 é regulada sob estímulo das vias dependentes da via AMPc/PKA e pela ativação por AGs (SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022). A UCP1 então, permite o retorno de prótons

do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial sem passar pela síntese de ATP para a matriz mitocondrial, gerando um potencial elétrico intermembrana da mitocôndria, capaz de produzir calor (BETZ; ENERBÄCK, 2018; CHOUCANI; KAZAK; SPIEGELMAN, 2019).

Figura 6 – Ativação do metabolismo de ácidos graxos e o *nonshivering* termogênese no tecido adiposo marrom (TAM). A exposição ao frio estimula a sinalização adrenérgica por meio do sistema nervoso simpático. Esta sinalização ativa o eixo AMPc/PKA potencializando a lipólise e a liberação de ácidos graxos. A sinalização adrenérgica também estimula a transcrição de UCP1 e PGC1- α para termogênese (não representado na figura). O TAM pode captar uma grande quantidade de substratos energéticos como a glicose, aminoácidos de cadeia ramificada (não representado na figura) e ácidos graxos livres da circulação para geração de calor. A captação de AGs da circulação é mediada por transportadores de AGs (FATPs), o VLDL é processado pela LPL no lúmen capilar liberando AGs, lipoproteínas ricas em TG (TRL) podem ser processadas pela LPL no endotélio adjacente ao TAM, permitindo a sua absorção por CD36 que libera AGs após ação da lipase ácido lisossomal (não representado na figura). Os triglicérides remanescentes são absorvidos e processados pelo fígado. Os AGs são oxidados via β -oxidação, liberando coenzimas oxireduzases e Acetil-CoA que passam por sucessivas reações no *tricarboxylic acid cycle* (TCA), fornecendo mais coenzimas oxireduzases que alimentarão a cadeia transportadora de elétrons. Nas mitocôndrias, a UCP1 permite o vazamento de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, gerando calor.



Fonte: Hoeke *et al.* (2016).

1.4 FÍGADO INFLUENCIA O METABOLISMO LIPÍDICO NO TAM DURANTE EXPOSIÇÃO AO FRIO DE CURTO PRAZO

O organismo lida com diferentes estímulos e desafios nutricionais a fim de manter a homeostase metabólica, através de um sistema regulado por várias vias que sinalizam a ingestão, disposição, armazenamento e utilização de energia (YE; MEDZHITOV, 2019). A manutenção do balanço energético é garantida através da comunicação intertecidual, que se dá principalmente através de lipídios, peptídios ou metabólitos secretados na circulação (PRIEST; TONTONNOZ, 2019). Estes agentes servem como comunicadores do estado energético (estresse térmico, jejum, dieta hiperlipídica, etc...), e atuam nos demais tecidos promovendo sinalização e mudança de função (LEIRIA *et al.*, 2019; LYNES *et al.*, 2017; THOMOU *et al.*, 2017).

Os lipídios secretados com a capacidade de produzirem diversos efeitos no metabolismo de órgãos alvos são chamados de lipocinas (PRIEST; TONTONNOZ, 2019). Lipocinas, tais como: o 12-HEPE e o 12,13 di-HOME são secretadas pelo TAM frente aos estímulos de exposição ao frio e do exercício, respectivamente (LEIRIA *et al.*, 2019; LYNES *et al.*, 2017). O 12-HEPE secretado pelo TAM durante a exposição ao frio, foi capaz de promover captação de glicose no próprio TAM e também no tecido muscular esquelético (LEIRIA *et al.*, 2019), enquanto que o 12,13 di-HOME facilita a captação e oxidação de AGs também no TAM e músculo esquelético (LYNES *et al.*, 2017).

Neste sentido, os adipócitos termogênicos possuem um papel endócrino importante, liberando moléculas distintas que regulam o balanço energético e a homeostase da glicose e de lipídios por promover a utilização destes macronutrientes pelos tecidos (SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022). No entanto, ainda é

necessário o aprofundamento dos mecanismos envolvidos no destino metabólico desses substratos e de como estes, a exemplo dos lipídeos, podem influenciar a atividade da gordura termogênica.

Como fora supracitado, os lipídios são substratos energéticos necessários para a sustentação da atividade termogênica no TAM sob a exposição ao frio. Indivíduos obesos possuem maior dificuldade na eliminação de TRLs circulantes pelo TAM (SAARI *et al.*, 2020) e possuem menor ativação deste tecido (LEITNER *et al.*, 2017). Ainda, indivíduos com TAM detectável e ativo possuem menores níveis de TG e glicose circulantes quando comparados com indivíduos, cujo TAM não foi detectável por PET-CT (BECHER *et al.*, 2021). O TAM promove melhora da saúde metabólica a partir da sua atividade termogênica sustentada pela captação de TRLs circulantes, em que, o fígado possui importante relação na produção destes lipídeos (SIMCOX *et al.*, 2017; SPONTON; LIMA-JUNIOR; LEIRIA, 2022).

Na adaptação ao frio, o estímulo adrenérgico estimula maior liberação de AGs pelo TAB que serão captados pelo TAM como fonte primária de combustível, mas também são transferidos para o fígado para a formação de espécies lipídicas, como acil-carnitinas e TRLs (BLONDIN *et al.*, 2017; SIMCOX *et al.*, 2017). No fígado, os lipídios podem ser incorporados como fosfolipídios de membrana, podem ser oxidados, ou mesmo serem re-esterificados e incorporados em TGs para subsequentemente, serem incorporados em partículas de VLDL, sendo então, exportados para outros tecidos. Partículas de VLDL são transportadas e entregues no TAM e são capazes de modular a atividade termogênica, expressão gênica e a atividade secretória do TAM (SHIN *et al.*, 2022; SIMCOX *et al.*, 2017).

Neste sentido, foi demonstrado que o receptor de VLDL (VLDLR) executa uma função importante na captação de VLDL circulante. Este receptor está presente em

tecidos adiposos, coração, rins e músculo esquelético, mas no TAM, o VLDL captado via VLDLR em adipócitos marrons, potencializa a propriedade termogênica, importante na adaptação ao frio. A depuração de VLDL circulante durante adaptação ao frio, de fato é exercida em maior parte pelo TAM. Camundongos que tiveram a secreção hepática de VLDL inibida foram menos tolerantes ao frio, com diminuição da expressão de genes termogênicos estimulados pelo frio, da mesma forma que os níveis de UCP1 foram atenuados no TAM (SHIN *et al.*, 2022).

Estes resultados foram similares aos apresentados por camundongos nocaute para VLDLR, os quais tiveram a sua atividade termogênica restaurada pela expressão ectópica de VLDLR em adipócitos marrons. A partir do eixo VLDL-VLDLR, o VLDL captado por adipócitos marrons passa por uma degradação lisossômica para gerar metabólitos lipídicos para oxidação mitocondrial. Para além disso, a atividade do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) β/δ é melhorada pelo eixo VLDL-VLDLR em adipócitos marrons, podendo aumentar a expressão de genes termogênicos (SHIN *et al.*, 2022).

Com base nessas evidências, e no fato de que o fígado exporta TGs veiculados em VLDL para o TAM durante o frio, nos questionamos como as alterações hepáticas frente ao estresse térmico por frio influenciam o lipidoma do VLDL, para que este então, influencie o lipidoma do TAM. Para tal, aventamos a hipótese de que o processo de termogênese adaptativa induz alterações metabólicas e de perfil lipídico no fígado, que permitem que o mesmo não acumule gordura e exporte VLDL para sustentar a atividade termogênica do TAM (SHIN *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações do metabolismo lipídico no fígado durante a termogênese adaptativa e como as mesmas interferem no perfil lipídico de partículas de VLDL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as alterações lipídicas do fígado durante a exposição ao frio e investigar sobre a origem de tais alterações;
- b) Analisar as alterações temporais do metabolismo lipídico no fígado durante exposição ao frio;
- c) Avaliar as alterações lipídicas das partículas de VLDL após aclimação ao frio.

3 METODOLOGIA

3.1 UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO FRIO

Utilizamos camundongos de linhagem C57BL6/J de 12 semanas de vida, provenientes do serviço de Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Os animais estiveram condicionados no biotério de experimentação da Farmacologia no prédio central da FMRP, que conta com um ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro (12/12h), umidade relativa entre 45-55% e acesso livre à água e comida (*chow diet*) (NUVILAB CR-1Ò-Sogorb Inc). A composição da dieta da Nuvilab contém 70% das calorias provindas de carboidratos, 20% de proteína e 10% de gordura.

Para experimentos de exposição ao frio, 32 Camundongos foram divididos igualmente em 4 grupos: Controle (tempo zero): Animais que permaneceram na condição de termoneutralidade (30°C) durante 7 dias; Grupos de 1, 3 e 7 dias de exposição ao frio (5°C). Em outro experimento, utilizamos 14 animais, divididos em grupo controle que permaneceu em termoneutralidade por 7 dias (tempo zero) e o grupo com 7 dias de exposição ao frio (5°C). Os animais que estiveram sob exposição ao frio, foram alocados de maneira isolada, em câmara ambientada, com água e ração a disposição. Os grupos de animais foram eutanasiados respeitando o período de aclimação determinado, no mesmo dia e de forma pareada, sempre Termoneutralidade *versus* Frio.

Para obtenção de amostras de fígado para microscopia eletrônica, 8 animais foram utilizados para o experimento, divididos igualmente em grupo controle (termoneutralidade 30°C) e grupo frio (5°C). Eutanásia desses animais foi realizada

da mesma maneira que fora supracitado. Para fins experimentais, foram coletados: plasma, fígado, tecido adiposo branco perigonadal (TABpg) e subcutâneo (TABsub), e TAM. Todos os protocolos foram aprovados pela CEUA-68/2021 do campus da USP de Ribeirão Preto.

3.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

A extração de RNA total de cada tecido foi realizada utilizando o Trizol (ThermoFisher), clorofórmio e isopropanol como reagentes de extração. Primeiro foi realizado o homogenato dos tecidos utilizando *Tissue Homogenizer e beads*, sempre preservando a temperatura. Para tal, foi utilizado Trizol com volumes variados a depender do tecido e da quantidade, mas de maneira geral, as amostras foram homogeneizadas em Trizol (300~600 uL), centrifugadas ainda com as *beads* (12.000 rpm por 10' 4°C) e depois fora coletado o intranadante de cada tubo de amostra para a seguinte adição de clorofórmio na proporção de 200:1000 de Trizol utilizado.

Após a mistura, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm por 10' 4°C) e o sobrenadante obtido foi coletado (havendo ainda muito debri/gordura as amostras eram centrifugadas novamente). O sobrenadante coletado (sem a porção de DNA) é adicionado em tubos já contendo isopropanol gelado na proporção de 500:1000 de trizol. As amostras foram vortexadas e centrifugadas (15.000 rpm 10' 4°C) e deixadas por 30' em -20°C. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas (15.000 rpm 10' 4°C), e por inversão, o isopropanol foi descartado em camada de papel molhado com etanol 70%, restando o RNA na forma de *pellet* que podia ser visualizado ou não.

Foram feitas duas etapas de lavagem com etanol 75% e a última com etanol

100%, sendo que entre as lavagens, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm 10' 4°C). Após a última lavagem, o RNA total extraído foi ressuspenso em 20–40 uL de água *nuclease free* e levado em banho seco (55°C) por 15'. Depois, as amostras foram vortexadas, feito um *spin*, e então o RNA foi quantificado e normalizado. Após a normalização, foi utilizado 1000 ng de RNA para a reação de síntese cDNA, através do kit Mix da MultiScribe Reverse Transcriptase (ThermoFisher). Ao fim dos ciclos da reação, cada amostra foi diluída 10x (volume final de 100 uL) com água deionizada MilliQ. Para a reação de PCR em volume final de 10 uL, foram utilizados 3,7 uL da amostra de cDNA, 2,9 uL de SYBR Green Master Mix + Primers (forward e reverse 0,4 uL cada) de cada gene trabalhado (**Tabela 1**) + 3,4 uL de água deionizada MilliQ.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* utilizados

Acaca – F	GATGAACCATCTCCGTTGGC
Acaca – R	GACCCAATTATGAATCGGGAGTG
Acadl – F	AAACGTCTGGACTCCGGTTC
Acadl – R	GTACCACCGTAGATCGGCTG
Arbp – F	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC
Arbp – R	TCGGGTCCTAGACCAGTGTTTC
Cox5b – F	TTCAAGGTTACTTCGCGGAGT
Cox5b – R	CGGGACTAGATTAGGGTCTTCC
Chrebp-b – F	TCTGCAGATCGCGTGGAG
Chrebp-b – R	CTTGTCCCGGCATAGCAAC
Drp1 – F	CAGGAATTGTTACGGTTCCTAA
Drp1 – R	CCTGAATTA ACTTGTCCCGTGA
Dgat2 – F	GCGCTACTTCCGAGACTACTT
Dgat2 – R	GGGCCTTATGCCAGGAACT
Fads2 – F	AAGGGAGGTAACCAGGGAGAG
Fads2 – R	CCGCTGGGACCATTTGGTAA
Fasn – F	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
Fasn – R	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG

(Cont.)

Mfn1 – F	CCTACTGCTCCTTCTAACCCA
Mfn1 – R	AGGGACGCCAATCCTGTGA
Mfn2 – F	CTGGGGACCGGATCTTCTTC
Mfn2 – R	CTGCCTCTCGAAATTCTGAAACT
MTTP – F	CTCTTGGCAGTGCTTTTTCTCT
MTTP – R	GAGCTTGTATAGCCGCTCATT
Scd1 – F	TTCTTGCGATACTCTGGTGC
Scd1 – R	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
Srebp1c – F	TGACCCGGCTATTCCGTGA
Srebp1c – R	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC

Fonte: o próprio autor.

3.3 ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING*

Foram realizados homogenatos das amostras de tecidos (15 a 30 mg) em tampão RIPA (Cell Signaling Technology), contendo um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Thermo Fisher Scientific). Depois as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm por 20' a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Em casos de acúmulo de gordura no sobrenadante, a etapa de centrifugação foi repetida. A concentração de proteína foi determinada a partir dos sobrenadantes usando kit Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific).

Os lisados foram então desnaturados em tampão Laemmli (0,5 M Tris, 30% glicerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,012% azul de bromofenol) e aquecidos a 95°C ou outras temperaturas a depender do alvo, durante 5 minutos. As proteínas (30 µg) foram carregadas e carreadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 6% a 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), o bloqueio foi realizado em leite 5% em *tris-buffered saline* (TBS-T) por

diferentes tempos à temperatura ambiente, seguido de incubação com o anticorpo primário, três lavagens em TBS-T e incubação com anticorpo secundário. As proteínas foram visualizadas por quimioluminescência usando *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) no aparelho *ChemiDoc* (Bio-Rad). Para quantificar a densidade da banda, foi utilizado o *software* ImageJ, circundando a área da banda, onde os dados extraídos foram tratados estatisticamente.

3.4 ENSAIO DE *ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY* (ELISA)

Para investigação de expressão proteica da Fads2 e Malonil-CoA, realizamos ensaio de ELISA. Para Fads2, utilizamos amostras de fígado, TABpge TABsub, as proteínas foram extraídas, quantificadas e normalizadas da mesma maneira que foi descrito na seção de *Western Blotting*. Após essas etapas, as proteínas de cada amostra foram utilizadas no kit *MyBioSource Fish Fatty Acid Desaturase 2 ELISA Kit*. Para Malonil-CoA, foram utilizadas amostras de proteína de fígado, no kit *MyBioSource Malonyl coenzyme A 2 ELISA Kit*. As etapas dos ensaios foram seguidas de acordo com o recomendado por cada kit.

3.5 ENSAIO DE RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

Foram utilizadas amostras frescas de fígado (~5mg) para o ensaio de respirometria através do Oxygraph-2k (Oroboros®). Inicialmente, as amostras foram permeabilizadas em tampão BIOPS (2,77 mM Ca²⁺-EGTA, 7,23 mM EGTA, 6,26 mM MgCl₂.6H₂O, 20 mM taurina, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol, 0,5 mM DTT, 50 mM KMES e 5,77 mM ATP) contendo 0,02% saponina, por 5 minutos em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram transferidas para as cubas do oxígrafo,

previamente preenchidas com 2,0 mL de tampão Mir 05 (20 mM HEPES, 10 mM K₂HPO₄, 110 mM sacarose, 20 mM taurina, 60 mM K-lactonobionato, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 1 g.L⁻¹ BSA livre de ácidos graxos, pH 7,1) para medição dos estados respiratórios.

No estado de respiração LEAK (ou basal) avaliamos o consumo de oxigênio do tecido na presença de Succinato (5 mM), Malato (10 mM) e Glutamato (10 mM). No estado de OXPHOS, vimos a capacidade de fosforilação oxidativa através do estímulo com ADP (44 mM). No estado ETS (do inglês, *electron transfer system*), nós observamos a capacidade máxima de transporte de elétrons estimulada pela adição do desacoplador CCCP (1 μM). O estado de consumo não-mitocondrial de O₂ (ROX) foi avaliado pela adição de 1 mM NaCN. ROX foi subtraída dos valores de OCR de cada estado, que em seguida foram corrigidos pela atividade de citrato sintase (CS) de cada amostra. As amostras foram analisadas de forma pareada, sempre uma amostra de termoneutralidade *versus* exposição ao frio.

3.6 ENSAIO DE β-OXIDAÇÃO

Para o ensaio de β-oxidação, também foram utilizadas biópsias frescas de fígado (~ 5 mg), permeabilizadas por 5 minutos em BIOPS contendo 0,02% saponina. As amostras foram então transferidas para o oxígrafo, previamente preenchido com 2,0 mL de tampão Mir 05. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi mensurada na presença de malato (10 mM) e ADP (44 mM). Em seguida, adicionou-se palmitoil-carnitina (5 mM) às cubas, para medição da OCR associada à beta-oxidação. O estado de consumo não-mitocondrial de O₂ (ROX) foi avaliado pela adição de 1 mM NaCN. ROX foi subtraída dos valores de OCR de cada estado. Dos valores de OCR obtidos pela adição de ácido graxo, subtraiu-se o valor de OCR medido na presença de

ATP/malato. Este valor foi considerado como OCR de beta-oxidação, que em seguida foi corrigida pela atividade de CS das amostras avaliadas. As amostras foram analisadas de forma pareada, sempre uma amostra de termoneutralidade *versus* exposição ao frio.

3.7 ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE

A atividade de CS foi avaliada para as amostras recuperadas das cubas do oxígrafo. O volume das cubas com amostra foi aspirado, centrifugado a 5.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi lavado 3 vezes com tampão HBSS 1X (KCl 0,4 mg/mL, KH₂PO₄ 0,06 mg/mL, NaHCO₃ 0,35 mg/mL, NaCl 8 mg/mL, Na₂HPO₄.7H₂O 0,09 mg/mL, glicose 1 mg/mL, pH 7,2), para remoção total de BSA. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tampão adequado (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100), contendo coquetel inibidor de protease comercialmente disponível.

O homogenato foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas pelo método de Bradford. 5 µg de proteína total foram utilizados para o ensaio, diluídos em 200 µL de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 8,0 contendo 100 µM de DTNB e 62,5 uM Acetil-CoA. A reação foi iniciada pela adição de 312,5 µM de oxaloacetato, e monitorada por 3 minutos em leitor de placas (absorbância em 412 nm). A inclinação das retas obtidas foi considerada como atividade de CS.

3.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS

Para quantificação de lipídeos totais no fígado dos camundongos, foi realizada a extração com surfactante NP-40 e quantificação através do kit da labtest. Primeiramente, os tecidos foram pesados e homogeneizados com 500 μL de uma solução aquosa contendo 5% (v/v) de NP-40. Em seguida, o homogenato foi aquecido a 100° C até observar-se turvação da solução, processo que levou ao redor de 5 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas esfriando e, após atingir a temperatura ambiente, foram levadas para a centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante contendo a fração lipídica, foi transferido para outro tubo. Para a quantificação foi adicionado 2 μL de sobrenadante obtido na extração e 200 μL do reagente 1 do kit da labtest. Os primeiros poços da placa foram utilizados como branco da reação.

3.9 ANÁLISE DE PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (GC-MS)

A fração lipídica foi extraída através de uma solução 2:1 de clorofórmio/metanol. Os lipídeos extraídos foram sujeitos ao processo de hidrólise pelo uso de uma solução fortemente básica (NaOH/metanol), resultando na produção de ácidos graxos livres não esterificados. Esses ácidosgraxos foram submetidos a reações de metilação, produzindo ésteres metiladosdos ácidos graxos. Esses ésteres foram suspensos em octanol para a injeção no aparelho de GC-MS. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de

massa (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu), utilizando coluna de sílica fundida Stabilwax (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 µm de espessura; Restek®).

3.10 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E ANÁLISE LIPIDÔMICA DO FÍGADO

Foi realizada a extração do teor lipídico do fígado, onde homogeneizamos o tecido (200 mg) em 500 µL de tampão contendo 10 mM PBS + 20 µM de desferroxamina pH 7.0, utilizando um homogeneizador elétrico (tipo Polytron). Depois transferimos 250 µL do extrato resultante para outro tubo de 2 mL e adicionamos 550 µL de MTBE e 600 µL de metanol. As amostras foram vortexadas por 60s. Logo após, transferimos 100 µL desse segundo homogenato e adicionamos os padrões internos (mix 1 e 2 de 50 uL de cada) e 300 µL de metanol gelado contendo BHT 10 µM, vortexamos (30s) e adicionamos em seguida 1 mL de MTBE. Deixamos 1 h a 20°C ThermoMixer sob agitação constante à 1000 rpm. Posteriormente, adicionamos 300 µL de água miliQ, vortexamos (30s) e incubamos em banho de gelo por 10 minutos, depois centrifugamos a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo o extrato lipídico total (ELT) foi transferido para um *vial* novo (~700 µL) e seco sob fluxo de N₂. Após secagem, as amostras foram ressuspendidas em 100 µL de isopropanol e 10 µL de cada amostra foi coletado para preparo do pool de controle de qualidade (YOSHIDA *et al.*, 2008).

Os ELTs foram analisados por *Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry* (ESI-Q-TOFMS) (Triple TOF ® 6600, Sciex, Concord, EUA) interfaceado com uma cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras foram carregadas em CORTECS ® (coluna

UPLC ® C18, 1,6 µm, 2,1 mm id × 100 mm) com uma taxa de fluxo de 0,2 mL e a temperatura do forno mantida a 35°C. Para LC de fase reversa, a fase móvel A consistiu em água/acetonitrila (60:40), enquanto a fase móvel B foi composta por isopropanol/acetonitrila/água (88:10:2). O espectrômetro de massas foi operado nos modos de ionização positivo e negativo, e a faixa de varredura foi definida em uma razão massa-carga de 200-2000 Da (CHAVES-FILHO *et al.*, 2019). Os dados foram analisados pelo MetaboAnalyst 5.0 e Analyst® 1.7.1. A extração e análise lipidômica foi realizada em parceria com o Laboratório de Lipídeos Modificados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após eutanásia de animais, foram cortadas amostras de fígado de 3x3 milímetros sempre do mesmo lóbulo do fígado. As amostras frescas foram colocadas em fixador glutaraldeído 3% por 4 horas a 4°C. Após isso, as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0.1M e depois desidratadas em etapas com álcool 30,50,70,90 e 95% por 10 minutos cada, por último, três etapas de álcool 100% por 20 minutos cada. Depois foi feita infiltração 1:1 de álcool 100% com araudite e mantida por 24 horas. Depois foi feita a polimerização por 72 horas à 60°C utilizando araudite. Em seguida, o material foi cortado no ultramicrótomo (0,5 micrômetros) e corado com azul de toluidina 1%, depois aparado à 70 nanômetros e posto em grade de cobre, contrastado com acetado de uranila e citrato de chumbo. A leitura foi realizada em microscópio eletrônico Jem-100CX II (JEOL).

3.12 FRACIONAMENTO DO VLDL

A obtenção de lipoproteínas foi realizada a partir do plasma separado do sangue coletado dos camundongos no momento de eutanásia. Em torno de 500 μL de sangue de cada animal foi coletado e colocado em tubos côncavos de 1,5 mL, contendo 8 μL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5M. Esses tubos foram centrifugados (12.000 rpm por 10') para separação e coleta do plasma.

A partir da coleta do plasma, foi feito um *pool* das 8 amostras de cada grupo experimental (tempo zero, 1, 3 e 7 dias de exposição ao frio) para que o volume total de plasma fosse de 800 μL , sendo assim, para cada grupo, tivemos uma amostra (*pool*) para obtenção de VLDL e demais lipoproteínas. 770 μL de plasma foram utilizados para obtenção das lipoproteínas pelo método de ultracentrifugação por gradiente de densidade.

O plasma foi adicionado em tubos *ultra-clear* (Beckman) e a densidade ajustada para 1,21 g/mL com brometo de potássio (KBr). Em seguida, foi realizado gradientes de densidade com soluções salinas de KBr adicionadas com auxílio de uma mini bomba peristáltica, a fim de formar 4 diferentes fases [770 μL de plasma; 575 μL de solução salina (1,063 g/mL); 575 μL de solução salina (1,019 g/mL) e 500 μL de solução salina (1,006 g/mL)]. O gradiente formado foi ultracentrifugado a 55.000 rpm por 17 horas e 30 minutos a 15°C em rotor TLS55 (Beckman Coulter Inc.). Após a ultracentrifugação, as frações de lipoproteínas na sequência VLDL + IDL, LDL e HDL foram extraídas nos volumes de 575 μL , 650 μL , 700 μL , respectivamente.

3.13 HISTOLOGIA DO FÍGADO

Amostras do mesmo lobo do fígado de animais foram obtidas e colocadas em cassetes para biópsia. Em um primeiro momento, esses cassetes foram colocados em solução de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) com paraformaldeído 4% e pH 7,4 por 24 horas. A solução foi retirada dos cassetes a partir da lavagem com água destilada, depois disso, os cassetes foram colocados em álcool com concentrações crescentes de 70%, 80%, 95% (trocado 1x) e 100% (trocado 2x) por 40 minutos cada etapa para a remoção da água do tecido. Depois os cassetes foram transferidos para uma solução de Xilol (trocado 1x) dentro da capela, para então serem feitos os banhos dos cassetes em parafina (2x) por 1 hora cada. Logo após, foi realizada a inclusão ainda em parafina, e depois realizada a hidratação para coloração com Hematoxilina e Eosina. A etapa de coloração e processamento foi realizada pelo Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram conduzidas no programa Graphpad Prism 8.4. Para experimentos com apenas uma variável, mas entre grupos diferentes, como os diferentes tempos de exposição ao frio, foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com post hoc Tukey. Já para experimentos com uma variável, mas comparando apenas dois grupos, foi feito o teste t de *Student*. Para relevância estatística: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4 RESULTADOS

4.1 EXPOSIÇÃO AO FRIO ALTERA GENES DA VIA LIPOGÊNICA HEPÁTICA

O experimento de desafio ao frio, revelou redução da expressão relativa de genes envolvidos na *de novo* lipogênese no fígado, como por exemplo, *Srebp1c*, *ChrebpB*, *Fasn*, *ACC* e principalmente *SCD1* (**Figura 7 A**). Este último, codifica a enzima *SCD1*, dessaturase responsável por inserir duplas ligações na cadeia carbônica de AGS gerando AGMI, que são preferencialmente incorporados em TGs.

Já o gene *AcadL* apresentou aumento estatístico de expressão no primeiro dia de aclimação ao frio, depois houve normalização de seu nível sob o efeito crônico do frio (**Figura 7 A**). *AcadL* codifica a *Acil-CoA* desidrogenase de cadeia longa, uma enzima que catalisa a beta-oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, principalmente os de cadeia longa e insaturada, como por exemplo, o ácido oleico.

Este aumento de expressão sob estímulo agudo da exposição ao frio, até o momento, nos revelou um efeito sinérgico da redução da DNL e possível captação energética a partir da beta-oxidação de ácidos graxos num primeiro momento, que se reduz a partir da adaptação de forma crônica ao frio.

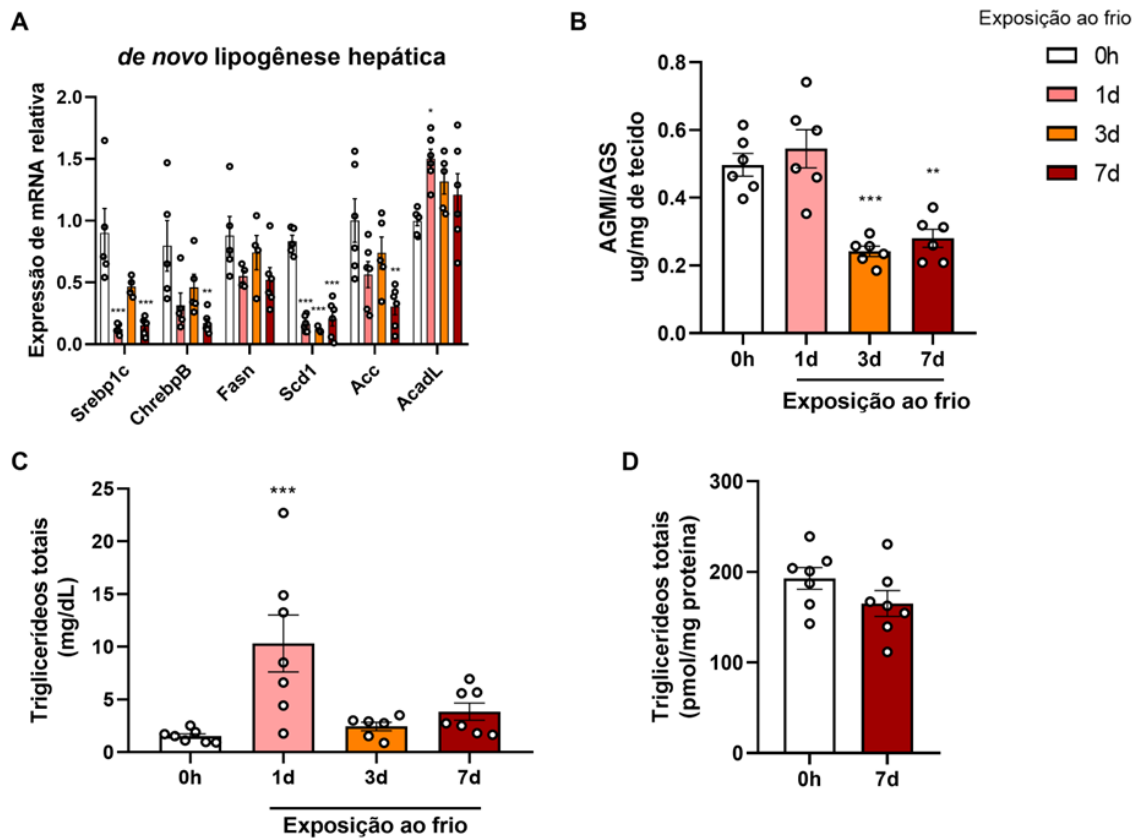
A atividade de *SCD1* é indiretamente mensurada pela razão AGMI/AGS, conhecida como índice de dessaturação. Esta razão foi reduzida a partir do terceiro dia de exposição ao frio, através da redução de ácidos graxos monoinsaturados, e a tendência de manutenção de ácidos graxos saturados, conforme detectado através da análise do perfil de ácidos graxos presentes no fígado (**Figura 7 B**), corroborando o dado de baixa expressão de *SCD1*.

O mesmo perfil de diminuição da dessaturação de ácidos graxos no fígado revelado sob exposição ao frio a partir do terceiro dia, foi observado em relação aos

níveis de triglicérides, onde num primeiro momento, com um dia de exposição ao frio, observamos o aumento, porém, a partir do terceiro dia, vimos o retorno aos níveis basais (**Figura 7C**). Na análise de lipidômica realizada em amostras de fígado, comparando termoneutralidade *versus* 7 dias de exposição ao frio, observamos que não há diferença no nível de triglicérides entre os dois grupos (**Figura 7D**), confirmando o dado anterior de que o efeito crônico de exposição ao frio normaliza os níveis de triglicérides após o aumento sob estímulo agudo.

Esses dados nos sugerem que, o fígado, por ser um crítico acceptor de ácidos graxos advindos da lipólise do TAB frente o desafio do frio, apresenta de fato um acúmulo de gordura em um primeiro momento, perante o efeito agudo de exposição ao frio, no entanto, sob o efeito crônico, este fenômeno é normalizado, podendo ser relacionado com a redução da maquinaria lipogênica apresentada sob o efeito crônico.

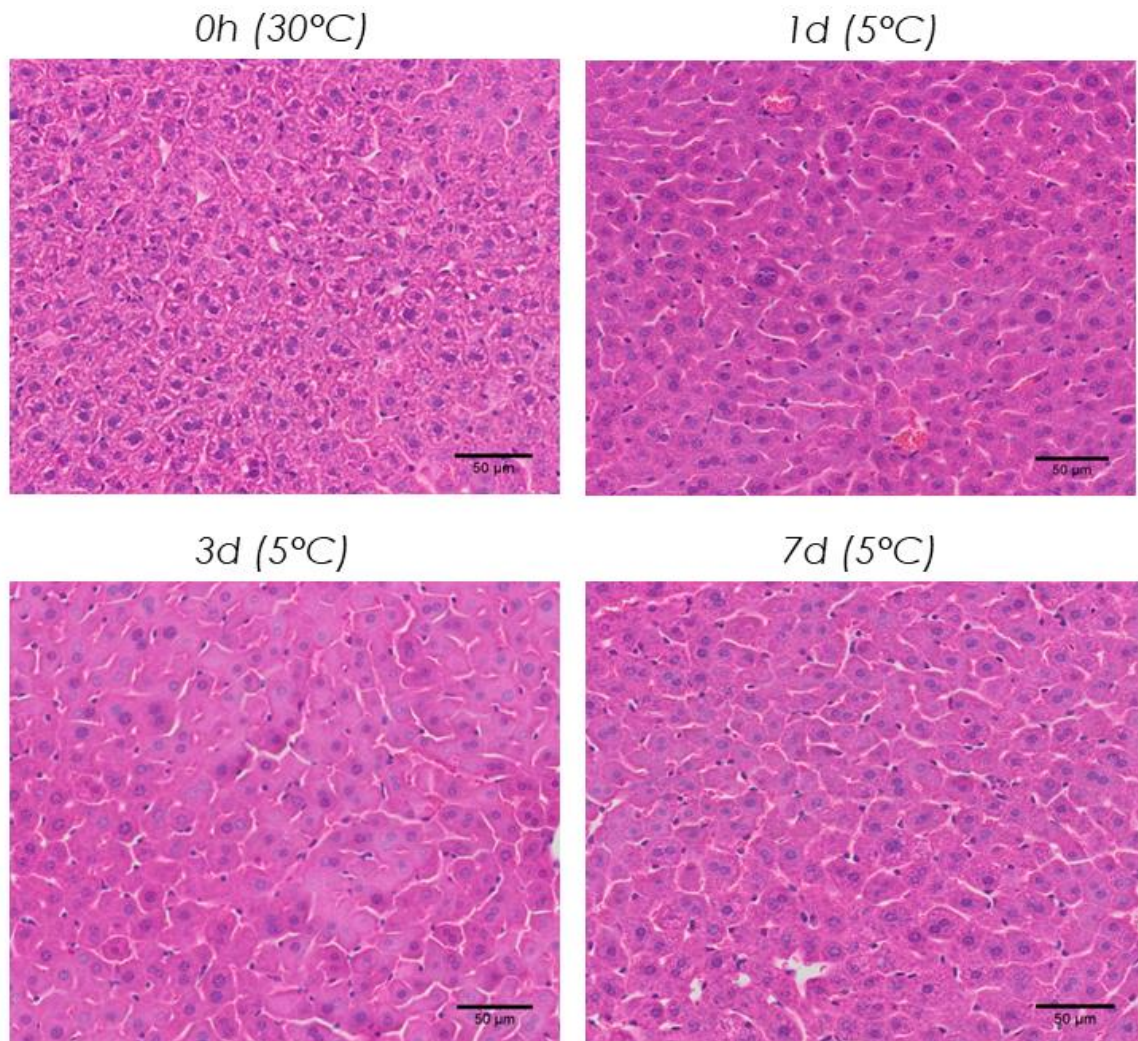
Figura 7 – **Genes da via lipogênica.** (A) Expressão de mRNA relativa de genes da DNL hepática de camundongos que estiveram na condição de termoneutralidade (0 horas), e exposição ao frio (1,3 e 7 dias). (B) A razão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) sobre ácidos graxos saturados (AGS) obtida por análise do perfil de ácidos graxos de fígado de camundongos expostos ou não ao frio em diferentes tempos (1, 3 e 7 dias). (C) Triglicerídeos totais de amostras de fígado de camundongos expostos ou não ao frio em diferentes tempos (1, 3 e 7 dias), níveis dosados por kit. (D) Triglicerídeos totais de fígado de camundongos que estiveram na condição de termoneutralidade (0h) ou de exposição ao frio por 7 dias (7d), dado obtido por análise de lipidômica. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 sempre em relação ao grupo controle (0h). Média ± erro padrão da média. *One-Way ANOVA e post hoc Tukey test.*



Fonte: o próprio autor.

Realizamos a análise da histologia (HE) das amostras de fígado dos animais aclimatados ou não ao frio em diferentes tempos. Não observamos gotículas lipídicas (**Figura 8**) entre os grupos aclimatados ao frio, nem mesmo nas amostras com um dia de exposição, quando temos aumento significativo dos níveis de triglicérides no fígado.

Figura 8 – Histologia (HE) das amostras de fígado de animais que permaneceram em condição de termoneutralidade (0h) e em diferentes tempos de aclimação ao frio, um dia (1d), três dias (3d) e sete dias (7d).



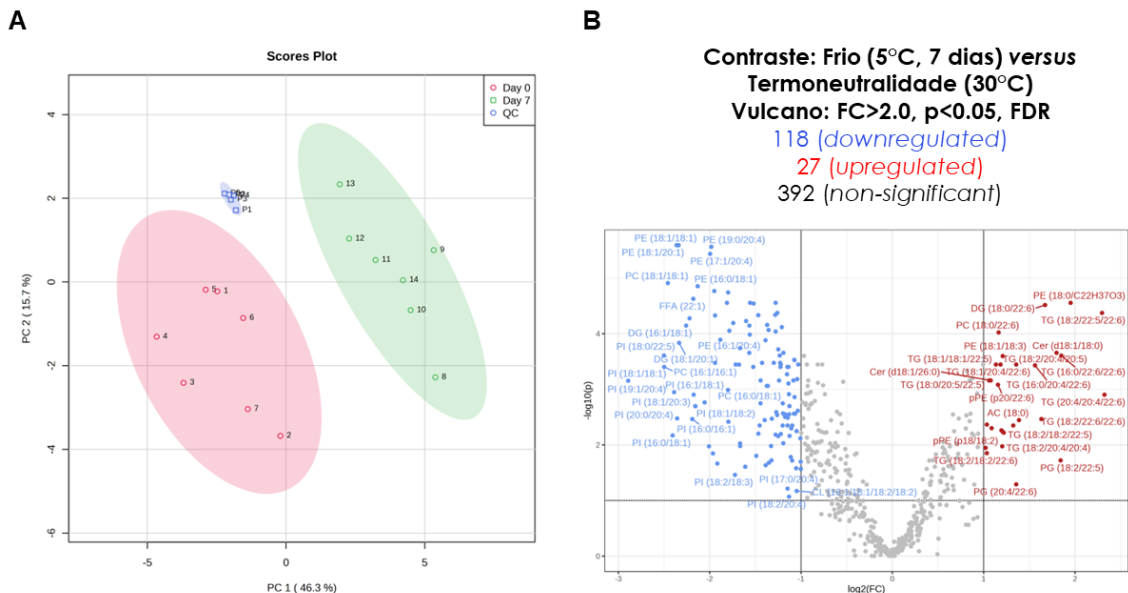
Fonte: o próprio autor.

4.2 ACLIMATAÇÃO AO FRIO ALTERA O PERFIL DO METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

Em sua dissertação de mestrado, Rafael Guimarães (2020) demonstrou através da análise do perfil de ácidos graxos, um aumento da presença de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o DHA no fígado, apenas nos tempos mais longos de exposição ao frio, especificamente a partir do terceiro dia. Para determinar em que forma estes ácidos graxos estariam dispostos no fígado, realizamos uma

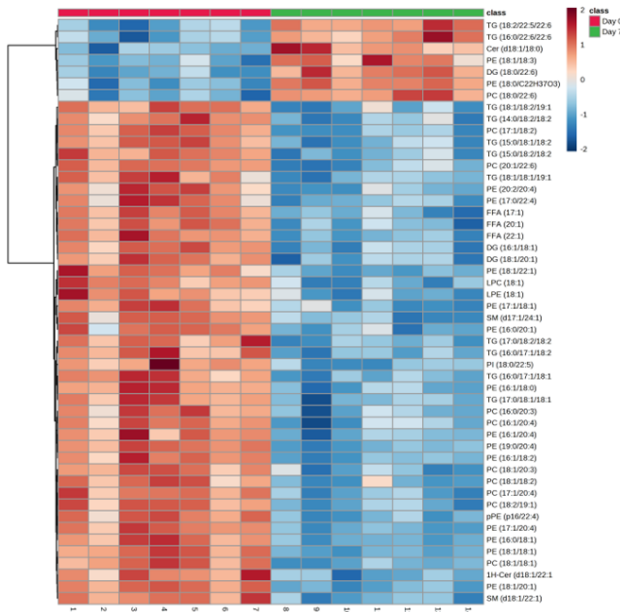
lipidômica comparando o fígado de camundongos mantidos em termoneutralidade ou em frio crônico de 7 dias. Desta forma, a lipidômica nos revelou que o perfil de AGs que incorporam os TGs se altera profundamente. Sob a condição da termoneutralidade, há uma predominância de AGMIs e AGSs incorporados em TGs, enquanto que, após 7 dias de exposição ao frio, AGPIs, tais como: DHA, EPA e ARA, estão predominantemente, incorporados ao triacilglicerol o invés de AGMIs e AGSs (Figura 9 B, C e Figura 10).

Figura 9 – **Lipidômica do fígado de camundongos mantidos em termoneutralidade ou em frio.** (A) Análise de componentes principais feita a partir dos dados obtidos da lipidômica em amostras de fígado extraídos de animais em termoneutralidade (tempo 0h) ou ao frio por 7 dias (7d), além do *pool* de AGs controle (QC). Em vermelho está representado o grupo 0h e em verde o grupo 7d. Em azul, representado o controle do método. (B) Gráfico de vulcão ou “*volcano plot*”, onde se compara exposição ao frio por sete dias *versus* termoneutralidade. Em azul, espécies lipídicas diminuídas na condição do frio, e em vermelho, espécies lipídicas aumentadas frente ao frio, enquanto em cinza estão os lipídios sem significância estatística. (C) *Heatmap* dos lipídios na condição de termoneutralidade (0h) em vermelho e frio (7d) em verde. Dados analisados pelo MetaboAnalyst 5.0.



(Cont.)

C

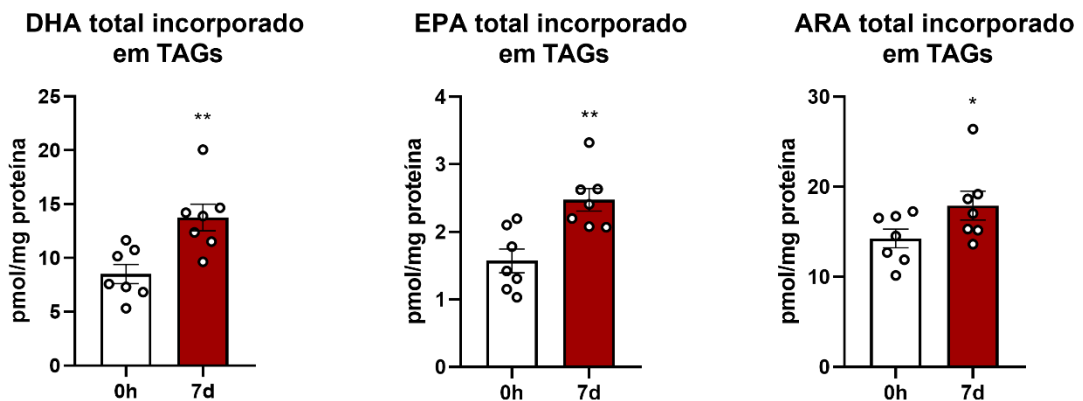


- Frio:**
- TGs incorporados com ARA/DHA/EPA (AGPI);
 - Aumento de Fosfatidilcolina (PC) incorporado com DHA.

- Termoneutralidade:**
- AGLs e outras espécies lipídicas em sua maioria incorporada com AGMIs;
 - TGs incorporados com AGMIs e AGS.

Fonte: o próprio autor.

Figura 10 – Análise de lipidômica do fígado que revela o aumento da incorporação de AGPIs em TAGs. DHA, EPA e ARA estiveram mais incorporados em TAGs no fígado de camundongos aclimatados ao frio por 7 dias, quando comparado com camundongos que permaneceram na condição de termoneutralidade. *P < 0.05, **P < 0.01 em relação ao grupo controle 0h (Termoneutralidade). Média ± erro padrão da média. Teste t de *Student*.

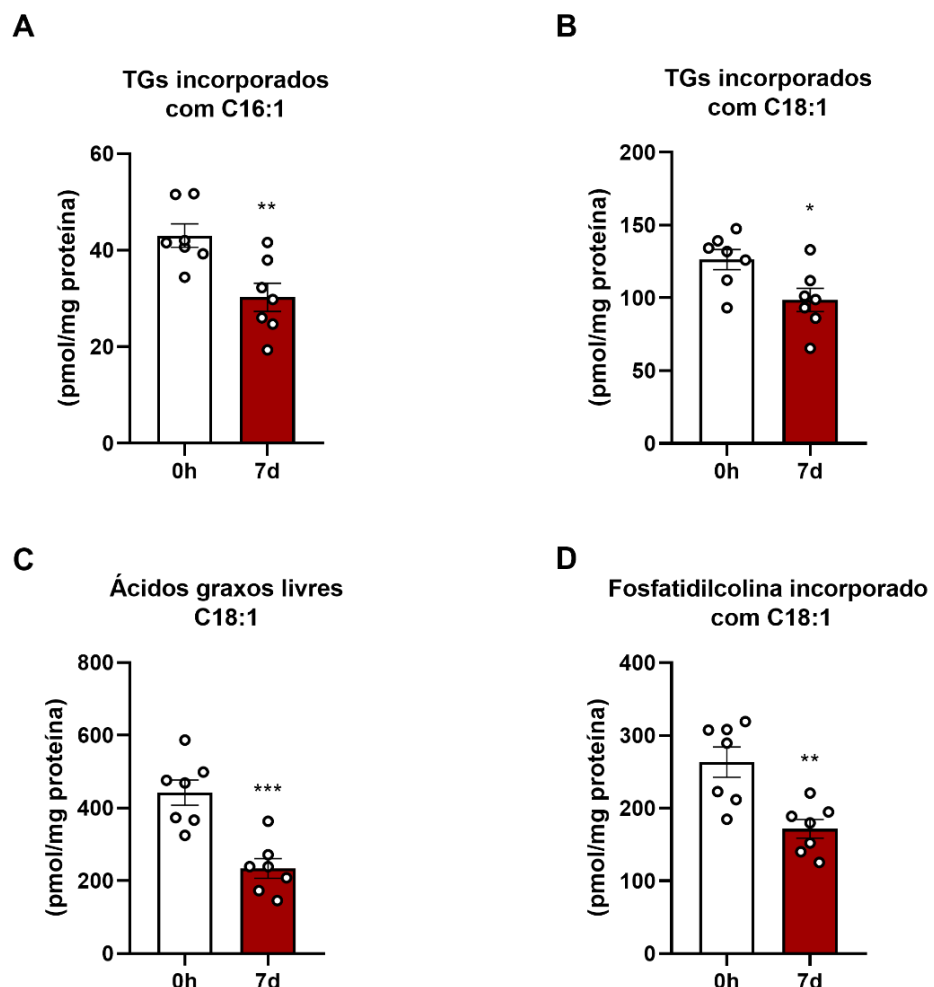


Fonte: o próprio autor.

A diminuição de AGMIs como o ácido oleico (C18:1) e o ácido palmítico (C16:1) (**Figura 11 A e B**) incorporados em TGs sob a condição de exposição ao frio crônico, revela a concordância com os dados apresentados a respeito da diminuição

da expressão gênica e da atividade de SCD1 também sob o efeito do frio. Os AGMIs estiveram diminuídos também em outras conformações lipídicas, como na sua forma livre (**Figura 11 C**), e quando incorporados em lipídios de outras classes funcionais como é o caso da fosfatidilcolina (**Figura 11 D**), um fosfolípido em que a sua principal função é compor a estrutura de membranas celulares e outras lipocamadas como a de lipoproteínas.

Figura 11 – Análise de lipidômica do fígado de camundongos expostos ao frio por sete dias (7d) ou que estiveram sob condição de termoneutralidade (0h). Análise revela a diminuição de AGMIs incorporados em TGs, como é o caso do ácido palmítoleico C16:1 (A) e o ácido oleico C18:1 (B). Em (C), a diminuição do ácido oleico C18:1 em sua forma livre no fígado de animais expostos ao frio quando comparado com a termoneutralidade. Em (D) a diminuição da incorporação do ácido oleico C18:1 em um fosfolípido, a fosfatidilcolina, em fígado de animais expostos ao frio quando comparados com a termoneutralidade. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 em relação ao grupo controle 0h (Termoneutralidade). Média ± erro padrão da média. Teste t de *Student*.



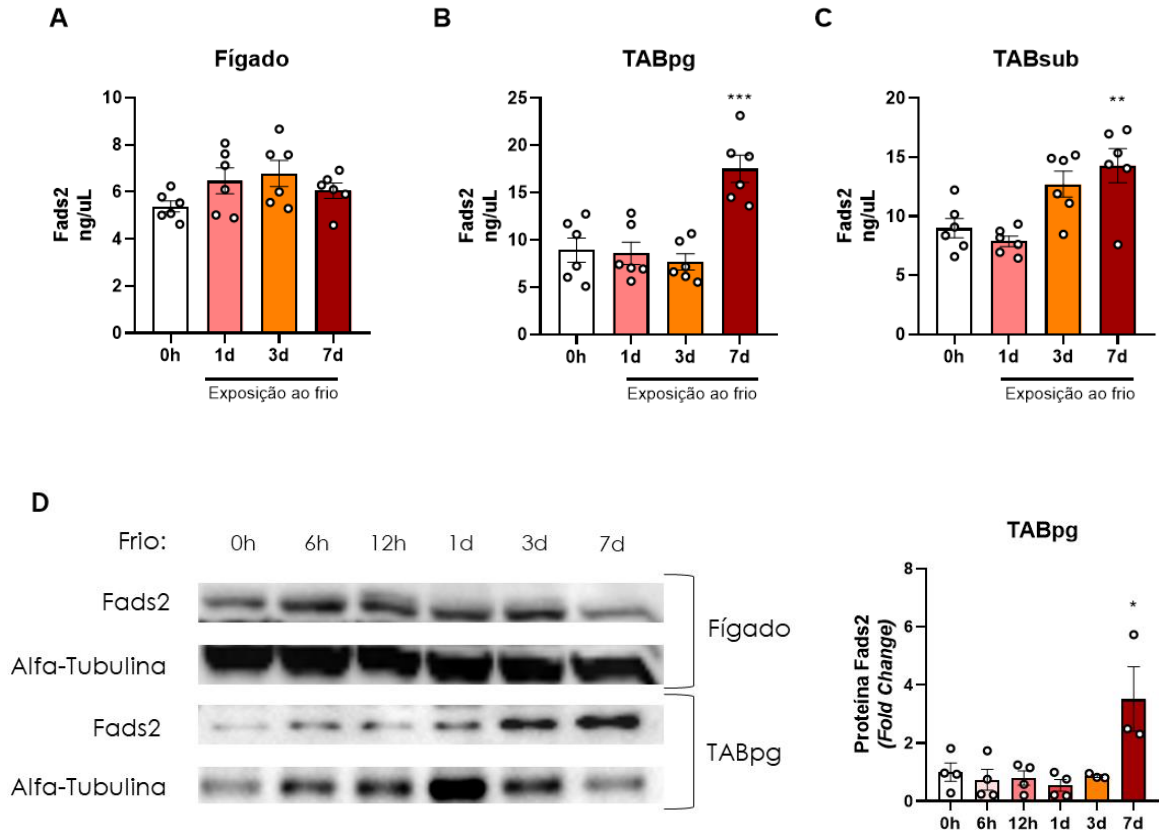
Fonte: o próprio autor.

4.3 O FRIO MODULA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA ENZIMA FADS2 NO TAB

O aumento da presença de AGPIs, especialmente o DHA no fígado, a partir da cronificação da aclimação ao frio, nos levou a investigar em uma próxima etapa a origem desses PUFAs, ou seja, se o processo de biossíntese destes estaria exacerbada no fígado ou no tecido adiposo. A expressão gênica da dessaturase Fads2, que é a enzima taxa limitante para a biossíntese dos AGPIs supracitados, a partir do seu precursor ácido alfa-inolênico (ALA) (**Figura 4**), foi mensurada em um trabalho anterior por Rafael Guimarães (2020), que demonstrou que a expressão gênica de Fads2 no fígado de camundongos aclimatados ao frio não se alterava, já no TAB perigonadal (TABpg), a partir do terceiro dia de aclimação ao frio, ocorria o aumento da expressão e esta continuava em progressão com sete dias de aclimação ao frio, nos indicando que a conversão desses AGPIs não ocorria no fígado e sim no TAB.

Desta vez, avaliamos a expressão proteica de Fads2 no fígado, TABpg e TAB subcutâneo (TABsub) de camundongos em diferentes tempos de aclimação ao frio, a partir de ensaios de ELISA e *Western blotting*. Observamos então, que a expressão proteica de Fads2 aumentou sob o efeito crônico do frio somente nos TABs, enquanto que no fígado não houve alteração (**Figura 12**).

Figura 12 – (A), (B) e (C) Ensaio de ELISA para expressão proteica de Fads2 do Fígado, TABpg e TABsub respectivamente, comparando termoneutralidade (0h) versus 1 dia (1d), 3 dias (3d) e 7 dias (7d) de aclimação ao frio. (D) Ensaio de *Western Blotting* para Fads2 no fígado e TABpg comparando termoneutralidade (0h) versus diferentes tempos de aclimação ao frio. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 sempre em relação ao grupo controle (0h). Média ± erro padrão da média. *One-Way ANOVA* e *post hoc Tukey test*.



Fonte: o próprio autor.

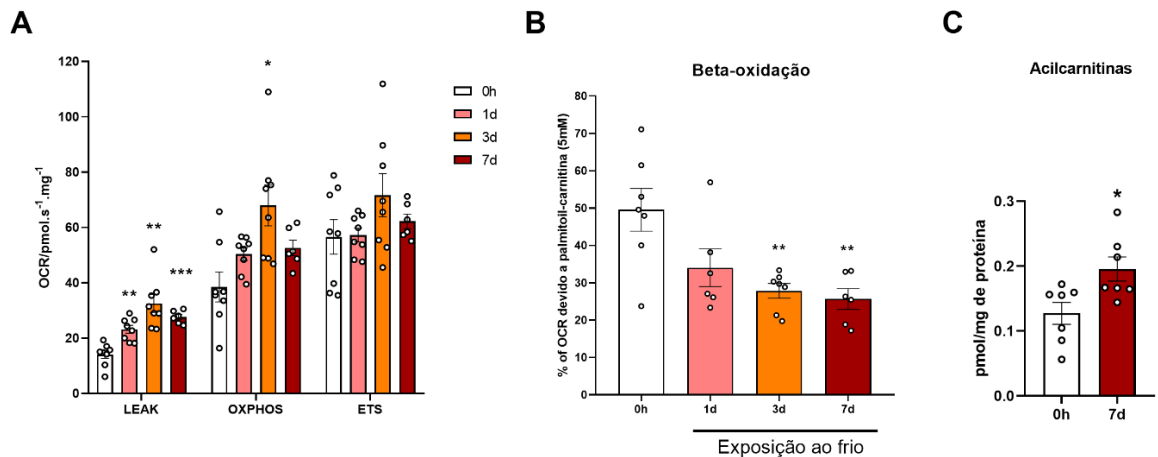
Este dado corrobora o resultado de expressão gênica de Fads2, e fortalece a ideia de que possivelmente maior parte da geração de AGPIs esteja ocorrendo no TAB, a partir da maior atividade de Fads2 durante a adaptação termogênica. Assim, o aumento de AGPIs principalmente DHA, visto no fígado durante aclimação crônica ao frio, é provavelmente consequência da migração e do aumento do influxo hepático destes ácidos graxos advindos do TAB.

4.4 OS HEPATÓCITOS REDUZEM SUA TAXA DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS APÓS ACLIMATAÇÃO AO FRIO

Em um passo seguinte, decidimos avaliar o metabolismo de ácidos graxos no fígado, a fim de entender como o metabolismo se adapta nos hepatócitos frente a demanda energética desencadeada pela aclimatação ao frio. Para tanto, quantificamos a taxa de consumo de oxigênio via oximetria (Oroboros™) em amostras frescas de fígados extraídos de camundongos mantidos em termoneutralidade (tempo 0h) ou frio por 1, 3 ou 7 dias. Observamos um aumento da oxidação fosforilativa (OXPHOS), o qual foi mais acentuado no dia 3 de exposição (**Figura 13 A**). Neste ensaio, percebemos que já no estado de repouso, ou seja, de respiração basal ou não fosforilante, ocorre o aumento do consumo de oxigênio proveniente do vazamento de prótons (LEAK) a partir do aumento da transferência de elétrons durante a aclimatação ao frio, porém, não notamos diferença quanto ao sistema de transferência de elétrons (ETS) (**Figura 13 A**).

Por outro lado, notamos uma sustentada redução da beta-oxidação estimulada por palmitoil-carnitina em todos os tempos de exposição ao frio (**Figura 13 B**). Corroborando esses dados, observamos o acúmulo de acilcarnitinas no fígado sob o frio crônico (**Figura 13 C**), assim como também foi demonstrado por Simcox e colaboradores (2017). Estes dados sugerem uma preservação dos AGs enquanto substratos metabólicos no fígado, favorecendo sua incorporação em TGs e VLDL. Por outro lado, estes dados sugerem que a mitocôndria hepática se utiliza de outros mecanismos adaptativos para continuar gerando ATP via OXPHOS.

Figura 13 – **Medida de LEAK, OXPPOS e ETS de amostras de fígado.** (A) Medida de LEAK, OXPPOS e ETS de amostras frescas de fígado (5mg) de camundongos que estiveram sob condição de termoneutralidade (0h), 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. (B) Ensaio de beta-oxidação em amostras frescas de fígados de camundongos que estiveram sob condição de termoneutralidade, 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. (C) Análise de lipidômica do fígado de camundongos que estiveram sob condição de termoneutralidade (0h) *versus* 7 dias de aclimação ao frio (7d). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 sempre em relação ao grupo controle (0h). Média ± erro padrão da média. *One-Way ANOVA, post hoc Tukey test* e *Teste t de Student*.

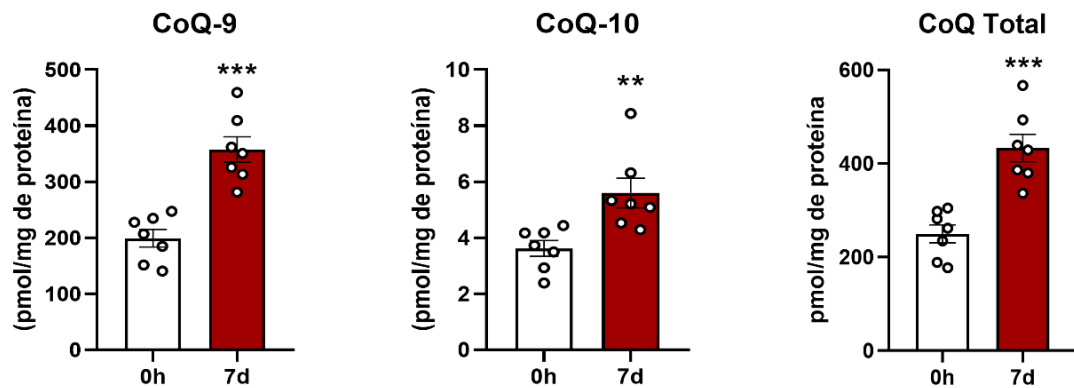


Fonte: o próprio autor.

4.5 OS HEPATÓCITOS ADAPTAM A CAPACIDADE DE OXPPOS AUMENTANDO OS NÍVEIS DE COENZIMA-Q

Considerando que a beta-oxidação seria uma das principais fontes de substratos para a cadeia respiratória de elétrons, nos perguntamos o que poderia fazer com que a OXPPOS estivesse aumentando, mesmo em uma situação, onde a beta-oxidação está diminuída. Os dados de lipidômica nos forneceram uma resposta parcial. Percebemos o aumento dos níveis de CoQ-9 e CoQ-10, o que refletiu-se em maior concentração de CoQ total (**Figura 14**). As CoQ são importantes para a atividade da cadeia respiratória de elétrons, uma vez que realizam a transferência de elétrons do complexo I para os complexos II e III.

Figura 14 – Quantificação de coenzima Q-9, coenzima Q-10 e coenzima-Q total a partir da análise de lipidômica realizada em amostras de fígados de camundongos que estiveram sob a condição de termoneutralidade (0h) *versus* 7 dias (7d) de aclimação ao frio. **P < 0.01, ***P < 0.001, em relação ao grupo controle em termoneutralidade. Média ± erro padrão da média. Teste t de *Student*.

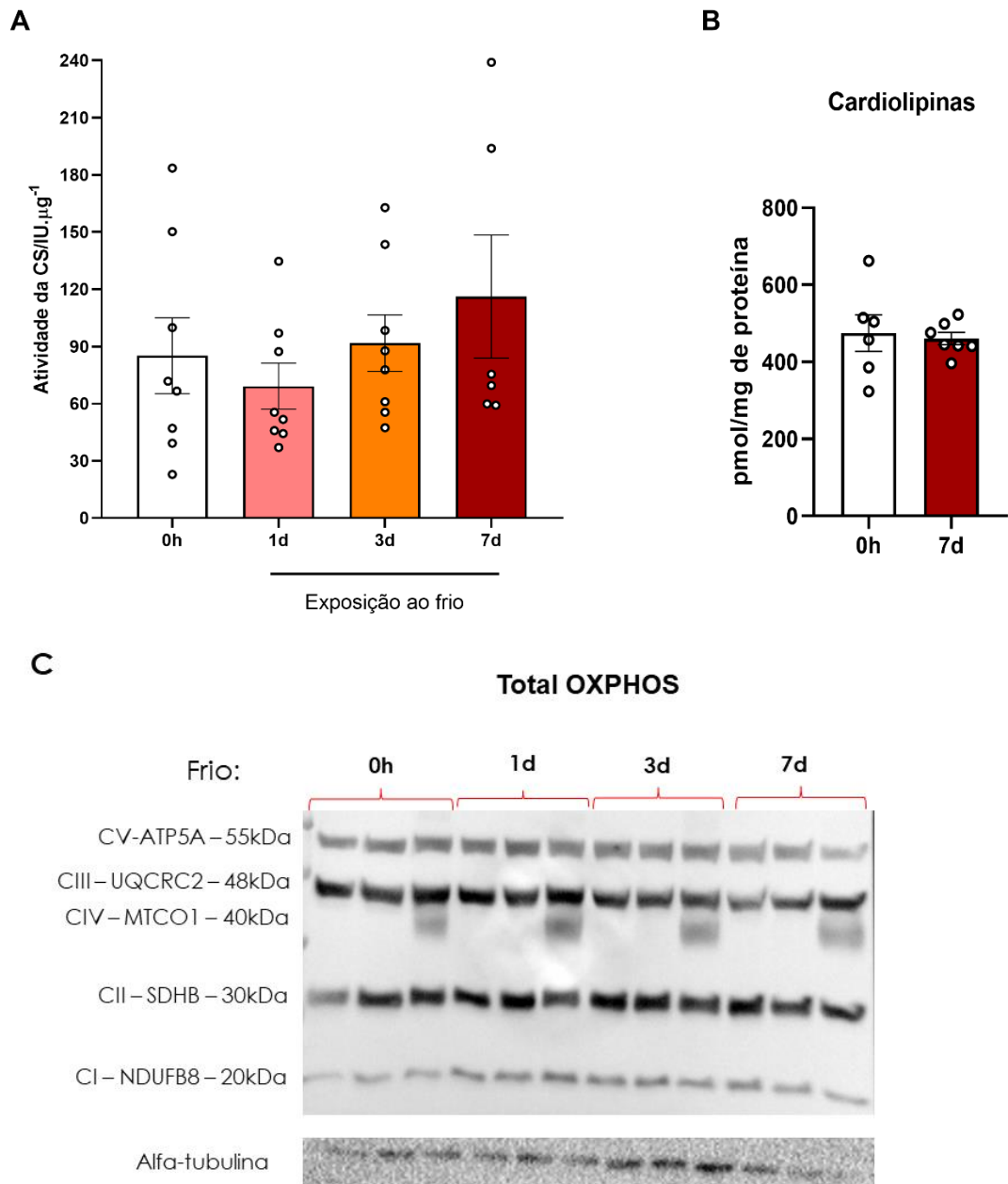


Fonte: o próprio autor.

Realizamos o ensaio da atividade da citrato sintase (**Figura 15 A**) e não observamos diferença estatística, assim como também não notamos alteração nos níveis de cardiolipinas (**Figura 15 B**). Tanto atividade citrato sintase, por ser uma enzima mitocondrial localizada na matriz mitocondrial, quanto cardiolipinas, que são fosfolipídeos que enriquecem a membrana interna da mitocôndria, são importantes marcadores de possíveis alterações quanto ao número de mitocôndrias.

Deste modo, esses dados nos sugerem que o número de mitocôndrias não foi alterado frente ao desafio do frio, e portanto, não há correlação com os dados da OXPHOS e de beta-oxidação no fígado. Além disso, avaliamos a expressão proteica das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e não observamos diferenças a partir do desafio ao frio (**Figura 15 C**).

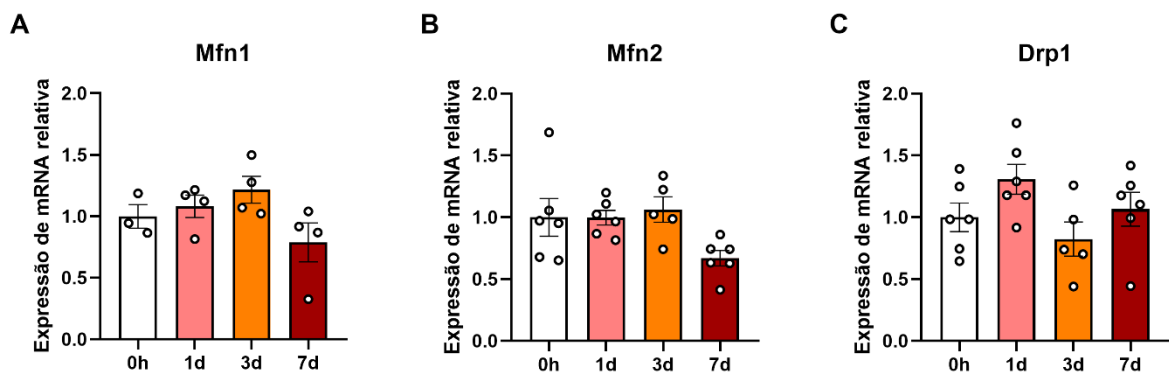
Figura 15 – **Atividade Citrato Sintase, Cardiolipinas e Total Oxphos.** (A) Atividade de citrato sintase mensurada a partir de amostras de fígados de camundongos que foram submetidos a condição de termoneutralidade (0h) *versus* 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. (B) Identificação de cardiolipinas a partir da análise de lipidômica de fígados de camundongos sob a condição de termoneutralidade *versus* 7 dias (7d) de aclimação ao frio. (C) Expressão proteica no fígado, por *western blotting*, das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, comparando termoneutralidade (0h) *versus* 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. Média \pm erro padrão da média. *One-Way ANOVA, post hoc Tukey test* e *Teste t de Student*.



Fonte: o próprio autor.

Continuamos a investigar a adaptação mitocondrial hepática frente ao desafio do frio, desta vez, através de parâmetros de dinâmica mitocondrial. Para tal, mensuramos a expressão relativa dos genes Mfn1 e Mfn2 (**Figura 16 A e B**), que codificam as proteínas mitofusina 1 e 2 respectivamente, mediadoras do processo de fusão mitocondrial, além do gene para codificação de dinamina-1 (Drp1) (**Figura 16 C**), proteína que regula o processo de fissão mitocondrial. Tanto a divisão quanto a fusão de mitocôndrias são mecanismos para que esta organela se mantenha funcional em face de algum desafio metabólico, assim como a aclimatação ao frio. A partir da análise, não notamos diferença da expressão relativa de nenhum destes genes no fígado de camundongos expostos ou não ao frio (**Figura 16**).

Figura 16 – Expressão relativa de genes associados a dinâmica mitocondrial no fígado. Comparação de camundongos que foram submetidos a condição de termoneutralidade (0h) *versus* 1, 3 e 7 dias de aclimatação ao frio. (A) Mfn1. (B) Mfn2. (C) Drp1. Média \pm erro padrão da média. *One-Way ANOVA, post hoc Tukey test.*

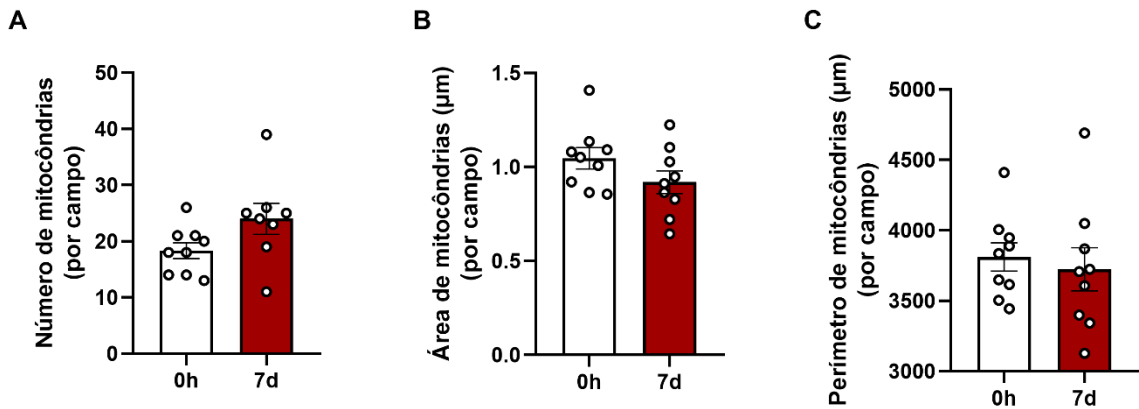


Fonte: o próprio autor.

Em uma etapa posterior, avaliamos a dinâmica mitocondrial a partir de imagens de mitocôndrias hepáticas (**Figura 17**), captadas por microscopia eletrônica de transmissão. Foram utilizadas amostras frescas de fígados de camundongos submetidos a temperatura de termoneutralidade *versus* aclimatação crônica ao frio

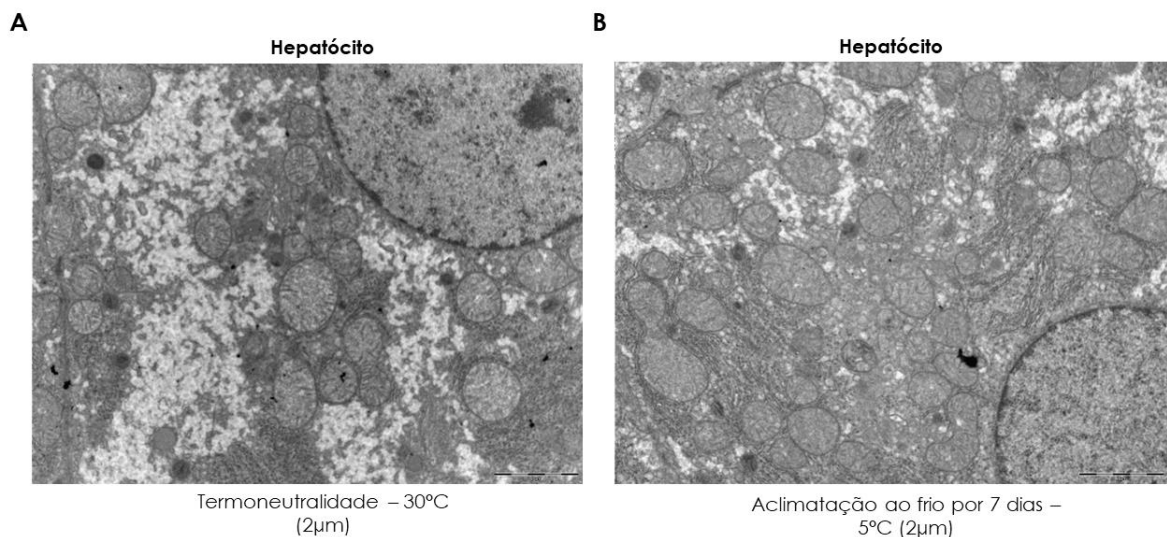
por 7 dias. Também mensuramos a quantidade, área e perímetro das mitocôndrias, mas não notamos diferença significativa entre estes parâmetros (**Figura 18**).

Figura 17 – Imagens de hepatócitos captadas por microscopia eletrônica de transmissão. (A) e (B) imagens na proporção de 2 μ m, sendo (A) condição de termoneutralidade e (B) aclimação ao frio por 7 dias. (C) e (D) imagens na proporção de 5 μ m, sendo (C) condição de termoneutralidade e (D) aclimação ao frio por 7 dias. Nas imagens observamos núcleo e mitocôndrias hepáticas.

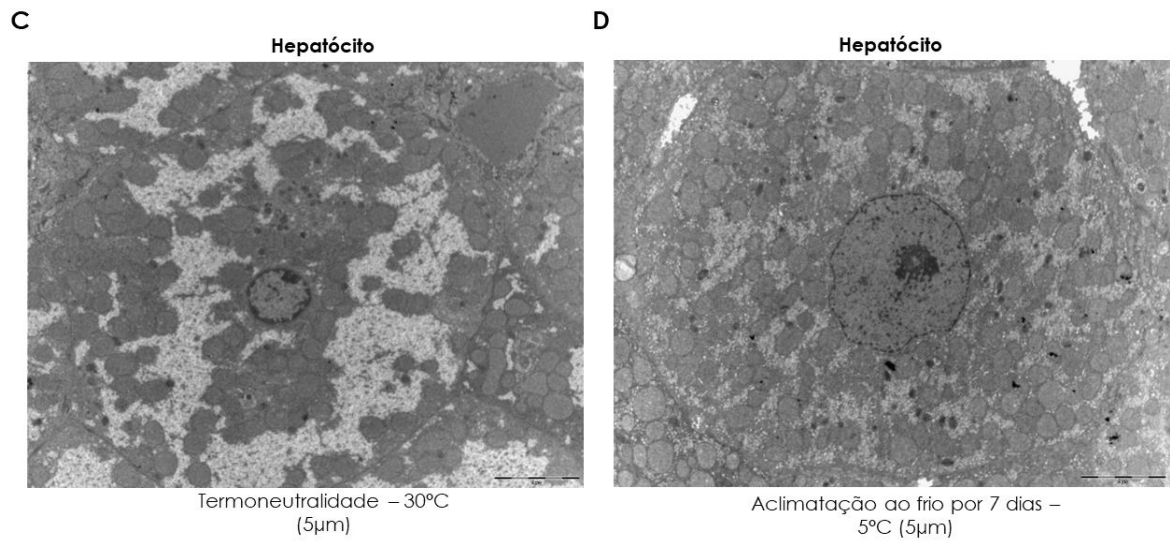


Fonte: o próprio autor.

Figura 18 – Quantificação de mitocôndrias e seus parâmetros morfológicos em hepatócitos. (A) Número de mitocôndrias por campo. (B) Área de mitocôndrias por campo. (C) Perímetro de mitocôndrias por campo. As análises foram realizadas em imagens na proporção de 2 μ m. Teste t de *Student*.



(Cont.)



Fonte: o próprio autor.

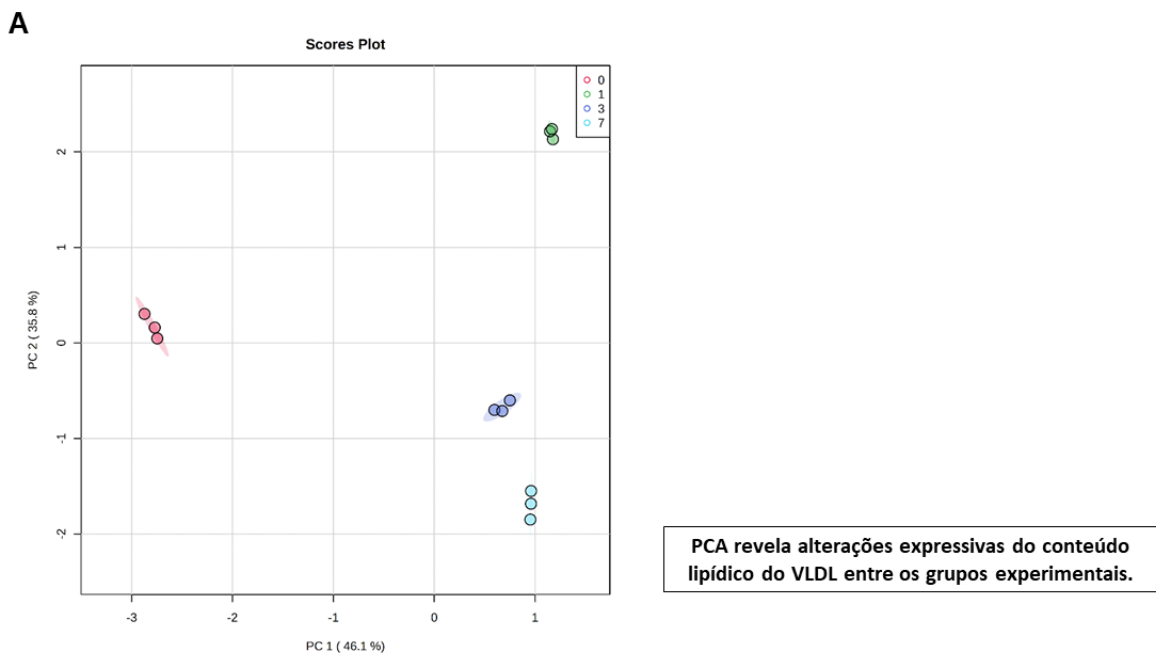
4.6 ACLIMATAÇÃO AO FRIO ALTERA O PERFIL LIPÍDICO DO VLDL

As recentes evidências demonstram a importância metabólica da comunicação entre fígado e tecido adiposo para a disposição de metabólitos lipídicos circulantes durante a atividade termogênica do TAM, nesse caminho, as lipoproteínas circulantes ricas em triglicérides que incluem VLDL e quilomícrons, oferecem a principal forma de transporte e entrega desses lipídeos para o TAM (HEEREN; SCHEJA, 2021; SHIN *et al.*, 2022).

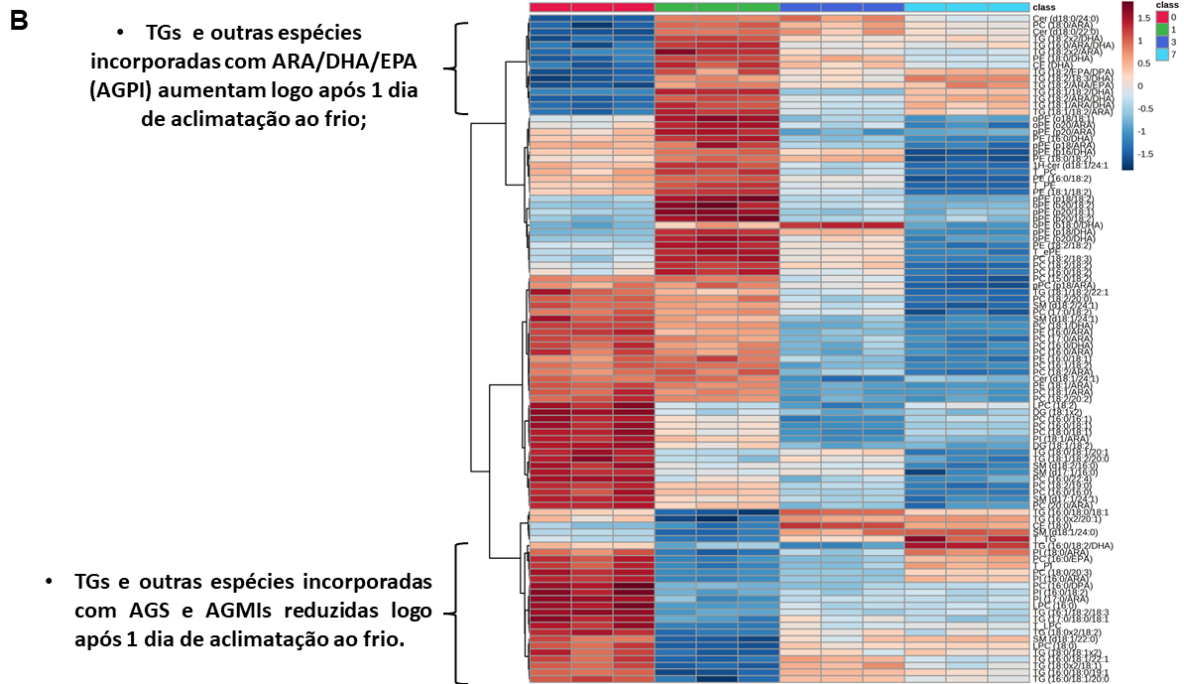
Considerando os resultados que obtivemos a partir da lipidômica do fígado de animais aclimatados ao frio, e do importante papel do fígado na síntese de VLDL e acilcarnitinas que são utilizados como combustível na atividade termogênica do TAM, buscamos verificar se o remodelamento do perfil lipídico no fígado se reflete na composição lipídica do VLDL, a partir da análise de lipidômica da fração de VLDL obtida do plasma de camundongos que permaneceram na condição de termoneutralidade (0h), ou em 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio.

A partir do fracionamento do plasma coletado, obtivemos uma fração de VLDL por grupo. Estas frações foram mensuradas 3 vezes (replicata analítica), onde detectamos 241 lipídeos dentre os quais 231 lipídeos foram alterados de forma significativa ($p < 0.05$; FDR). A partir da análise dos componentes principais (PCA) do inglês *Principal Component Analysis*, observamos que a fração de VLDL de cada grupo não apresentou discrepância de características do perfil lipídico entre as replicadas mensuradas de um mesmo grupo, mas quando comparamos entre os grupos experimentais, notamos diferença de perfis lipídicos, sendo os grupos de 3 e 7 dias de aclimação ao frio os que apresentaram maior aproximação de características de perfil lipídico (**Figura 19 A**).

Figura 19 – (A) Análise de componentes principais das frações de VLDL de camundongos que permaneceram sob termoneutralidade (0h cor vermelho), 1 dia (verde), 3 dias (azul escuro) e 7 dias (azul claro) de aclimação ao frio; ($p < 0.05$; FDR). (B) *Heatmap* (100 alterações) das frações de VLDL de camundongos que permaneceram sob termoneutralidade (0h cor vermelho), 1 dia (verde), 3 dias (azul escuro) e 7 dias (azul claro) de aclimação ao frio. Dados analisados pelo *MetaboAnalyst 5.0*.



(Cont.)



Fonte: o próprio autor.

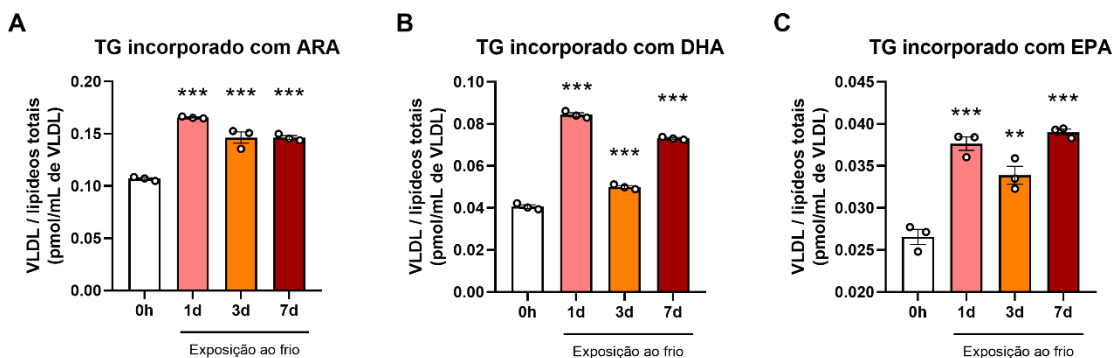
Quando observamos o *Heatmap* das 100 alterações lipídicas das frações de VLDL, notamos que os AGPIs como o DHA, ARA e EPA, estão em maiores quantidades incorporados em TGs com 1 dia de aclimação ao frio, quando comparado com a condição de termoneutralidade, e com períodos mais longos de aclimação ao frio, neste caso, com exceção do EPA (**Figura 19 B**; **Figura 20 C**). Sob a condição de termoneutralidade, o perfil de TGs e outras classes lipídicas, é composto preferencialmente por AGS e AGMIs (**Figura 19 B**), semelhante com o que observamos na lipidômica do fígado (**Figura 9 C**).

De forma intrigante, notamos este aumento de AGPIs em TGs presentes na fração de VLDL de camundongos já com um dia de aclimação ao frio, tendo em vista, que somente a partir do terceiro dia de aclimação ao frio, observamos aumento significativo de espécies poli-insaturadas no fígado. Isto nos indica que talvez o fígado já disponha de reservas destas espécies lipídicas para incorporá-las em TGs e

organizá-las na forma de VLDL sob um estímulo agudo do frio. Também sob estímulo agudo de aclimação ao frio é que observamos o aumento significativo de TGs no fígado, e que partir do terceiro dia, este nível de TG é normalizado (**Figura 7 C e D**).

O retorno ao nível basal de TG no fígado em períodos mais longos de aclimação ao frio, coincide com níveis menores de incorporação de AGPIs em TGs na fração de VLDL, também durante períodos mais longos de aclimação (3 e 7 dias) quando comparado com o efeito agudo (1 dia) (**Figura 19 B**), mesmo assim, a presença de AGPIs na fração de VLDL nestes períodos mais longos, ainda é maior quando comparado com a termoneutralidade. É o que observamos quando analisamos de forma isolada, as espécies incorporadas ao TG da fração de VLDL (**Figura 20**).

Figura 20 – Análise isolada de AGPIs incorporados em TG na fração de VLDL. (A) Ácido araquidônico incorporado em TG em VLDL isolado. (B) Ácido docosahexaenóico incorporado em TG em fração de VLDL isolado. (C) Ácido eicosapentaenóico incorporado em TG em fração de VLDL. Comparação de camundongos que foram submetidos a condição de termoneutralidade (0h) *versus* 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. **P < 0.01, ***P < 0.001 sempre em relação ao grupo controle (0h). Média \pm erro padrão da média. *One-Way ANOVA, post hoc Tukey test*.

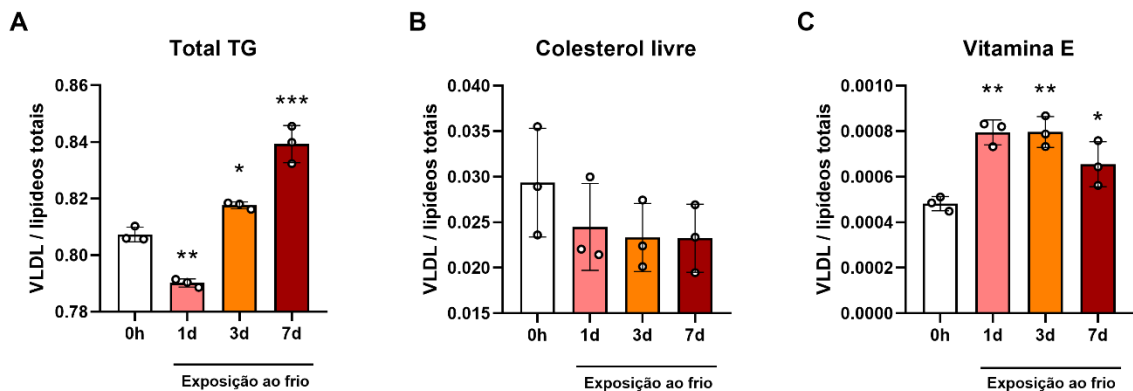


Fonte: o próprio autor.

Quando analisamos apenas a quantidade total de TGs na fração do VLDL, observamos que com 1 dia de aclimação ao frio, o nível de TG é reduzido, mas com maior tempo, a fração de VLDL é enriquecida com maiores quantidades de TGs

(Figura 21 A). Este é um fenômeno totalmente oposto em relação aos níveis de TG que detectamos em fígados de camundongos que foram aclimatados ao frio durante esses mesmos períodos (Figura 7 C e D). Aparentemente, sob estímulo agudo do frio, o fígado configura um estado de preservação dessa molécula de armazenamento de AGs, mas que, através de uma contínua demanda energética para manutenção da temperatura a partir de um estímulo crônico do frio, muda o seu padrão metabólico para um estado de maior liberação de AGs na forma de TGs, que é refletido na própria composição lipídica da fração de VLDL.

Figura 21 – Análise isolada de triglicérides totais, colesterol livre e vitamina E detectados em fração de VLDL. (A) Triglicérides totais obtidos dos lipídeos totais detectados na fração de VLDL por lipidômica. (B) Colesterol livre obtido dos lipídeos totais detectados na fração de VLDL. (C) Vitamina E detectada entre os lipídeos totais da fração de VLDL. Comparação de camundongos que foram submetidos a condição de termoneutralidade (0h) versus 1, 3 e 7 dias de aclimação ao frio. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 sempre em relação ao grupo controle (0h). Média ± erro padrão da média. *One-Way ANOVA, post hoc Tukey test.*



Fonte: o próprio autor.

Além disso, observamos que o colesterol na sua forma livre na fração de VLDL não se alterou (Figura 21 B). Um fenômeno diferente ocorre no LDL, que quando sob estímulo do frio, está presente na circulação em maiores quantidades e também com maiores quantidades de colesterol incorporado (DONG *et al.*, 2013). Também notamos aumento da vitamina E sob estímulo do frio (Figura 21 C). Esta vitamina

bastante lipossolúvel, apresenta um efeito importante na proteção ao estresse oxidativo hipocampal durante o desafio do frio intermitente, mostrando a relevância do VLDL também na condução destas vitaminas que no contexto do desafio ao frio, estão inclusas no processo de termogênese adaptativa (DEVI; MANJULA, 2014).

5 DISCUSSÃO

A *de novo* lipogênese (DNL) é a via metabólica que resulta na síntese de TGs a partir do influxo intracelular de carboidratos. Na condição de resistência insulínica e obesidade, ocorre aumento da expressão de fatores de transcrição lipogênicos desta via, como as proteínas ligadas aos elementos reguladores de glicose (ChREBP) e esterol 1c (SREBP1c), as quais induzem a expressão das enzimas Acetil-CoA Carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FASN) e estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1) que participam da síntese de ácidos graxos a partir de Acetil-CoA. Nesta via, o aumento da conversão de Acetil-CoA em Malonil-CoA por ação da ACC, induz também a supressão da entrada de ácidos graxos na mitocôndria através da inibição da CPT1a (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Deste modo, a DNL, está intimamente relacionada ao aumento de espécies lipídicas no fígado que, quando acumuladas, podem causar lipotoxicidade e morte celular, tornando o fígado um órgão inflamado, que favorece a cirrose hepática ou até mesmo hepatocarcinoma (HEEREN; SCHEJA, 2021). Portanto, é fundamental aprofundarmos os conhecimentos dos mecanismos sistêmicos e moleculares associados ao estado metabólico saudável e patológico do fígado.

Neste sentido, quando realizamos experimentos, onde aclimatamos camundongos ao frio, certamente desafiamos o estado metabólico destes animais e verificamos algumas alterações de adaptação no fígado, a respeito do seu metabolismo lipídico. A aclimação ao frio, é uma abordagem para aumentar o catabolismo lipídico e outros substratos, que já vem sendo explorada nos últimos anos (STRAAT *et al.*, 2022). Sob esta condição, o estímulo adrenérgico promove aumento da lipólise do TAB, um tecido que é especializado em armazenar e liberar gorduras quando há o excesso ou déficit calórico (SEPA-KISHI *et al.*, 2019).

Neste caso, o frio aumentou naturalmente a liberação de AGs, substratos energéticos que são captados pelo fígado e principalmente pelo TAM, um processo fundamental para termogênese adaptativa. Camundongos sem lipase de triglicerídeos adiposos (ATGL) em adipócitos e que portanto, possuem dificuldade na liberação desses substratos lipídicos, são incapazes de manter sua temperatura corporal durante o desafio do frio (HAEMMERLE *et al.*, 2006).

Perante o desafio do frio, o fígado aparenta possuir o papel de atuar como um centro direcionador desses substratos lipídicos (ABUMRAD, 2017), já o TAM, é especializado em transformar esse substrato em energia para manutenção da termogênese (SEPA-KISHI *et al.*, 2019). Este perfil metabólico do fígado perante o desafio do frio foi identificado em nossos experimentos, tendo em vista que a maquinaria lipogênica teve sua atividade reduzida, quando observamos a diminuição da expressão de SREBP1c, ChREBP β , e principalmente SCD1 (**Figura 7 A**).

Corroborando este dado, o índice de dessaturação foi reduzido (**Figura 7 B**), revelando a diminuição de espécies lipídicas monoinsaturadas, dado que também foi confirmado pela lipidômica do fígado realizada posteriormente. Também notamos que o estímulo agudo do frio, ou seja, nas primeiras horas, já promove o aumento significativo de TG (**Figura 7 C**) mesmo com a redução da maquinaria lipogênica. Isto pode ser devido ao aumento do influxo de AGs advindos do TAB, que são transformados de forma direta em TGs no fígado, no entanto, sob estímulo crônico, a adaptação permite que os níveis de TG se normalizem (**Figura 7 C e D**) (SEPA-KISHI *et al.*, 2019).

Uma explicação para a diminuição da maquinaria lipogênica hepática perante o desafio do frio, é devido o estímulo ser similar a uma situação do estado de jejum, ao qual o balanço energético é negativo. Sendo assim, ocorre menor sinalização

insulínica e da glicose sobre dois dos principais fatores de transcrição responsáveis pela atividade lipogênica no fígado que são o SREBP1c e ChREBP, além disso, grande parte das enzimas envolvidas na maquinaria lipogênica são influenciadas pelo balanço energético, que quando negativo, são suprimidas (CZECH *et al.*, 2013; RUI, 2014; WANG *et al.*, 2015).

Além da forte influência do metabolismo da glicose, temos ação dos AGs exógenos e endógenos que também influenciam potencializando ou não a lipogênese hepática. Essa regulação provida pelos AGs ocorre por meios indiretos, através de alterações de sinalizações que medeiam a lipogênese, ou de forma direta, pela ligação destes AGs sobre fatores de transcrição chave no processo (JUMP; TRIPATHY; DEPNER, 2013). Neste sentido, os AGPIs, sobretudo o DHA, já foram destacados como AGs que suprimem a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na DNL, e eles também regulam os receptores PPARs, assim modulando o metabolismo de ácidos graxos (JUMP; TRIPATHY; DEPNER, 2013).

Deste modo, assim como foi observado por Grefhorst *et al.* (2018), uma diminuição da expressão gênica lipogênica hepática mediante aclimação ao frio, pode estar relacionada com o acúmulo de AGPIs, incluindo DHA, ARA e EPA (**Figura 9 C e 10**) que nós identificamos em maiores tempos de aclimação. Tanto Grefhorst *et al.* (2018) quanto Simcox *et al.* (2017), também perceberam aumento de TGs, no entanto, os experimentos realizados por estes pesquisadores, envolvia apenas estímulo agudo do frio (até 24 horas), enquanto que em nossos experimentos, o efeito crônico do frio mostrou que o metabolismo hepático aparenta se adaptar, pelo qual os níveis de TG se normalizam com três dias de aclimação ao frio (**Figura 7 C e D**). O aumento de TG no fígado, pela análise histológica (**Figura 8**), não resultou em dano hepático, assim como também não foi observado por Simcox *et al.* (2017).

Como supracitado, o desafio do frio em tempos maiores de aclimação, induziu a supressão da expressão gênica lipogênica hepática e da atividade da enzima SCD1. Ao mesmo tempo, observamos que ocorre uma mudança na composição dos AGs presentes no fígado. Sob a condição da termoneutralidade, vimos a predominância de AGMIs e AGSs incorporados em TGs, enquanto que, sob o efeito crônico de aclimação ao frio, AGPIs, tais como: DHA, EPA, e ARA, estão predominantemente incorporados ao triacilglicerol o invés de AGMIs e AGSs (**Figura 9 B, C; Figura 10**). A diminuição de AGMIs como o ácido oleico e o ácido palmitoleico (C16:1) (**Figura 11 A e B**) está de acordo com a diminuição da atividade de SCD1, tendo em vista que estes ácidos graxos são os principais produtos da dessaturação promovida por esta enzima (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). No entanto, o aumento de AGPIs no fígado, pode ser parcialmente explicado pelo aumento do influxo dessas espécies lipídicas a partir do aumento da lipólise e também da atividade da Fads2 no TAB (**Figura 12**).

Guimarães (2020), demonstrou que sob o estímulo crônico do frio, o ALA, espécie lipídica precursora do DHA e EPA, é reduzido somente no TAB. Além disso, demonstramos que expressão proteica de Fads2 aumenta somente no TAB e não no fígado a partir da aclimação ao frio (**Figura 12**). Isto nos sugere que, sob a aclimação crônica do frio, a maior parte da conversão do ALA em DHA e EPA, ocorre a partir da maior atividade da Fads2 no TAB, que é principal reservatório de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) (LIN; CONNOR, 1990), para que então, parte dos AGPIs liberados migrem para o fígado.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, realizamos experimentos de fluxo metabólico buscando investigar a síntese e migração destes AGPIs, porém, encontramos dificuldades metodológicas que não nos permitiram entender melhor a

comunicação entre o TAB e fígado, por isto esses experimentos e os resultados não foram acrescentados aqui. É de se destacar também, que durante a realização deste trabalho, também aumentamos nossa colônia de camundongos *Fads2* FLOX, o que permitirá em um próximo trabalho, aprofundar o conhecimento a respeito da necessidade da *Fads2* no remodelamento do perfil lipídico no fígado. A partir da aclimação ao frio de camundongos que não expressem *Fads2* em adipócitos, observaremos se haverá menores níveis de DHA e EPA no fígado destes animais, a partir da possível deficiência da conversão do ALA nestes AGPIs no TAB.

Sadurskis *et al.* (1995) demonstraram que camundongos que receberam dietas de curto prazo, enriquecidas com AGPIs, tiveram melhora da capacidade termogênica do TAM através do significativo aumento da UCP1. Fan *et al.* (2018) observaram em camundongos, que a suplementação materna de n-3 AGPIs potencializou a programação transcricional do TAM fetal, impactando diretamente na biogênese do TAM e podendo resultar em benefícios metabólicos de longo prazo para a prole. Esses trabalhos revelam a importância dos AGPIs na formação e ativação do TAM, ao qual o fígado, durante a situação de termogênese adaptativa, é importante na administração e fornecimento destas espécies lipídicas para o TAM.

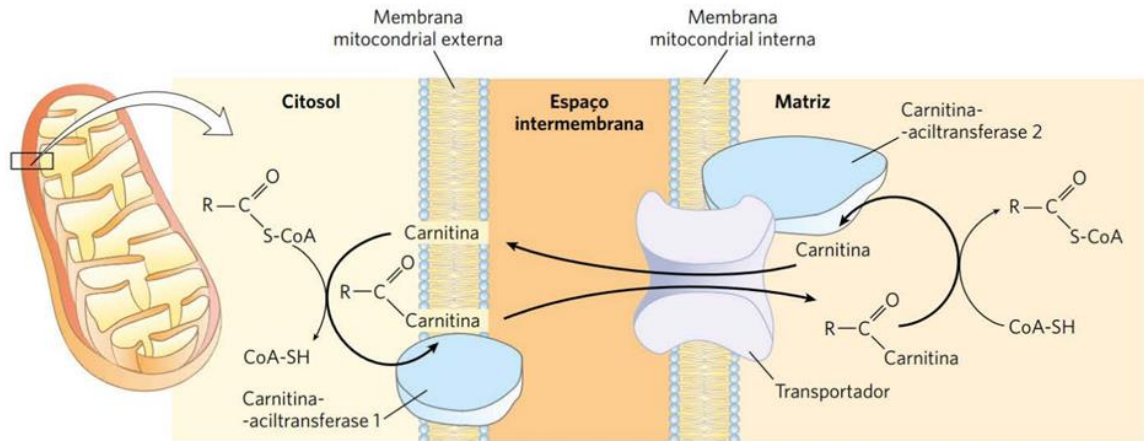
Neste sentido, Simcox *et al.* (2017) realizaram um trabalho que evidencia o fígado como este órgão chave na termogênese adaptativa. Neste trabalho, eles expuseram camundongos C57Bl/6J sob temperatura ambiente (25 °C) e sob o frio de forma aguda (5 °C durante 5 horas). Eles observaram que, durante a termogênese adaptativa, os animais aclimatados ao frio necessitaram do aumento da liberação de AGs a partir da lipólise no TAB, para que houvesse a produção hepática de acilcarnitinas por meio de maior ativação do receptor HNF4 α , um regulador da expressão de genes envolvidos no metabolismo da acilcarnitina. As acilcarnitinas por

sua vez, tiveram aumento de seu nível no plasma e foram transportadas para o TAM onde foram metabolizadas, contribuindo para manutenção da termogênese no TAM. O bloqueio da produção desses lipídios no fígado prejudicou a termogênese.

De forma semelhante, os nossos dados mostram que a partir da aclimação ao frio pelo período de 7 dias, ocorre o aumento de acilcarnitinas no fígado (**Figura 13 C**). Isto nos indica que aparentemente esta modulação do metabolismo lipídico em favor da preservação de algumas espécies lipídicas no fígado, se inicia sob efeito agudo, mas perdura durante períodos maiores de aclimação ao frio, revelando um processo adaptativo do fígado, além de mostrar a necessidade de um sistema de comunicação inter-órgãos bem orquestrado para regular a mobilização de energia para a produção de calor.

Ainda sobre o dado de acilcarnitinas, é importante ressaltar que, ácidos graxos com menos de 12 carbonos em sua estrutura, conseguem atravessar facilmente a membrana mitocondrial para serem metabolizados. Já AGs com 14 ou mais carbonos é necessário que a enzima Carnitina Palmitoiltransferase I catalise a transesterificação da acil-CoA com a carnitina, formando acilcarnitina e CoA. Assim, AGs ligados a carnitinas conseguem atravessar a membrana mitocondrial, onde a segunda enzima, a Carnitina Palmitoiltransferase II catalisa a transesterificação da acilcarnitina com a CoA, regenerando acil-CoA de cadeia longa e carnitina, para que então, os AGs já no interior da matriz mitocôndrial, venham a ser liberados e oxidados para geração de energia (**Figura 22**) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2019).

Figura 22 – Esquema da entrada de ácidos graxos na mitocôndria pelo transportador acilcarnitina/carnitina. Após a formação de acilcarnitina na membrana externa da mitocôndria ou no espaço intermembrana, ela consegue atravessar para matriz mitocôndrial onde é transesterificada, o grupamento acila é transferido para CoA e a carnitina liberada.



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (2019).

Tendo em mente, esse processo de utilização de alguns AGs de cadeia longa como combustível energético, o resultado que nos mostra o aumento de acilcarnitinas no fígado frente a aclimatação crônica do frio (**Figura 13 C**), nos sugere que o fígado tem preferência em preservar espécies lipídicas de cadeia longa, para que estas então, sejam direcionadas ao TAM.

Este resultado é corroborado pela diminuição da beta-oxidação de AGs no fígado frente ao desafio do frio (**Figura 13 B**). Este dado em questão, nos gerou muitas dúvidas, tão logo, repetimos esse experimento três vezes e, em todos os resultados foi consistente. Isto porque, numa situação catabólica como a aclimatação ao frio, esperávamos o aumento da oxidação dos AGs nas mitocôndrias para geração de ATP e NADH, facilitando a gliconeogênese e a geração de Acetil-CoA. Assim, além da glicose oriunda da glicogenólise e da gliconeogênese, o fígado oferta corpos cetônicos para tecidos bastante oxidativos.

Além disso, em um estudo com ratos expostos ao frio, Iossa, Barletta e Liverini

(1994) demonstraram aumento da oxidação de AGs mitocondriais no fígado. Já Grefhorst *et al.* (2018), realizaram um trabalho, onde eles expuseram camundongos C57Bl/6J de 3 a 4 meses de idade ao frio (4 °C) por 10 dias. Eles observaram que além do aumento dos níveis de TG, as concentrações hepáticas de glicogênio foram reduzidas drasticamente, mas não alteraram as concentrações hepáticas de glicose-6-fosfato. Eles também avaliaram somente por expressão gênica, se o aumento dos níveis de TG poderia estar associado a redução da oxidação de ácidos graxos e/ou aumento da síntese de ácidos graxos.

Assim como em nossos achados, Grefhorst e colaboradores (2018), observaram redução significativa de genes da via lipogênica hepática após o frio, mas não tiveram uma resposta conclusiva quanto a oxidação de ácidos graxos. Sendo assim, é uma possibilidade plausível, que o aumento de TG num primeiro momento, seja devido ao aumento do influxo de AGs e a diminuição da oxidação dos mesmos no fígado. Uma outra possibilidade, é de que num primeiro momento, a maquinaria hepática para secreção de VLDL não esteja preparada para uma alta carga de AGs advindos da lipólise do TAB, não conseguindo liberar esses TGs, neste caso, a normalização dos níveis de TG no fígado sob efeito crônico da aclimatação ao frio (**Figura 7 C e D**), possivelmente pode ser um resultado da capacidade adaptativa do fígado de aumentar a secreção de VLDL-TG (WILLEBRORDS *et al.*, 2015). Em contraste a esta hipótese, Grefhorst *et al.* (2018) encontraram redução da secreção de VLDL-TG, mas apresentaram esse dado baseado em cálculo a partir da curva plasmática de TG *versus* tempo.

Já em um trabalho mais recente, Shin *et al.* (2022) ao examinarem os perfis plasmáticos de camundongos C57BL/6J do tipo selvagem expostos à temperatura ambiente (22°C) ou ao frio (frio; 6°C), mediram VLDLs circulantes a partir da APOB100

e notaram acentuada diminuição, no entanto, eles também demonstram que possivelmente esta diminuição não é devida a diminuição da secreção hepática, e sim a partir de maior absorção de VLDL em adipócitos marrons, eventualmente levando a uma diminuição de VLDLs circulantes. Essas evidências fortalecem o fato de que durante a termogênese adaptativa, quantidades substanciais de fontes de energia são utilizadas para geração de calor, sendo o metabolismo de AGs no fígado, um ponto crucial nesta comunicação entre órgãos.

Outro ponto importante, é que notamos aumento da oxidação fosforilativa (OXPHOS), que foi mais acentuada no dia 3 de exposição (**Figura 13 A**) em conjunto com a sustentada redução da beta-oxidação (**Figura 13 B**). Estes dados sugerem que de alguma forma, a mitocôndria hepática se utiliza de outros mecanismos adaptativos para continuar gerando ATP via OXPHOS. Nós avaliamos parâmetros de dinâmica e morfologia mitocondrial, mas não notamos diferenças que pudessem ajudar no entendimento dessa questão.

Esta parte do trabalho certamente pode ser melhor explorada em trabalhos futuros, tendo em vista que a literatura é bastante escassa e controversa quanto aos efeitos do frio sobre a mitocôndria hepática. Ainda assim, tivemos possivelmente uma resposta parcial, ao percebermos o aumento dos níveis de CoQ-9 e CoQ-10, o que refletiu-se em maior concentração de CoQ total (**Figura 14**). Deste modo, acreditamos na hipótese que haja uma adaptação mitocondrial hepática que, durante a termogênese adaptativa, aumenta a sua eficiência energética, de modo que poupe os AGs de cadeia longa como metabólitos energéticos que serão ofertados ao TAM por meio do VLDL.

A respeito do VLDL, exploramos o perfil lipídico desta lipoproteína importante no transporte e entrega dos AGs ao TAM (SHIN *et al.*, 2022). Tínhamos como

expectativa, o aumento de AGPIs na fração de VLDL como resposta da preservação destas espécies lipídicas que foi observado no fígado. De fato, a partir da análise de lipidômica da fração de VLDL obtida do plasma, encontramos um remodelamento do conteúdo lipídico do VLDL a partir da aclimação ao frio, havendo o aumento de AGPIs como DHA, ARA e EPA, que encontram-se de forma incorporada aos TGs; já na condição de termoneutralidade, temos a predominância de TGs incorporados com AGMIs (**Figura 19 B; Figura 20**).

Como discutido anteriormente, seria interessante em trabalhos futuros, avaliarmos se ocorre de fato o aumento da secreção de VLDL pelo fígado, ou se ocorre apenas o remodelamento do perfil lipídico, como observamos durante a termogênese adaptativa. Também notamos que na fração de VLDL, a quantidade total de TGs está reduzida com 1 dia de aclimação ao frio (**Figura 21 A**), mesmo período em que está aumentado no fígado (**Figura 7 C**), mas a partir do terceiro dia de exposição ao frio, os níveis de TGs na fração de VLDL aumentam (**Figura 21 A**), enquanto o nível de TGs no fígado no mesmo período se normaliza (**Figura 7 C**).

É muito provável que estes dados estejam correlacionados, tendo em vista o processo de montagem do VLDL no fígado a partir dos TGs. Além disso, destacamos aqui a importância de AGPIs como substrato energético, importante para manutenção da termogênese, deste modo, é plausível considerarmos que o aumento da incorporação de AGPIs em TGs no fígado ocorra em detrimento do transporte destes metabólitos lipídicos essenciais ao TAM através do VLDL.

Shin *et al.* (2022) em seu trabalho, avaliaram a captação do VLDL mediada pelo seu receptor VLDLR em adipócitos marrons termogênicos. Primeiro, eles mostraram que o VLDL conjugado com fluorescência (VLDL-Dil) incubado com TAM, TAB inguinal e TAB epididimal *ex vivo*, esteve acumulado em altos níveis no TAM em

comparação com os outros depósitos de gordura, além disso, da mesma forma, adipócitos marrons primários isolados de camundongos expostos ao frio, absorveram graus mais altos de VLDL-Dil do que aqueles de camundongos expostos à temperatura ambiente. Ao avaliarem se o VLDL é crucial para a execução termogênica no frio, eles inibiram farmacologicamente a secreção hepática de VLDL em camundongos e perceberam que estes animais tratados tiveram menor tolerância ao frio, além disso, genes termogênicos no TAM, estimulados pelo frio, foram diminuídos juntamente com os níveis de UCP1. Ademais, VLDLs captados via VLDLR aumentaram a oxidação mitocondrial e, subseqüentemente, a expressão gênica termogênica em adipócitos marrons ativados por β -adrenérgicos.

Em vista disso, estes dados indicam que os VLDL circulantes possuem capacidade de modular a função termogênica no TAM. Portanto, o remodelamento do perfil lipídico hepático e por consequência o remodelamento do perfil lipídico da fração de VLDL observado em nossos resultados, podem estar intimamente relacionados a um processo eficiente de termogênese adaptativa, através do fornecimento de espécies lipídicas que favorecem a atividade termogênica do TAM.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho nos permite dizer que possivelmente, a aclimação ao frio, uma condição de alta demanda energética para manutenção da temperatura, provoca mudanças profundas sob o metabolismo hepático de lipídeos que influenciam a conformação do lipídico do VLDL. Tendo em vista, que a sustentação da termogênese adaptativa é também promovida pelo fornecimento de VLDL ao TAM, hipotetizamos que este remodelamento lipídico que ocorre no fígado, e por consequência também no VLDL, seja necessário na manutenção do processo de termogênese no TAM. No entanto, neste presente trabalho não foi possível averiguar o impacto destas alterações sob o TAM na termogênese adaptativa.

A Fads2 aparentemente é modulada pela exposição ao frio no tecido adiposo branco perigonadal e subcutâneo, onde sua atividade é aumentada com o maior tempo de aclimação ao frio. Essa modulação não foi vista no fígado a partir da expressão gênica e proteica. Isso fortalece nossa hipótese, enfatizando que a maior parte da conversão do ALA em DHA e EPA ocorre no tecido adiposo branco, com importante ação da Fads2, para então ocorrer o aumento do influxo desses AGPIs no fígado a partir do terceiro dia de aclimação ao frio, no entanto, mais experimentos são necessários para elucidar essa questão.

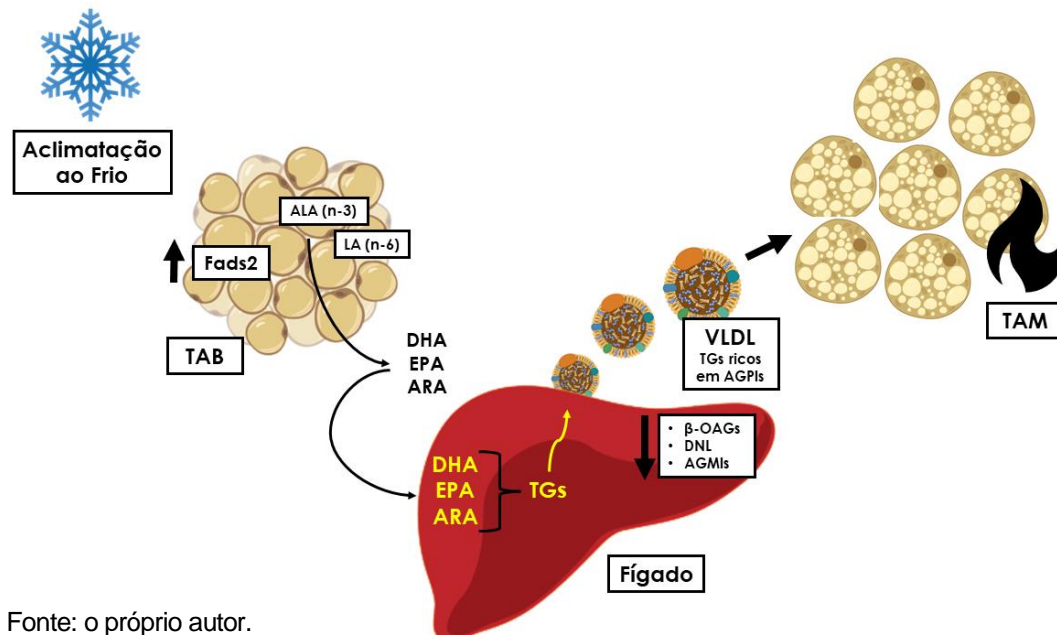
Realizamos ensaios de respirometria que originaram resultados consistentes, quanto ao aumento da oxidação fosforilativa (OXPHOS) via oximetria (Oroboros™). De forma paralela, os ensaios de beta-oxidação estimulada por palmitoil-carnitina em todos os tempos de exposição ao frio se mostraram reduzidos. Dado que foi corroborado pelo aumento de acilcarnitinas. Estes dados nos sugerem uma preservação dos Acs, enquanto substratos metabólicos no fígado, favorecendo sua

incorporação em TGs e VLDL. Por outro lado, a mitocôndria do hepatócito de alguma maneira aparenta se adaptar para continuar gerando ATP via OXPHOS. Os dados de morfologia e dinâmica mitocondrial não nos indicaram alterações que justificassem a geração de ATP via OXPHOS. Até o presente trabalho, o dado que justificou parcialmente o aumento da taxa de consumo de oxigênio, foi o aumento da coenzima Q, que nos sugere melhora da eficiência da cadeia transportadora de elétrons no tocante a entrega de elétrons.

Por fim, a fração de VLDL dos animais aclimatados ao frio comparados com a termoneutralidade, nos permitiu identificar que a mudança de perfil lipídico presente no fígado após aclimação ao frio, é refletido no seu produto VLDL. Assim como observamos no fígado, o aumento de AGPIs incorporados em TGs ao invés de AGMIs e AGSs, também ocorre na fração de VLDL. Isto nos indica que o remodelamento do perfil lipídico hepático é peça chave no processo da termogênese adaptativa, através do fornecimento de espécies lipídicas que são ancoradas no VLDL, e que desta forma, migram pela circulação e favorecem a atividade termogênica no TAM.

Os dados de maneira geral, nos sugerem que o fígado durante a termogênese adaptativa molda o seu metabolismo lipídico, a fim de poupar espécies específicas de ácidos graxos que foram captados com o aumento da lipólise e da atividade de Fads2 no TAB_{pg} e TAB_{sub}. O perfil desses ácidos graxos é modificado, utilizado para incorporação em novos triglicérides que são exportados na forma de VLDL, e que possivelmente sustentarão a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (**Figura 23**). No entanto, são necessários mais experimentos principalmente no tocante a investigação do papel e perfil lipídico do VLDL na termogênese adaptativa; dinâmica e morfologia mitocondrial do fígado e TAM; perfil lipídico do TAM, e a necessidade da enzima Fads2 no TAB no processo de adaptação termogênica.

Figura 23 – Esquema do modelo hipotético proposto. O fígado durante a termogênese adaptativa, molda o seu metabolismo lipídico a fim de poupar espécies específicas de ácidos graxos que foram captados com o aumento da lipólise e da atividade de Fads2 no TABpg e TABsub. O perfil desses ácidos graxos é modificado, utilizado para incorporação em novos triglicérides que são exportados na forma de VLDL, e que possivelmente sustentarão a atividade termogênica do tecido adiposo marrom.



REFERÊNCIAS

- ABUMRAD, Nada A. The liver as a hub in thermogenesis. **Cell metabolism**, v. 26, n. 3, p. 454-455, 2017.
- ALJOHANI, Ahmed M.; SYED, Deeba N.; NTAMBI, James M. Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 12, p. 831-842, 2017.
- ATTIE, Alan D.; SCHERER, Philipp E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S395-S399, 2009.
- BASU, Debapriya; GOLDBERG, Ira J. Regulation of lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglycerides. **Current opinion in lipidology**, v. 31, n. 3, p. 154, 2020.
- BECHER, Tobias, *et al.* "Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health." **Nature medicine**, n. 27, v. 1, p. 58-65, 2021.
- BETZ, Matthias. J.; ENERBÄCK, Sven. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, n. 14, v. 2, p. 77–87, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.132>>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- BLONDIN, Denis P. *et al.* Dietary fatty acid metabolism of brown adipose tissue in cold-acclimated men. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 14146, 2017.
- BOTOLIN, Daniela *et al.* Docosahexaenoic acid [22: 6, n-3] regulates rat hepatocyte sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. **J. Lipid Res**, v. 47, p. 181-192, 2006.
- CARPENTIER, André C. *et al.* Brown adipose tissue energy metabolism in humans. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 447, 2018.
- CASTRO, L. F. C.; TOCHER, D. R.; MONROIG, O. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. **Progress in Lipid Research**, v. 62, p. 25–40, 2016.
- CHAVES-FILHO, Adriano Britto *et al.* Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11642, 2019.
- CHEN, Guoxun *et al.* Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11245-11250, 2004.
- CHEW, Nicholas W. S. *et al.* The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019. **Cell Metabolism**, v. 35, n. 3, p. 414-428, 2023.
- CHOUCHANI, E. T.; KAZAK, L.; SPIEGELMAN, B. M. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 27-37, 2019.

CZECH, Michael P. *et al.* Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia**, v. 56, p. 949-964, 2013.

DENTIN, R.; BENHAMED, F.; PÉGORIER, J. P.; FOUFELLE, F.; VIOLLET, B.; VAULONT, S.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2843–2854, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI25256>>. Acesso em: 12 fev. 2023.

DENTIN, Renaud *et al.* Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. **Journal of hepatology**, v. 56, n. 1, p. 199-209, 2012.

DEVI, S. Asha; MANJULA, K. R. Intermittent cold-induced hippocampal oxidative stress is associated with changes in the plasma lipid composition and is modifiable by vitamins C and E in old rats. **Neurochemistry international**, v. 74, p. 46-52, 2014.

DONG, Mei *et al.* Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. **Cell metabolism**, v. 18, n. 1, p. 118-129, 2013.

FAN, Rong *et al.* Maternal n-3 PUFA supplementation promotes fetal brown adipose tissue development through epigenetic modifications in C57BL/6 mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 12, p.1488-1497, 2018.

FEINGOLD, Kenneth R. Introduction to lipids and lipoproteins. **Endotext** [internet], 2021.

_____. Lipid and Lipoprotein Metabolism. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 51, n. 3, p. 437-458, 2022.

FORETZ, Marc *et al.* ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 5, p. 3760-3768, 1999.

GLASER, Claudia; HEINRICH, Joachim; KOLETZKO, Berthold. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. **Metabolism**, v. 59, n. 7, p. 993-999, 2010.

GORDON, David A.; JAMIL, Haris. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1486, n. 1, p. 72-83, 2000.

GREFHORST, Aldo *et al.* Multiple effects of cold exposure on livers of male mice. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 2, p. 91-106, 2018.

- GUIMARÃES, R. **O papel do ácido docosahexaenoico (dha) como uma lipocina anti-lipogênica necessária para a adaptação do fígado à exposição ao frio.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Realizada pelo Programa de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP); Ribeirão Preto, 78, p. 2020.
- HAEMMERLE, Guenter *et al.* Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 312, n. 5774, p. 734-737, 2006.
- HEEREN, Joerg; SCHEJA, Ludger. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. **Molecular metabolism**, v. 50, p. 101-238, 2021.
- HELLERSTEIN, Marc K.; SCHWARZ, Jean-Marc; NEESE, Richard A. Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. **Annual review of nutrition**, v. 16, n. 1, p. 523-557, 1996.
- HERMAN, Mark A. *et al.* A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 333-338, 2012.
- HODSON, L.; GUNN, P. J. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 12, p. 689-700, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0256-9>>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- HOEKE, G.; KOOIJMAN, S.; BOON, M. R.; RENSEN, P. C. N.; BERBEE, J. F. P. Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 1, n. 181, p. 173-182, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306647>>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- HYUN, Chang-Kee *et al.* Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 4, p. 480-486, 2010.
- IOSSA, Susana; BARLETTA, Antonio; LIVERINI, Giovanna. Diferentes efeitos da exposição e aclimatação ao frio na oxidação de ácidos graxos mitocondriais do fígado de rato e na produção de corpos cetônicos. **The International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 425-431, 1994.
- JUMP, Donald B. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. **Chemistry and physics of lipids**, v. 153, n. 1, p. 3-13, 2008.
- JUMP, Donald B.; TRIPATHY, Sasmita; DEPNER, Christopher M. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 249-269, 2013.
- KAJIMURA, Shingo; SPIEGELMAN, Bruce M.; SEALE, Patrick. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. **Cell metabolism**, v. 22, n. 4, p. 546-559, 2015.
- KALRA, Arjun *et al.* Physiology, liver, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30571059>>. Acesso em: 14 jul. 2023.

KOO, Seung-Hoi; DUTCHER, Angela K.; TOWLE, Howard C. Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 12, p. 9437-9445, 2001.

KUMAR, A.; BUTT, N. A.; LEVENSON, A. S. Natural epigenetic-modifying molecules in medical therapy. In: **Medical epigenetics**. Academic Press, p. 747-798, 2016.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

LEIRIA, Luiz Osório *et al.* 12-Lipoxygenase regulates cold adaptation and glucose metabolism by producing the omega-3 lipid 12-HEPE from brown fat. **Cell metabolism**, v. 30, n. 4, p. 768-783. e7, 2019.

LEITNER, Brooks P. *et al.* "Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men". **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 114, n. 32, p. 8649-8654, 2017.

LIN, Don S.; CONNER, W. E. Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue? **The American journal of clinical nutrition**, v. 51, n. 4, p. 535-539, 1990.

LINDEN, Albert G. *et al.* Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice [S]. **Journal of lipid research**, v. 59, n. 3, p. 475-487, 2018.

LORENTE-CEBRIÁN, S.; COSTA, A. G. V.; NAVAS-CARRETERO, S.; ZABALA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. **J. Physiol. Biochem**, v. 69, p. 633-651, 2013.

LORENTE-CEBRIÁN, S.; COSTA, A. G. V.; NAVAS-CARRETERO, S.; ZABALA, M.; LAIGLESIA, L. M.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. **J. Physiol. Biochem**, v. 71, p. 341-349, 2015.

LYNES, Matthew D. *et al.* The cold-induced lipokine 12, 13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. **Nature medicine**, v. 23, n. 5, p. 631-637, 2017.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, L.; LAIGLESIA, L. M.; HUERTA, A. E.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 121, p. 24-41, 2015.

MIYAZAKI, Makoto *et al.* Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. **Cell metabolism**, v. 6, n. 6, p. 484-496, 2007.

- OBOH, Angela *et al.* Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- OUIMET, Mireille; BARRETT, Tessa J.; FISHER, Edward A. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. **Circulation research**, v. 124, n. 10, p. 1505-1518, 2019.
- POWNALL, Henry J. *et al.* High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 10, p. 712-723, 2021.
- PRIEST, C.; TONTONOZ, P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. **Nature Metabolism**, v. 12, p. 1177-1188, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>>. Acesso em: 14 abr. 2023.
- RAABE, M.; VENIANT, M. M.; SULLIVAN, M. A.; ZLOT, C. H.; BJORKEGREN, J.; NIELSEN, L. B.; WONG, J. S.; HAMILTON, R. L.; Young, S. G. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. **J Clin Invest**, v. 103, p. 1287-1298, 1999.
- RAMSEYER, Vanesa D.; GRANNEMAN, James G. Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. **Adipocyte**, v. 5, n. 2, p. 119-129, 2016.
- ROSSO, Chiara *et al.* Crosstalk between adipose tissue insulin resistance and liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v.71, n. 5, p. 1012-1021, 2019.
- RUI, Liangyou. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, v. 4, n. 1, p. 177, 2014.
- SAARI, T. J. *et al.* “Basal and cold-induced fatty acid uptake of human brown adipose tissue is impaired in obesity”. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14373, 2020.
- SADURSKIS, A. I. J. A. *et al.* Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 269, n. 2, p. E351-E360, 1995.
- SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. **Life sciences**, v. 203, p. 255-267, 2018.
- SCHEJA, L.; HEEREN, J. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1176-1186, 2016.
- SEO, Young-Kyo *et al.* Genome-wide analysis of SREBP-1 binding in mouse liver chromatin reveals a preference for promoter proximal binding to a new motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 13765-13769, 2009.

SEPA-KISHI, Diane M. *et al.* Cold acclimation enhances UCP1 content, lipolysis, and triacylglycerol resynthesis, but not mitochondrial uncoupling and fat oxidation, in rat white adipocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 316, n. 3, p. C365-C376, 2019.

_____. Cold acclimation reduces hepatic protein Kinase Band AMP-activated protein kinase phosphorylation and increases gluconeogenesis in Rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 5, p. e13592, 2018.

SETHI, Jaswinder K.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nature metabolism**, v. 3, n. 10, p. 1302-1312, 2021.

SHIN, Kyung Cheul *et al.* VLDL-VLDLR axis facilitates brown fat thermogenesis through replenishment of lipid fuels and PPAR β/δ activation. **Cell Reports**, v. 41, n. 11, p. 111806, 2022.

SIMCOX, Judith *et al.* Global analysis of plasma lipids identifies liver-derived acylcarnitines as a fuel source for brown fat thermogenesis. **Cell metabolism**, v. 26, n. 3, p. 509-522, e6, 2017.

SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1282-1293, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>>. Acesso em: 14 abr. 2023.

SPONTON, Carlos H.; LIMA-JUNIOR, Jose Carlos de; LEIRIA, Luiz O. What puts the heat on thermogenic fat: metabolism of fuel substrates. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2022.

STRAAT, Maaïke E. *et al.* Cold exposure induces dynamic changes in circulating triacylglycerol species, which is dependent on intracellular lipolysis: a randomized cross-over trial. **EBioMedicine**, v. 86, 2022.

TAKEUCHI, Y.; YAHAGI, N.; IZUMIDA, Y.; NISHI, M.; KUBOTA, M.; Teraoka, Y.; YAMAMOTO, T.; MATSUZAKA, T.; NAKAGAWA, Y.; SEKIYA, M.; IIZUKA, Y.; OHASHI, K.; OSUGA, J. I.; GOTODA, T.; ISHIBASHI, S.; ITAKA, K.; KATAOKA, K.; NAGAI, R.; YAMADA, N.; SHIMANO, H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11681-11691, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096107>>. Acesso em: 11 jun. 2023.

THOMOU, Thomas *et al.* Adipose-derived circulating mirnas regulate gene expression in other tissues. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 450-455, 2017.

VOS, Dyonne Y.; VAN DE SLUIS, Bart. Function of the endolysosomal network in cholesterol homeostasis and metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). **Molecular metabolism**, v. 50, p. 101146, 2021.

- VOSS, A.; REINHART, M.; SANKARAPPA, S.; SPRECHERS, H. Acid in Rat Liver Is Independent of a 4-Desaturase". **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 19995-20000, nov. 1991.
- WANG, Yuhui *et al.* Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 11, p. 678-689, 2015.
- WILLEBRORDS, Joost *et al.* Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. **Progress in lipid research**, v. 59, p. 106-125, 2015.
- WU, Xin; HUANG, Tonghui. Recent development in acetyl-CoA carboxylase inhibitors and their potential as novel drugs. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 533-561, 2019.
- XU, J.; NAKAMURA, M. T.; CHO, H. P.; CLARKE, S. D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 23577-23583, 1999.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23577>>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- YAN, Jun; LI, Song; LI, Shulin. The role of the liver in sepsis. **International reviews of immunology**, v. 33, n. 6, p. 498-510, 2014.
- YANG, Jinchunzi *et al.* Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects of omega-3 fatty acid supplementation. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 872, 2019.
- YE, Jessica; MEDZHITOV, Ruslan. Control strategies in systemic metabolism. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 10, p. 947-957, 2019.
- YIP, Terry Cheuk-Fung *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a Unique Entity or Part of the Metabolic Syndrome or Both. **Medical Clinics**, 2023.
- YOSHIDA, Yasukazu *et al.* Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. **Analytical biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 105-115, 2008.

ANEXO A – Autorização da execução do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP)



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



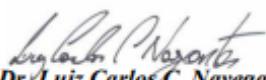
A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“O crosstalk entre fígado e tecido adiposo para regulação da lipogênese hepática”*, registrado com o número do protocolo **068/2021**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no dia 21 de fevereiro de 2022.

Colaboradores: Tiago Tomazini Gonçalves
Victor Azevedo Vieira
João Manoel Alves

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			21/02/2022 a 04/02/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	250	22g / 60 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / Fads2 Flox	20	25g / 60 dias	Macho	Empresa Taconic (MA-USA)
Camundongo / AdiponectinaCRE	20	25g / 60 dias	Macho	The Jackson Laboratory

Ribeirão Preto, 21 de fevereiro de 2022


Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP