TIAGO EUGÊNIO OLIVEIRA DA SILVA

INGESTÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÓLEO DE PEIXE AUMENTA O GASTO ENERGÉTICO INDEPENDENTEMENTE DE UCP1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

TIAGO EUGÊNIO OLIVEIRA DA SILVA

INGESTÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÓLEO DE PEIXE AUMENTA O GASTO ENERGÉTICO INDEPENDENTEMENTE DE UCP1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia

Versão Corrigida.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica

do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo Ficha Catalográfica elaborada pelo(a)

Silva, Tiago Eugênio Oliveira da
INGESTÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÓLEO DE PEIXE AUMENTA O GASTO ENERGÉTICO INDEPENDENTEMENTE DE UCP1 / Tiago Eugênio Oliveira da Silva; orientador William Tadeu Lara Festuccia Festuccia. -- São Paulo, 2018.
77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Óleo de peixe. 2. Ácidos graxos N3. 3. Balanço energético. 4. Gasto energético. 5. Obesidade. I. Festuccia, William Tadeu Lara Festuccia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tiago Eugênio Oliveira da Silva.

Título da Dissertação/Tese: Ingestão de dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe aumenta o gasto energético independentemente de ucp1.

Orientador: William Tadeu Lara Festuccia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Caracterização do envolvimento do sensor de nutrientes mTOR no desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas associadas a obesidade***", registrado sob o protocolo nº ***115/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***24/09/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***William Tadeu Lara Festuccia***
- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*
- Membros da Equipe: *Thiago Belchior (Pós-doutorando), Fernanda Janku Cabral (Pós-doutorando), Alex Shimura Yamashita (Pós-doutorando), Juliana Magdalon (Pós-graduando), Maynara Lucca Andrade (Pós-graduando), Rafael Junges Moreira (Pós-graduando), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Pós-graduando), Érique de Castro (Pós-graduando), Milene Ortiz silva (Pós-graduando), Thayna dos Santos Vieira (Treinamento técnico), Carlos Mario Donado Pestana (Pós-doutorando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Involvement of the nutrient sensor mTOR in the development of obesity associated chronic metabolic diseases***", protocol nº ***115/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***9/24/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***William Tadeu Lara Festuccia***
- Team members: *Thiago Belchior (Postdoctoral Researcher), Fernanda Janku Cabral (Postdoctoral Researcher), Alex Shimura Yamashita (Postdoctoral Researcher), Juliana Magdalon (Graduate Student), Maynara Lucca Andrade (Graduate Student), Rafael Junges Moreira (Graduate Student), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Graduate Student), Érique de Castro (Graduate Student), Milene Ortiz Silva (Graduate Student), Thayna dos Santos Vieira (Technical Trainee), Carlos Mario Donado Pestana (Postdoctoral Researcher).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/ Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57BL/6J*	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*230*
	Tsc1 floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*140*
	Raptor floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*80*
	Pten floxed albumina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*80*
	PTEN/Rictor duplo floxed albumina Cre +/- e PTEN/Raptor duplo floxed albumina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*90*
	UCP1 KO - B6.129-UCP1 TM1KZ/J	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*160*
	Rictor floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*40*

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

	Ulk1 floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*40*
	Insulina receptor floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*40*
	Pten floxed adiponectina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*40*
	Tsc1 floxed albumina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*30*
	Raptor floxed albumina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*30*
	PPARgama floxed albumina Cre +/-	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*45*
	NLRP3 KO	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*40*

São Paulo, 26 de setembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

DEDICATÓRIA

Com muito amor, aos meus Pais, Mário Eugênio e Maria dos Remédios e aos meus irmãos, Mário Júnior e Isaac César.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda iluminação e a toda minha família que é um alicerce na minha vida.

Ao meu orientador William Festuccia, pela oportunidade, confiança depositada, respeito e amizade.

A todos meus amigos do laboratório: Thiago, Érique, Maynara, Rafael, Milene, Gustavo, Mayara, Albert. Sem vocês nada disso teria acontecido.

A Thainá, por todo apoio intelectual e técnico.

A todos os professores que passaram na minha vida até hoje.

A todos os meus amigos e amigas que estão no Piauí.

A minha namorada, Agda Nunes, por dedicar parte do seu tempo e contribuir de forma importante na minha vida.

Aos laboratórios que nos ajudam.

Ao meu querido Japonês-paulista-alemão, Marcos.

A todos os funcionários do ICB-1.

Aos meus queridos: Luziane, Rosa Lúcia e Lucas. Sinto muita saudade de vocês.

Às agências de fomento: FAPESP e CAPES.

RESUMO

SILVA, T.E.O. **Ingestão de dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe aumenta o gasto energético independentemente de UCP1.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Introdução: Estudos realizados em nosso laboratório encontraram que o aumento do conteúdo corporal de ácidos graxos ômega 3 (N3) pela expressão da enzima dessaturase de C. *elegans* que converte ômega 6 em N3, protege camundongos do ganho de peso corporal e obesidade induzidos por dieta hiperlipídica**. Objetivo:** Investigar os efeitos da ingestão de dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe no peso corporal, balanço energético, adiposidade, homeostase da glicose e composição lipídica dos tecidos adiposos inguinal (TAI) e marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J selvagens e deficientes para a proteína desacopladora 1 (UCP1 KO). **Materiais e Métodos:** Protocolo **1**- Camundongos C57BL6/J alimentados por 8 semanas com dieta normal (DN) contendo 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco, dieta normal N3 (DNN3) contendo 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe, dieta hiperlipídica (HFD) contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco e dieta hiperlipídica (HFDN3) contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe foram avaliados para o peso corporal, eficiência energética, ingestão alimentar, calorimetria indireta, adiposidade, tolerâncias à glicose e à insulina, consumo de oxigênio tecidual lipidôma dos tecidos adiposos inguinal (TAI) e marrom (TAM). Protocolo **2**- Camundongos selvagens e UCP1 KO alimentados por 8 semanas com dieta HFD e HFDN3 foram avaliados para o peso corporal, eficiência energética, ingestão alimentar, calorimetria indireta, adiposidade, tolerância à glicose, e consumo de oxigênio tecidual. **Resultados:** Protocolo **1**- Não houve diferenças significativas no ganho de peso, adiposidade, ingestão alimentar, consumo de oxigênio e tolerância à glicose entre camundongos C57BL6/J alimentados com as dietas DN e DNN3. Entretanto, camundongos alimentados com dieta HFDN3 apresentaram reduzido ganho de peso corporal, massa dos tecidos adiposos e eficiência energética quando comparados a camundongos alimentados com dieta HFD. Esses efeitos aconteceram na ausência de alterações significativas na ingestão alimentar medida tanto em gramas quanto em Kcal entre os grupos. Corroborando a menor eficiência energética, camundongos C57BL6/J alimentados com dieta HFDN3 apresentaram maior consumo de oxigênio e similar atividade locomotora espontânea que camundongos alimentados com dieta HFD. Demonstramos que o consumo de oxigênio do TAI foi maior no grupo HFDN3 quando comparado ao grupo HFD. Por fim, análise lipidômica do TAI e TAM revelou alterações importantes na composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis (TAG) desses tecidos, caracterizadas sobretudo por um enriquecimento de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) após ingestão de dieta HFDN3. Protocolo **2**- Demonstramos que a dieta HFDN3 protege os camundongos UCP1 KO contra o ganho de peso corporal, aumenta o gasto energético e melhora à tolerância à glicose de maneira independente da UCP1. **Conclusão:** A substituição da banha de porco pelo óleo de peixe na dieta hiperlipídica aumenta o gasto energético de camundongos reduzindo o ganho de peso corporal e a adiposidade de maneira independente da UCP1. Digno de nota, o enriquecimento dos TAG com HUFA pode estar relacionado com o aumento do gasto energético dos camundongos C57BL6/J alimentados com HFDN3. Acreditamos, em parte, que uma alta mobilização dos HUFA para a beta-oxidação possa estar acontecendo em paralelo com a ativação de vias alternativas de gasto energético. Os mecanismos responsáveis por estas ações serão investigados futuramente.

Palavras–chave: Óleo de peixe. Ácidos graxos N3. Balanço energético. Gasto energético. Obesidade. Tecido adiposo. Lipidômica.

ABSTRACT

SILVA, T.E.O. **Intake of hyperlipidic diet enriched with fish oil increases energy expenditure in an UCP1-independent manner.** Dissertation (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Introdution: We have previously shown that diet-induced obesity is prevented by expression of a desaturase from C. *elegans* in mice and elevation of body omega 3 (N3) fatty acids content. **Aim:** In the present study, we investigated the effects of a hyperlipidic diet enriched with fish oil on body weight, energy balance, adiposity, glucose homeostasis and inguinal and brown adipose tissues lipidomic profile of C57BL6/J wild type and uncoupling protein 1 knockout mice (UCP1 KO). **Materials and Methods:** Protocol **1**- C57BL6/J mice were fed during 8 weeks with normal diet (DN) containing 10% of lipids from soy oil and lard, normal N3 diet (DNN3) containing 10% of lipids from soy and fish oil, high fat diet (HFD) 60% of lipids from soy oil and lard and high fat diet (HFDN3) containing 60% of lipids from soy and fish oil and evaluated for body weight, energy efficiency, food intake, indirect calorimetry, adiposity, glucose and insulin tolerance and white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) oxygen consumption and lipidomic profile. Protocol **2**- Wild type (WT) and UCP1 KO mice were fed during 8 weeks with HFD and HFDN3 and evaluated for body weight, energy efficiency, food intake, indirect calorimetry, adiposity, glucose tolerance and tissue oxygen consumption. **Results:** Protocol **1**- No significant differences were observed in body weight, adiposity, food intake, oxygen consumption and glucose tolerance between mice fed with DN and DNN3. Mice fed with HFDN3, however, displayed reduced body weight gain, epididymal, inguinal and retroperitoneal adipose tissue masses, and energy efficiency when compared to mice fed with HFD. These effects occurred in the absence of significant alterations in food intake measured in grams and Kcal. Corroborating this decrease in energy efficiency, C57BL6/J mice fed with HFDN3 displayed increased oxygen consumption, but similar spontaneous locomotor activity when compared to mice fed with a HFD. We also show that oxygen consumption in WAT of mice fed with HFDN3 was higher than in mice fed with HFD. Finally, lipidomics analysis of both WAT and BAT revealed an enrichment of highly unsaturated fatty acids (HUFA, 4–6 double bonds) in triacylglycerol (TAG) in mice fed with HFDN3. Protocol 2- Intake of a HFDN3 protects both WT and UCP1 KO mice from body weight gain, increases energy expenditure, and improves glucose tolerance. **Conclusion:** Our results indicate that replacement of lard by fish oil in the hyperlipidic diet increases mice energy expenditure and protects from diet induced body weight gain and glucose intolerance independently of UCP1. Lipidomic analysis suggest that a higher mobilization of TAG-linked HUFA instead of saturated fatty acids for beta-oxidation and activation of alternative mechanisms of energy expenditure may explain in part the lean phenotype of mice fed with HFDN3.

Keywords: Fish oil. N3 fatty acids. Energy balance. Energy expenditure. Obesity. Adipose tissue. Lipidomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desacoplamento mitocondrial pela proteína desacopladora 1.....**19**

Figura 2. Ganho de peso corporal, ingestão alimentar e eficiência energética de camundongos controles (CTL) e *FAT-1* tratados com dietas normolipídica e hiperlipídica durante 8 semanas.....**22**

Figura 3. Análise do consumo de oxigênio, quociente respiratório e atividade locomotora de camundongos controles (CLT) e *FAT-1* tratados com dieta hiperlipídica durante 8 semanas.....**22**

Figura 4. Curva de peso corporal, ganho de peso corporal, eficiência energética, consumo total de ração em gramas, consumo total de ração em Kcal total durante 8 semanas e quantidade de Kcal nas fezes durante 48 horas de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3 .....**35**

Figura 5. Análise do consumo de oxigênio total ciclo claro e escuro, quociente respiratório ciclo claro e escuro e atividade locomotora ciclo claro e escuro durante 24 horas de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3 durante 7 semanas.....**36**

Figura 6. Massa em gramas dos tecidos adiposos epididimal, inguinal, retroperitoneal e marrom, fígado e músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3 durante 8 semanas.....**37**

Figura 7. Análises histológicas, distribuição dos adipócitos e média da área dos adipócitos do tecido adiposo inguinal (TAI) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3.....**38**

Figura 8. Teste de tolerância à glicose, área sob a curva, teste de tolerância à insulina, velocidade de decaimento da glicose, glicose plasmática de jejum, insulina plasmática de jejum, adiponectina plasmática de jejum de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3.....**39**

Figura 9. Consumo de oxigênio do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3.....**40**

Figura 10. Western blotting da proteína desacopladora 1 (UCP1) do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, DNN3 HFD e HFDN3.....**40**

Figura 11. Análise de componente principal e heatmap do tecido adiposo inguinal (TAI) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, HFD e HFDN3.....**41** e **42**

Figura 12. Análise de componente principal e heatmap do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, HFD e HFDN3.....**43**

Figura 13. Concentração de triacilglicerol (TAG) do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados durante 8 semanas com dietas DN, HFD e HFDN3.....**45**

Figura 14. Concentração de triacilglicerol(TAG) do tecido adiposo inguinal (TAI) (A) e do tecido adiposo marrom (TAM) (B) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas.....**46**

Figura 15. Razão entre os ácidos graxos N6 e N3 do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas.....**46**

Figura 16. Heatmap referente à composição de ácidos graxos das moléculas de TAG dos tecidos adiposos de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas.....**47**

Figura 17. Percentual de ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis (TAGs) do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas.....**48**

Figura 18. Western blotting do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos UCP1 WT e KO alimentados com dietas HFD e HFDN3 por 8 semanas.....**49**

Figura 19. Ganho de peso corporal, consumo total de ração em gramas, consumo total de ração em Kcal, eficiência energética e kcal nas fezes durante 48 horas de camundongos UCP1 WT e KO alimentados durante 8 semanas com dieta hiperlipídica **49**

Figura 20. Consumo de oxigênio total, atividade locomotora e quociente respiratório nos ciclos claro e escuro durante 24 horas de camundongos UCP1 WT e KO alimentados durante 5 semanas com dieta hiperlipídica.....**50 e 51**

Figura 21. Massa em gramas dos tecidos adiposos epididimal, inguinal, retroperitoneal e marrom, fígado e músculo gastrocnêmio de camundongos UCP1 WT e KO de camundongos UCP1 WT e KO alimentados durante 8 semanas com dieta hiperlipídica.....**52**

Figura 22. Teste de tolerância à glicose e área sob à curva de camundongos UCP1 WT e KO de camundongos UCP1 WT e KO alimentados durante 6 semanas com dieta hiperlipídica.....**53**

Figura 23. Consumo de oxigênio do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos UCP1 WT e KO de camundongos UCP1 WT e KO alimentados durante 8 semanas com dieta hiperlipídica.....**53**

Figura 24. Modelo hipotético baseado na mobilização seletiva de ácidos graxos HUFA provenientes dos TAG.....**80**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das dietas em gramas e densidade energética em Kcal.....**19**

Tabela 2- Composição de ácidos graxos das diferentes dietas (mg/g).....**20**

Tabela 3- Contribuição em porcentagem dos maiores grupos de lipídeos encontrados no lipidoma do tecido adiposo inguinal (TAI) e do tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 durante 8 semanas.....**35**

LISTA DE ABREVIATURAS

ÁCIDOS GRAXOS N3	ácidos graxos ômega 3
ÁCIDOS GRAXOS N6	ácidos graxos ômega 6
ALA	ácido graxo α-linolênico
ARA	ácido graxo araquidônico
ATGL	lipase de triacilglicerol dos adipócitos
ATP	trifosfato de adenosina
AUC	área sob a curva
BETA 3-AR	receptor adrenérgico beta 3
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
CIDEA	efetor do tipo DFFA que induz morte celular
CD36	proteína integral de membrana
CL	cardiolipina
CLT	controle
CPT1b	carnitina palmitoil transferase 1b
DHA	ácido graxo docosahexaenoico
DN	dieta normal com 10% de óleo de soja e banha de porco
DNN3	dieta normal com 10% de óleo de soja e óleo de peixe
DPA	ácido graxo docosapentaenóico
EL	esfingolipídeo
EPA	ácido graxo eicosapentanoico
FAT-1	camundongos que expressam a enzima *fat-1* dessaturase
GLUT-4	transportador de glicose do tipo 4
GPR40	receptor 40 acoplado a proteína G
GPR120	receptor 120 acoplado a proteína G
GTT	teste de tolerância a glicose
HFD	dieta hiperlipídica a base de banha de porco
HFDN3	dieta hiperlipídica a base de óleo de peixe
HSL	lipase hormônio sensível
HUFA	ácido graxo altamente insaturado

ITT	teste de tolerância à insulina
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
kITT	velocidade de decaimento da glicose
LA (N6)	ácido graxo linoleico da família ômega 6
LyzM-PPARγ^{KO}	camundongos que não expressam PPARγ em células mieloides
MUFA	ácido graxo monoinsaturado
PBS	tampão fosfato-salino
PC	fosfatidilcolina
PCA	análise de componentes principais
PE	fosfatidiletanolamina
PGC1-α	coativador 1α dos PPARs
PPARα	receptor ativado por proliferadores de peroxissomos α
PPARβ	receptor ativado por proliferadores de peroxixssomos β
PPARγ	receptor ativado por proliferadores de peroxissomos γ
PRDM16	proteína com o domínio homologo 16
PS	fosfatidilserina
PUFA	ácido graxo poliinsaturado
SERCAS 1 e 2	proteína transportadora de cálcio 1 e 2
SFA	ácido graxo saturado
SNS	sistema nervoso simpático
T_3	triiodotironina
TAB	tecido adiposo branco
TAG	triacilglicerol
TAI	tecido adiposo inguinal
TAM	tecido adiposo marrom
TNF-α	fator de necrose tumoral-α
TRPV1	receptores de potencial receptor transiente, vanilóide 1
UCP1	proteína desacopladora 1
UCP1 KO	animais que não expressam a proteína desacopladora 1

PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
EL	esfingolipídeo
CL	cardiolipina
PS	fosfatidilserina
SFA	ácido graxo saturado
$SLN^{-/-}$	camundongos que não expressam sarcolipina
MCP1	proteína quimioatraente de monócito 1
MUFA	ácido graxo monoinsaturado
PUFA	ácido graxo poli-insaturado (2-3 ligações duplas)
HUFA	ácido graxo poli-insaturado (4 ligações duplas ou mais)
pPE	ésteres de fosfatidiletanolamina
FFA	ácidos graxos livres
14:0	ácido graxo mirístico
16:0	ácido graxo palmítico
16:1	ácido graxo palmitoleico
18:0	ácido graxo esteárico
18:1	ácido graxo oleico
18:2	ácido graxo linoleico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 18
OBJETIVOS: 25
Geral 25
MATERIAL E MÉTODOS 26
Delineamento experimental 26
Protocolo 2 26
Animais e dietas 27
Cromatografia gasosa 30
Kcal diária nas fezes 30
Calorimetria indireta 30
Teste de tolerância à glicose, área sob a curva, teste de tolerância à insulina e taxa de decaimento da glicose (kITT) 31
Dosagens séricas 31
Consumo de O_2 tecidual 31
Western blot 31
Histologia 32
Lipidômica 32
Análise Estatística 34
RESULTADOS PROTOCOLO 1 35
RESULTADOS PROTOCOLO 2 49
DISCUSSÃO 54
CONCLUSÃO 63
REFERÊNCIAS 64
ANEXO 77

INTRODUÇÃO

O crescimento econômico, a industrialização e a urbanização promoveram diversas mudanças no estilo de vida da população como o aumento do consumo de dietas com alto conteúdo calórico, gorduras saturadas e o sedentarismo (MALIK; WILLETT; HU, 2013), que estão diretamente associados ao aumento da prevalência atual da obesidade no mundo (MOUSSAVI; GAVINO; RECEVEUR, 2008). Estudos epidemiológicos destacam que a obesidade e o sobrepeso, são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e certos tipos de câncer (FINUCANE et al., 2011; MUNRO & GARG, 2013). Os mecanismos pelos quais o excesso de peso corporal está relacionado com a maior incidência destas doenças ainda não foram completamente elucidados, embora evidências indiquem que a inflamação crônica de baixa intensidade, um fenótipo frequentemente associado com a obesidade, possa ter um papel importante (CASAZZA et al., 2013)

Dados recentes sugerem que dietas ricas em ácidos graxos saturados promovem inflamação hipotalâmica caracterizada pelo aumento da produção local de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF)-α e a interleucina (IL)-1β. Como consequência, este processo inflamatório hipotalâmico pode resultar em resistência as ações anorexigênicas e termogênicas de importantes hormônios como leptina e insulina (BLOUET et al., 2009; DE SOUZA et al., 2005; JO et al., 2009; MARTÍNEZ DE MORENTIN et al., 2010; MILANSKI et al., 2009; MORTON & SCHWARTZ, 2006; TAKEDA & AKIRA, 2005), prejudicando assim a homeostase energética, ou seja, o equilíbrio entre a quantidade de calorias ingeridas/absorvidas e o gasto de energia, que a longo prazo determina o peso corporal (OLIVEIRA et al., 2015; SCHWARTZ et al., 2000; SILVA, V. R. R. et al., 2014; WILLIAMS & ELMQUIST, 2012).

O gasto energético total é composto por pelo menos três componentes: **1**- a taxa metabólica basal de repouso que representa a energia gasta na manutenção da homeostase, homeotermia, gradiente iônico, atividade cardiorrespiratória, entre outras; **2**- o efeito térmico dos alimentos que representa a energia gasta para digerir, absorver e estocar os nutrientes; e **3**- gasto energético associado a realização de trabalho e/ou atividade física. A contribuição de cada um destes componentes para o gasto energético total foi estimada em torno de 60%, 10% e 30%, respectivamente (SUMITHRAN & PROIETTO, 2013).

Uma das estratégias que tem sido investigada como alternativa para conter o crescimento exponencial da obesidade é o aumento do gasto energético pela ativação do processo de termogênese independente do tremor muscular. Mamíferos, inclusive humanos

adultos, possuem o tecido adiposo marrom (TAM), um tecido especializado que expressa uma proteína mitocondrial denominada proteína desacopladora 1 (UCP1), que quando ativada, libera energia proveniente da oxidação de substratos metabólicos como ácidos graxos e glicose na forma de calor. Especificamente, a ativação da UCP1 localizada na membrana mitocondrial interna dos adipócitos marrons por ácidos graxos oriundos da lipólise dos estoques intracelulares de triacilglicerol (TAG), desacopla o gradiente de prótons mitocondrial da síntese de ATP, dissipando energia na forma de calor (**Figura 1**).

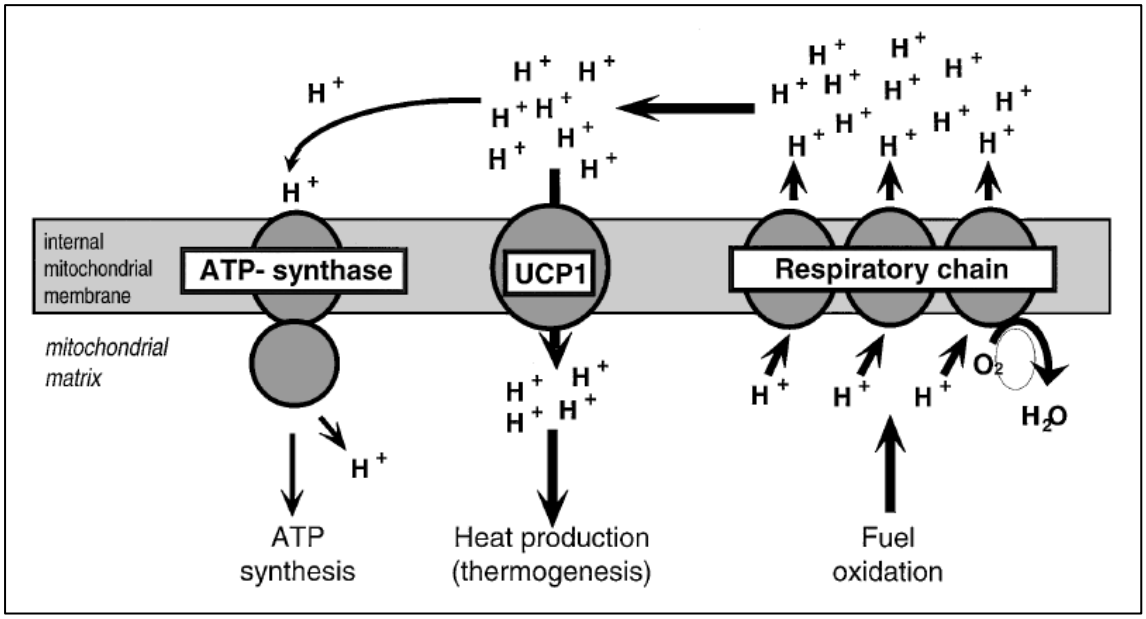


Figura 1. Mecanismo de produção de calopela proteína UCP1. Adaptado de Palou et al., 2004.

Além do maior número de mitocôndrias, o TAM é caracterizado por um padrão multilocular de distribuição das gotículas lipídicas, característica que o diferencia do tecido adiposo branco (TAB), que apresenta baixa quantidade de mitocôndrias e UCP1, alta capacidade de estoque energético na forma de triacilglicerol (TAG) e importante função endócrina pela síntese e secreção de várias adipocinas (PEIRCE; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2014; SAELY; GEIGER; DREXEL, 2011). De forma interessante, na década de 80 descobriu-se que roedores expostos ao frio ou tratados com agonistas beta-adrenérgico ou do receptor de ativação da proliferação peroxissomal gama (PPARγ) apresentam aumento na expressão de UCP1 em alguns adipócitos brancos. Na época, foi sugerido que adipócitos marrons infiltrados poderiam ser responsáveis pela expressão de UCP1 no TAB. Entretanto, recentemente foi identificado e caracterizado em roedores e humanos um terceiro tipo de adipócito denominado de “bege” que apresenta características mistas de adipócitos brancos e marrons, dependendo do estímulo vigente. Por exemplo, durante ingestão de dieta hiperlipídica, os adipócitos beges

apresentam fenótipo clássico de adipócitos branco, caracterizado por gota unilocular de lipídeos e reduzido número de mitocôndrias. Em contraste, estímulo beta-adrenérgico promove biogênese mitocondrial, expressão de UCP1 e termogênese nos adipócitos beges, um fenômeno conhecido como *browning* (ISHIBASHI; SEALE, 2010; PETROVIC et al., 2010).

Estudos recentes utilizando tomografia por emissão de pósitrons demonstraram que humanos adultos também possuem quantidades relevantes de TAM com alta atividade metabólica, contudo, em regiões diferentes daquelas encontradas em roedores. Foi sugerido nestes estudos que humanos saudáveis possuem aproximadamente 50g de TAM, que quando estimulado pode aumentar em cerca de 20% o gasto energético diário (CYPESS MD, PHD, MMSC et al., 2009; HARMS; SEALE, 2013; NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007; ROTHWELL; STOCK, 1983; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009). Além disso, estudos demonstram uma importante contribuição do TAM na homeostase glicêmica e lipídica. Orava et al., 2011 observaram que adipócitos marrons de humanos apresentam maior captação de glicose comparados ao músculo esquelético quando estimulados pelo frio. A importância desse tecido no metabolismo dos lipídeos também é evidenciada. Durante exposição ao frio, o TAM, tanto de roedores quanto de humanos, aumenta a captação e a oxidação dos ácidos graxos. Esses efeitos são associados com redução da concentração plasmática de TAG (BARTELT et al., 2011; CANNON; NEDERGAARD, 2004; CYPESS MD, PHD, MMSC et al., 2009). Além disso, foi observado que a administração de agonistas beta-adrenérgicos promove *browning* em adipócitos beges de humanos. Esse efeito está associado à aquisição do padrão de deposição de lipídeos multilocular, aumento no conteúdo da UCP1, na densidade mitocondrial e na capacidade respiratória mitocondrial desses adipócitos(SIDOSSIS et al., 2015).

O sistema nervoso simpático (SNS) é um importante regulador do TAM, pois controla tanto a termogênese pela ativação da lipólise, quanto também a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos marrons em adipócitos marrons maduros, o conteúdo de mitocôndrias e UCP1 e assim a massa e a capacidade termogênica deste tecido (CANNON; NEDERGAARD, 2004). O SNS também participa ativamente no recrutamento e ativação do processo de termogênese em adipócitos beges. O controle simpático destes processos se dá pela liberação de noradrenalina pela inervação tecidual que exerce suas ações via ativação de receptores beta-3 adrenérgicos nos adipócitos marrons e beges. Além do SNS, o hormônio tireoidiano T_3 (triiodotironina), produzido localmente pela enzima deiodinase do tipo 2, é um importante regulador da responsividade simpática, do conteúdo de UCP1 e da atividade termogênica do TAM (KAPTEIN; BEALE; CHAN, 2009; LEE et al., 2012). É importante ressaltar que além

da termogênese independente do tremor muscular do TAM e adipócitos beges catalisada pela UCP1, os hormônios tireoidianos aumentam também a taxa metabólica basal e assim o gasto energético estimulando: **1-** a atividade da bomba Na^+/K^+-ATPase, que consome ATP para manter o gradiente iônico celular de Na^+ e K^+ através do transporte deste íons contra seus gradientes de concentração (SILVA, 2006); **2-** a atividade de proteínas conhecidas como SERCAs 1 e 2 (Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Ca^{++} dependent ATPase) que transportam, contra seu gradiente de concentração, íons Ca^{++} do citoplasma para o retículo sarcoplasmático, processo este dependente da hidrólise de ATP (LOPEZ, 2013; SIMONIDES et al., 2001) e **3-** ciclos fúteis que consistem na ativação simultânea de processos antagônicos como a síntese e a hidrólise de TAG, a glicólise/gliconeogênese, síntese e degradação proteica, entre outros (UKROPEC et al., 2006). A contribuição efetiva dos processos acima mencionados na determinação do gasto energético ainda não foi totalmente estabelecida.

Como já mencionado, ao longo da evolução humana, ocorreram mudanças importantes no padrão nutricional da população que podem estar associadas a maior prevalência da obesidade. Uma destas mudanças está relacionada com a maior ingestão de ácidos graxos saturados e ácidos graxos do tipo ômega 6 (N6) e menor ingestão de ácidos graxos do tipo ômega 3 (N3), uma importante classe de ácidos graxos essenciais composta basicamente pelos ácidos α-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (CALDER, 2012; EATON; KONNER, 1985). Essa mudança no perfil de ácidos graxos da dieta, está diretamente relacionado à saúde metabólica, uma vez que a ingestão de ácidos graxos N3 está associada à melhora na tolerância à glicose e na homeostase lipídica (CALDER, 2012; SIMOPOULOS, 2016).

Neste sentido, estudos recentes do nosso laboratório encontraram que o aumento do conteúdo corporal de ácidos graxos N3 pela ingestão de dieta rica em óleo de peixe (não mostrado) ou pelo aumento da produção endógena estimulada pela expressão da enzima *FAT-1*, uma *dessaturase* naturalmente encontrada em *C. elegans* que converte N6 em N3 (**Figura 2**), protege camundongos do ganho de peso e obesidade induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica (BELCHIOR et al., 2015). Interessantemente, estas ações dos ácidos graxos N3 ocorreram na ausência de alterações significativas na ingestão alimentar, indicando um provável aumento do gasto energético como mecanismo responsável **(Figura 2).**

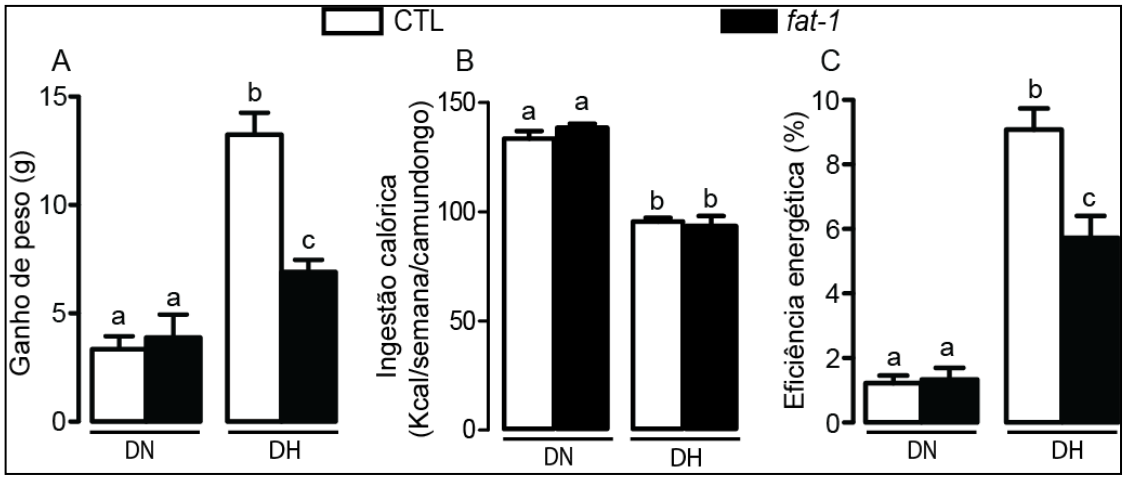


Figura 2. Ganho de peso (A), ingestão calórica (B) e eficiência energética (C) de camundongos do grupo Controle (CTL) e *FAT-1* tratados com dieta normal (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média ± SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Corroborando o menor ganho de peso corporal e a menor eficiência energética, camundongos *FAT-1* tratados com dieta hiperlipídica apresentaram maior gasto energético evidenciado pelo maior consumo de oxigênio tanto no período claro como no período escuro quando comparado ao grupo controle **(Figura 3).** Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos N3 promovem aumento do gasto energético não foram completamente elucidados.

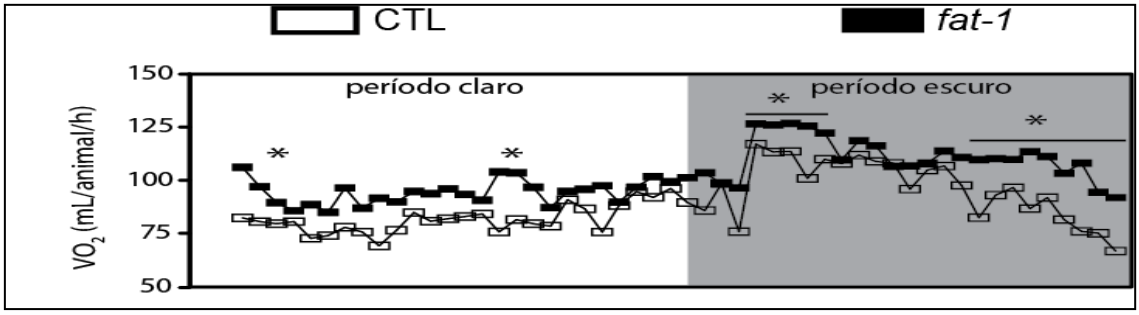


Figura 3. Consumo de oxigênio de camundongos do grupo controle (CTL) e *FAT-1* tratados com dieta hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média (n= 4 camundongos/grupo). Diferenças estatísticas foram assinaladas com * (p<0,05).

No final da década de 90, um estudo observou que o aumento da ingestão de ácidos graxos N3 promoveu um aumento do número de mitocôndrias, mas não alterou o conteúdo de UCP1 em ratos (OUDART et al., 1997). Mais recentemente, Kim et al., (2015) observaram que os ácidos graxos N3 promovem aumento no gasto energético de camundongos através da ativação de receptores localizados no trato gastrointestinal denominados de *Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Channel* (TRPV-1). Esses receptores transmitem sinal via nervo vago para o sistema nervoso central promovendo ativação simpática para o TAM e um

consequente aumento da termogênese. Segundo os autores supracitados, a ingestão de dieta rica em ácidos graxos N3 promove aumento do conteúdo de UCP1 no TAM e tecido adiposo inguinal (TAI, browning), da temperatura corporal, do consumo de oxigênio e do *turnover* de noradrenalina.

Corroborando os dados obtidos no nosso laboratório, estudos de BARGUT et al., (2016) encontraram que camundongos alimentados com dieta rica em N3 apresentam reduzido ganho de peso corporal e aumento no gasto energético. Esses efeitos foram associados à redução da massa do tecido adiposo, aumento no conteúdo proteico de PGC-1α, PPARα, PPARβ, PPARγ, GLUT-4, UCP1 e nos níveis de mRNA do receptor beta-3 adrenérgico, CD36 e CPT1b no TAM. Nesse sentido, estudos *in vitro* encontraram que o tratamento de adipócitos obtidos de humanos com sobrepeso com ácidos graxos N3 reduziu a lipogênese *de novo*, a expressão de enzimas envolvidas na reesterificação dos ácidos graxos, e promoveu aumento no conteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo, na biogênese mitocondrial e na expressão gênica de marcadores termogênicos como UCP1, PRDM16 e CIDEA (LAIGLESIA et al., 2016).

Apesar das evidências apresentadas acima sugerindo que os ácidos graxos N3 aumentam o gasto energético em roedores, ainda não está claro se estas ações envolvem um possível aumento da termogênese independente do termo muscular catalisada pelo TAM e adipócitos beges. Neste sentido, o uso de camundongos geneticamente modificados com deleção da UCP1 (UCP1 KO) poderá permitir a melhor compreensão do processo de termogênese independente do tremor muscular para o gasto energético após tratamento com ácidos graxos N3. Já foi demonstrado, por exemplo, que camundongos UCP1 KO alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica desenvolvem obesidade quando mantidos em termoneutralidade (30ºC), corroborando a importância da termogênese independente do tremor muscular induzida pela dieta na manutenção do peso corporal (FELDMANN et al., 2009). Foi demonstrado também que animais UCP1 KO se adaptam a reduções graduais de temperatura e sobrevivem ao frio crônico (4°C) indicando a existência de outros processos de produção de calor independentes da UCP1. Neste sentido, foi encontrado no TAI destes animais um aumento do consumo de oxigênio, da expressão gênica da desiodase tipo 2, SERCA2a, glicerol 3-fosfato desidrogenase mitocondrial, PGC1-α, CoxII, DNA mitocondrial e no conteúdo proteico do fosfolambam (componente regulatório da atividade das SERCAs). Essas respostas poderiam contribuir para o aumento do gasto de energia e com a produção de calor necessária para a sobrevivência destes animais quando submetidos ao frio (UKROPEC et al., 2006). A melhor compreensão dos mecanismos existentes de produção de calor em mamíferos pode auxiliar no desenvolvimento

de estratégias para o aumento do gasto energético almejando a prevenção/tratamento da obesidade.

Um outro aspecto pouco explorado até o momento em roedores submetidos às diferentes dietas hiperlipídicas é a caracterização detalhada das alterações de composição lipídica do TAI e do TAM frente a estas dietas. Considerando-se especificamente o tecido adiposo, existe um pequeno número de publicações que realizaram uma análise detalhada do lipidoma destes tecidos. Dentre estes estudos destacam-se os estudos de Hoene et al., (2014) reportando o perfil lipídico do TAI e TAM em camundongos macho e fêmea, e de May et al., 2017 em camundongos submetidos ao esforço físico. Os resultados destes trabalhos demonstraram importantes diferenças entre os adipócitos branco e marrom principalmente em relação aos níveis de TAG e fosfolipídeos, respectivamente. Este tipo de caracterização é de suma importância para o tecido adiposo, tendo em vista que a incorporação celular de ácidos graxos provenientes da dieta pode influenciar tanto a composição de fosfolipídeos de membrana como a de TAG. Por exemplo, a maior geração de mediadores anti-inflamatórios nos tecidos adiposos durante a ingestão de dieta rica em ácidos graxos N3, e a consequente melhora na tolerância à glicose e na homeostase lipídica, parecem estar associadas à incorporação preferencial desses ácidos graxos nos fosfolipídeos de membrana (CALDER, 2012; FLACHS et al., 2006). Além dos fosfolipídeos de membrana, a hidrólise dos estoques intracelulares de TAG pode ser considerada uma importante via de geração de ácidos graxos que servem como precursores para a formação destes mediadores (DICHLBERGER et al., 2014).

OBJETIVOS:

Geral

O objetivo geral do nosso estudo é investigar os efeitos da ingestão de dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe no peso corporal, balanço energético, adiposidade, homeostase da glicose e composição lipídica (lipidôma) dos tecidos adiposos inguinal (TAI) e marrom (TAM) de camundongos C57BL6/J selvagens e deficientes para a proteína desacopladora 1 (UCP1 KO).

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Para responder ao objetivo proposto, dois protocolos experimentais foram realizados:

Protocolo 1.

Camundongos C57BL6/J com 8 semanas de idade foram alimentados por 8 semanas com dieta normolipídica contendo 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco (DN), dieta normolipídica contendo 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe (DNN3), dieta hiperlipídica contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco (HFD) e dieta hiperlipídica contendo 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe (HFDN3) por 8 semanas foram avaliados para:

- ✓ Peso corporal, ingestão alimentar, eficiência energética, conteúdo calórico das fezes, gasto energético total, quociente respiratório, atividade locomotora espontânea e adiposidade.
- ✓ Consumo de oxigênio do TAI e TAM.
- ✓ Metabolismo da glicose: teste de tolerância à glicose e insulina.
- ✓ Concentrações séricas de glicose, insulina, adiponectina.
- ✓ Análise lipidômica do TAI e TAM.
- ✓ Conteúdo da proteína UCP1 do TAM.

Protocolo 2

No segundo protocolo, camundongos WT e UCP1 KO com 8 semanas de idade foram alimentados com dieta HFD e HFDN3 por 8 semanas foram avaliados para:

- ✓ Peso corporal, ingestão alimentar, eficiência energética, quilocaloria nas fezes, gasto energético total, quociente respiratório, atividade locomotora espontânea e adiposidade.
- ✓ Metabolismo da glicose: teste de tolerância à glicose.
- ✓ Consumo de oxigênio do TAM e fígado.

Animais e dietas

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (CEUA-ICB Protocolo 115/2016). Todos os camundongos utilizados possuíam *background* C57BL6/J e foram mantidos à 23 ± 2°C em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (ciclo claro com início às 07h00) com acesso *ad libitum* para água e as dietas semi-purificadas detalhadas abaixo. Camundongos selvagens e deficientes para UCP1 (B6.129-$Ucp1^{tm1Kz}$/J) foram comprados da empresa Jackson Laboratories (Maine, USA) e mantidos em colônia como casais de heterozigotos. Camundongos irmãos selvagens (WT) e deficientes em UCP-1 (KO) foram utilizados nos experimentos. As dietas utilizadas foram:

1- Dieta Normolipídica (DN), contendo 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco;

2- Dieta Normolipídica N3 (DNN3) contendo 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe;

3- Dieta Hiperlipídica (HFD), contendo 20% de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e banha de porco

4- Dieta Hiperlipídica N3 (HFDN3), contendo 20% de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos oriundos do óleo de soja e óleo de peixe.

A composição e o perfil de ácidos graxos das dietas estão detalhados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. O peso corporal e a ingestão alimentar foram avaliados semanalmente. A eficiência energética foi calculada como o ganho de peso corporal dividido pela ingestão alimentar em Kcal multiplicada por 100. Após 8 semanas, animais anestesiados com isofluorano sofreram eutanásia por deslocamento cervical após 8 horas de jejum com acesso livre à água. Em seguida, amostras de sangue foram obtidas a partir da veia jugular e os tecidos adiposo marrom interescapular, epididimal, inguinal, o retroperitoneal, fígado e baço foram coleados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80ºC para análises posteriores.

Tabela 1- Composição das dietas em gramas e valor energético em Kcal.

Ingredientes	**DN**	**DNN3**	**HFD**	**HFDN3**
Amido de Milho	416,05	416,05	0	0
Caseína	190,95	190,95	258,45	258,45
Maltodextrina	162,6	162,6	161,5	161,5
Sacarose	89,55	89,55	88,9	88,9
Óleo de Soja	23,85	23,85	32,3	32,3
Banha de Porco	19,1	0	316,6	0
Óleo de Peixe	0	19,1	0	316,6
Mix Mineral	35,35	35,35	47,95	47,95
Mix Vitamina	10,075	10,075	14,75	14,75
L-cistina	2,85	2,85	3,875	3,875
Colina	1,9	1,9	2,6	2,6
Total (g)	1000	1000	1000	1000
Kcal	3836	3836	5231	5231
Carboidratos	70	70	20	20
Proteínas	20	20	20	20
Lipídeos	10	10	60	60
Total (%)	Kcal	Kcal	Kcal	Kcal

Belchior et al., 2015

Tabela 2- Composição de ácidos graxos das diferentes dietas (mg/g)

Ácidos graxos	**TIPOS DE DIETA**			
	DN	**DNN3**	**HFD**	**HFDN3**
C14:0	nd	2	4	23
C14:1	nd	nd	nd	nd
C16:0	5	13	73	60
C16:1	nd	3	6	27
C17:1	nd	nd	nd	1
C18:0	2	4	37	12
C18:1	10	17	128	38
C18:2n-6	11	24	65	21
C18:3n-3	1	3	4	4
C20:0	nd	0,4	1	1
C20:1n-9	nd	0,7	3	4
C20:2n-6	nd	0,1	2	1
C20:3n-6	nd	0,1	nd	1
C20:4n-6	nd	0,4	nd	3
C20:5n-3	nd	5	nd	47
C22:0	nd	nd	nd	1
C22:1n-9	nd	nd	nd	2
C22:6n-3	nd	3	nd	29
C24:1	nd	nd	nd	nd
Somatório Saturados	7 **(23,72%)**	19,4 **(26%)**	120,6 **(36%)**	106,3 **(36%)**
Somatório Monoinsaturados	10,7 **(36,27%)**	20,7 **(27%)**	143,4 **(43%)**	82,1 **(28%)**
Somatório Poli-insaturados N6	10,8 **(36,6%)**	24,6 **(32%)**	66,7 **(20%)**	25,3 **(9%)**
Somatório Poli-insaturados N3	1 **(3,3%)**	11 **(15%)**	3,8 **(1%)**	80,6 **(27%)**
Razão N6/N3	10,8	2,2	17,5	0,3
SOMATÓRIO	35	76	334	294

Cromatografia gasosa

Aproximadamente 10 mg das diferentes rações foram analisadas para o perfil de ácidos graxos por reação de transesterificação para CG/FAME como previamente descrito (DEROGIS et al., 2013). Brevemente, lipídeos das dietas foram extraídos com clorofórmio:metanol (2:1). Posteriormente a fração clorofórmio foi misturada com metanol (1,76 mL), ácido margárico 1 mg/mL (50 µL), cloreto de acetila (100 µL) e aquecido a 100ºC por 60 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado hexano (1,5 mL) e os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 1500 x g por 2 minutos a 4ºC. A fase orgânica superior foi coletada e evaporada sob nitrogênio líquido e o resíduo foi dissolvido em 40 uL de hexano. 1 µL das amostras foi injetado individualmente em um cromatógrafo a gás (Trace 1310 – Thermo Scientific) com detector de ionização em chama, usando uma coluna capilar (DB-FFAP, 15 m × 0.1 mm id × 0.1 um, Agilent Technologies). Éster metílico de ácidos graxos (FAME) foi identificado pela comparação direta com *FAME standard mix* (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich), individualmente os picos foram integrados e normalizados pelo padrão interno. A porcentagem de FAME individual foi calculada em relação à área total dos picos.

Kcal diária nas fezes

A quantidade de calorias das fezes foi avaliada por combustão em bomba calorimétrica, composta de um cilindro de combustão onde as amostras foram pressurizadas com gás O_2 e queimadas por corrente elétrica induzida por ignição através do contato com um fio de ferro de aproximadamente 10cm de comprimento. O calor liberado pela combustão da amostra é medido pela variação de temperatura da água por termômetro de alta precisão durante 10 minutos e apresentado em Kcal por grama de fezes.

Calorimetria indireta

Camundongos foram mantidos por 2 dias em gaiolas metabólicas, sendo o primeiro dia para aclimatação e o segundo dia para a medida de consumo de oxigênio (VO_2), produção de gás carbônico (CO_2) e atividade locomotora espontânea durante 24 h pelo aparelho *Comprehensive Laboratory Monitoring System* (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), um calorímetro de circuito aberto integrado e equipado com um sistema de monitoramento de atividade por feixes ópticos. A contagem da atividade locomotora espontânea foi calculada somando a quantidade de feixes atingidos nos eixos x, y e z. O quociente respiratório foi calculado através da razão VO_2/CO_2.

Teste de tolerância à glicose, área sob a curva, teste de tolerância à insulina e taxa de decaimento da glicose (kITT)

Na quinta semana de experimento, camundongos privados de alimentos por 6 horas com acesso livre à água foram avaliados para a glicemia basal (tempo 0). Posteriormente, uma solução de glicose (1g/ kg de peso) foi injetada intraperitonealmente e a glicemia foi medida aos 15, 30, 45 e 90 minutos após injeção com glicosímetro (One Touch Johnson & Johnson). A AUC foi calculada utilizando todos os tempos do teste. Na sexta semana de experimento, foi realizado o teste de tolerância à insulina. Para isto, camundongos privados de alimentos por 6 horas com acesso livre à água, foram avaliados para a glicemia basal (tempo 0). Posteriormente, uma solução de insulina (0,5 U/ kg de peso corporal) foi injetado intraperitonealmente e a glicemia foi medida aos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após injeção com glicosímetro (One Touch Johnson & Johnson). A taxa de decaimento da glicose foi calculada através do *slope* da curva de glicemia de 5 a 30 minutos dividido pela glicemia no tempo 5'.

Dosagens séricas

Após eutanásia, o sangue foi obtido através da veia jugular, centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida o soro foi coletado e armazenado a -80°C para as dosagens da glicose, por ensaio colorimétrico segundo protocolo do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As dosagens de adiponectina e insulina séricas foram realizadas por ELISA específico para camundongo seguindo as recomendações do fabricante (Millipore, Billerica, MA, USA).

Consumo de O_2 tecidual

O tecido adiposo marrom e inguinal pesando 15 a 30 mg, respectivamente, foram incubados em DMEM, contendo 4% BSA a 37ºC durante 10 minutos. A medida do consumo de O_2 foi feito em equipamento de respirometria de alta resolução (Oxygraph-2K). O consumo de oxigênio foi calculado pelo *slope* do decaimento da concentração de oxigênio no meio e expressos em nmol/min/mg.

Western blot

Apenas o TAM foi utilizado para essa análise. O TAM foi homogenizado em em tampão (50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1,5 mM NaVO4, 50 mM NaF, 10 mM NaPirofosfato, 10 mM Beta-glicerofosfato de sódio, 1% Triton 100X e inibidores de protease) e posteriormente centrifugado a 13.000 rpm durante 15 em temperatura de 4°C. Em seguida, as proteínas extraídas foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA *Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas contendo 50 µg/µl de proteínas foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos

em banho seco. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis NuPAGE® Bis-Tris 4-12% (Invitrogen) durante 90 minutos. Logo após, foi realizada a eletrotransferência das proteínas do gel durante 180 minutos para as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ativada em metanol. Ao término, as membranas foram coradas com *ponceau*, lavadas 3 vezes (15minutos/lavagem) com TBS-T1x. Em seguida, as membranas foram cortadas em locais específicas de acordo com as proteínas alvo. O bloqueio da membrana durou 75minutos e foi feito em leite 5% livre de gorduras diluído em TBS-T1x. As membranas forma incubadas *overnight* nos anticorpos primários AKT (#9685s), UCP1 (#14670) diluídos 1:1000 ou BSA 5%. Após essa incubação, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T 3x/5minutos. Após a lavagem, as membranas foram colocadas em contato com o anticorpo secundário diluído 1:5000 em leite 5% livre de gordura. Essa incubação durou 60 minutos. Ao final, as membranas foram lavadas 3x/15minutos em TBS-T1x. As proteínas foram reveladas por quimiluminescência utilizando um kit *ECL Western blotting Enhanced Chemiluminescence* (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido*). As densitometrias das bandas foram obtidas através do software *Image J*. Os valores da proteína UCP1 foram divididos pelos valores da proteína AKT para se obter a normalização. Em seguida, uma média foi feita com os resultados normalizados do grupo controle com o objetivo de se obter o número 1. Essa média foi utilizada como fator de correção para o cálculo das amostras de todos os grupos restantes. Os valores são expressos com Unidades Arbitrárias (U.A).

Histologia

Fragmentos de tecido adiposo branco inguinal foram fixados em paraformaldeído 4%, embebidos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Foram realizados 3 cortes de 5 µm por amostra. De cada corte, foram adquiridos 3 campos aleatórios (20x) no microscópio Zeiss Axio Vert. A1 usando o programa Zen 2 Lite. Quantificamos a área individual dos adipócitos de cada campo aleatório utilizando o modo automático do software ADIPOSOFT 1.13 baseado no software Image J 1.50i (GALARRAGA et al., 2012). Os dados estão expressos em pixels. Os adipócitos foram distribuídos em classes de acordo com sua área total.

Lipidômica

Primeiramente, o homogenato com os tecidos adiposos branco (TAI) e marrom (TAM) foram preparados na concentração final de 50 mg/mL com tampão PBS. Posteriormente, uma mistura de padrões internos de lipídeos foi adicionada às amostras para semi-quantificação de espécies moleculares de lipídios relatadas. A mistura contendo padrões internos (1000 ng para cada padrão) foi composta de ceramida (d18:1/17:0), esfingomielina (d18:1/17:0), cardiolipina (14:0x4), fosfatidilcolina (17:0/17:0), fosfatidiletanolamina (17:0/17:0), fosfatidilserina

(17:0/17:0) e fosfatidilglicerol (17:0/17:0), liso-PC (17:0) e liso-PE (17:1), e triacilglicerol (17:0x3). A extração lipídica foi realizada de acordo com o método estabelecido por Matyash *et al*. (2008). Resumidamente, os homogenatos do TAI e TAM foram ressuspendidos em 600 µL de tampão de fosfato 10 mM (pH 7,4) contendo mesilato de deferoxamina 100 µM. Em seguida, 100 µL deste homogenato foram misturados com 200 µL de metanol gelado e 100 µL da mistura contendo os padrões internos (10 - 20 ng/µL). Após agitação durante 30 segundos, adicionou-se 1 ml de éter metil-terc-butílico (MTBE) à mistura, que permaneceu sob agitação (1000 rpm) à 20 °C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 300 µL de água ultrapura à mistura seguido de homogeneização durante 30s e descansando em gelo durante 10 minutos. Após centrifugação à 1500g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante (fase orgânica) contendo o extrato lipídico total foi transferido para um novo tubo e seco com gás N_2. Os extratos lipídicos totais secos foram ressuspendidos em 200 µL isopropanol e o volume de injeção foi de 1 µL (representando 1% de 100 mg de tecido/mL). Os extratos lipídicos totais foram analisados por ESI-TOF-MS (Triple TOF 6600, Sciex, Concord, EUA) acoplados a um cromatrógrafo líquido de alto desempenho (UHPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras foram carregadas em coluna CORTECS® (UPLC® C18, 1,6 µm, 2.1 mm i.d. x 100 mm) sob fluxo de 0,2 mL/min e a temperatura mantida à 35 °C. A fase móvel A consistiu em água/acetonitrila (60:40), enquanto a fase móvel B foi composta de isopropanol/acetonitrila/água (88:10:2). As fases móveis A e B continham acetato de amônio ou ácido fórmico (a uma concentração final de 10 mM) para experimentos realizados em modo de ionização negativo ou positivo, respectivamente. O gradiente linear durante a corrida cromatográfica foi o seguinte: de 40 a 100% B durante os primeiros 10 minutos. Manteve-se em 100% B de 10 a 12 minutos, diminuindo de 100 para 40% de B durante 12-13 minutos, e mantido a 40% B de 13-20 minutos. O espectrômetro de massas foi operado em modos de ionização positiva e negativa, e a faixa de varredura ajustada em uma relação massa-carga de 200 à 2000 Da. Os dados para a identificação e quantificação das espécies moleculares de lipídios foram obtidos pela aquisição de informações dependentes (IDA®). A aquisição de dados foi realizada com ciclo de tempo de 1,05 segundos e tempo de aquisição de 100 ms para a varredura MS1 e tempo de aquisição de 25 ms para obter os 36 íons precursores mais abundantes. A aquisição de dados foi realizada usando o Analyst® 1.7.1. Os dados MS/MS foram analisados com PeakView®, e as espécies moleculares de lipídios foram identificadas por inspeção visual baseada na massa dos compostos e seus respectivos fragmentos com a utilização de buscador desenvolvido em Excel direcionado pelo Lipid Maps (link:http://www.lipidmaps.org). A quantificação lipídica foi

realizada com o MultiQuant®, onde as áreas de pico dos íons precursores foram normalizadas pelos padrões internos.

Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por analise de variância de 2 vias (ANOVA Two-Way), acompanhada pelo pós teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa Prisma 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) e as diferenças estatísticas são representadas pelo valor de P menor que 0,05 ($p<0,05$). Os resultados da análise lipidômica foram inseridos no programa *MetaboAnalyst* (http://www.metaboanalyst.ca). As concentrações dos lipídeos foram imputadas como razão área (a razão entre a área de pico do composto e seu correspondente padrão interno), e transformadas em logaritmo na base 10. Após esta etapa, realizou-se a análise de componentes principais (PCA), na qual considerou-se os componentes principais 1 e 2 (PC-1 e PC-2) para construção da matrix 2-D com a distribuição espacial das amostras. Os mesmos dados foram submetidos à análise (ANOVA One-Way) seguida pelo pós teste de Tukey. As espécies individuais de lipídeos que apresentaram alterações significativas ($p<0,05$) foram então usadas para construir o heatmap, contendo os clusters de amostras e compostos. Todos os procedimentos realizados dentro da plataforma *MetaboAnalyst* seguiram a publicação original de Xia & Wishart (2006).

RESULTADOS PROTOCOLO 1

Como observado na Figura 4, não houve alterações significativas no ganho de peso corporal, eficiência energética, consumo de ração e quantidade de Kcal nas fezes entre camundongos alimentados com dietas DN e DNN3. Contudo, como esperado, o consumo da dieta HFD aumentou o ganho de peso corporal e a eficiência energética, sem alterar significativamente o consumo de ração em kcal e conteúdo calórico das fezes, embora uma redução na ingestão alimentar em gramas foi encontrada em comparação as dietas DN e DNN3. Por fim, apesar de similar a dieta HFD em porcentagem de gordura, a ingestão de dieta HFDN3 reduziu o ganho de peso corporal e a eficiência energética, sem promover alterações significativas no consumo de ração em gramas em comparação a dieta HFD e em Kcal, e na quantidade de Kcal nas fezes em comparação as dietas DN, DNN3 e HFD. Resumidamente, a ingestão de dieta rica em óleo de peixe (HFDN3) protegeu camundongos contra o ganho de peso corporal por um mecanismo que envolve menor eficiência energética.

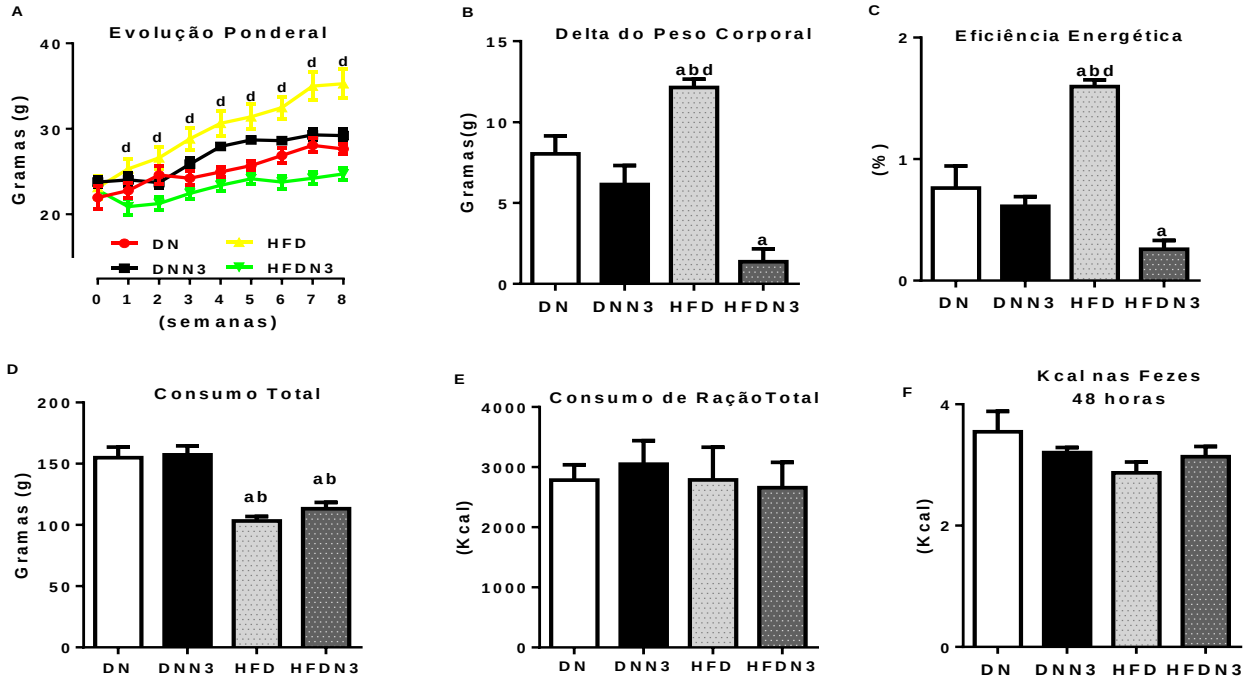


Figura 4. Evolução do peso corporal (A), delta do peso corporal (B), eficiência energética (C), ingestão alimentar em gramas (D), ingestão alimentar em Kcal (E) e calorias nas fezes (F), de camundongos C57BL6/J alimentados por 8 semanas com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-7 camundongos/grupo).

Corroborando os dados de peso corporal, observamos na Figura 5 a ausência de diferenças significativas no gasto energético (avaliado pelo consumo de oxigênio), atividade locomotora e quociente respiratório entre camundongos alimentados com as dietas DN e DNN3 em ambos os ciclos. No entanto, um maior gasto energético tanto no ciclo claro quanto no escuro foi observado no grupo HFDN3 em comparação ao HFD, confirmando os resultados do menor ganho de peso corporal e eficiência energética demonstrados anteriormente. De forma importante, esses efeitos aconteceram na ausência de alterações significativas na atividade locomotora e quociente respiratório em ambos os períodos. Em conjunto, esses dados indicam que o perfil dos ácidos graxos na dieta é um importante determinante do equilíbrio energético de camundongos.

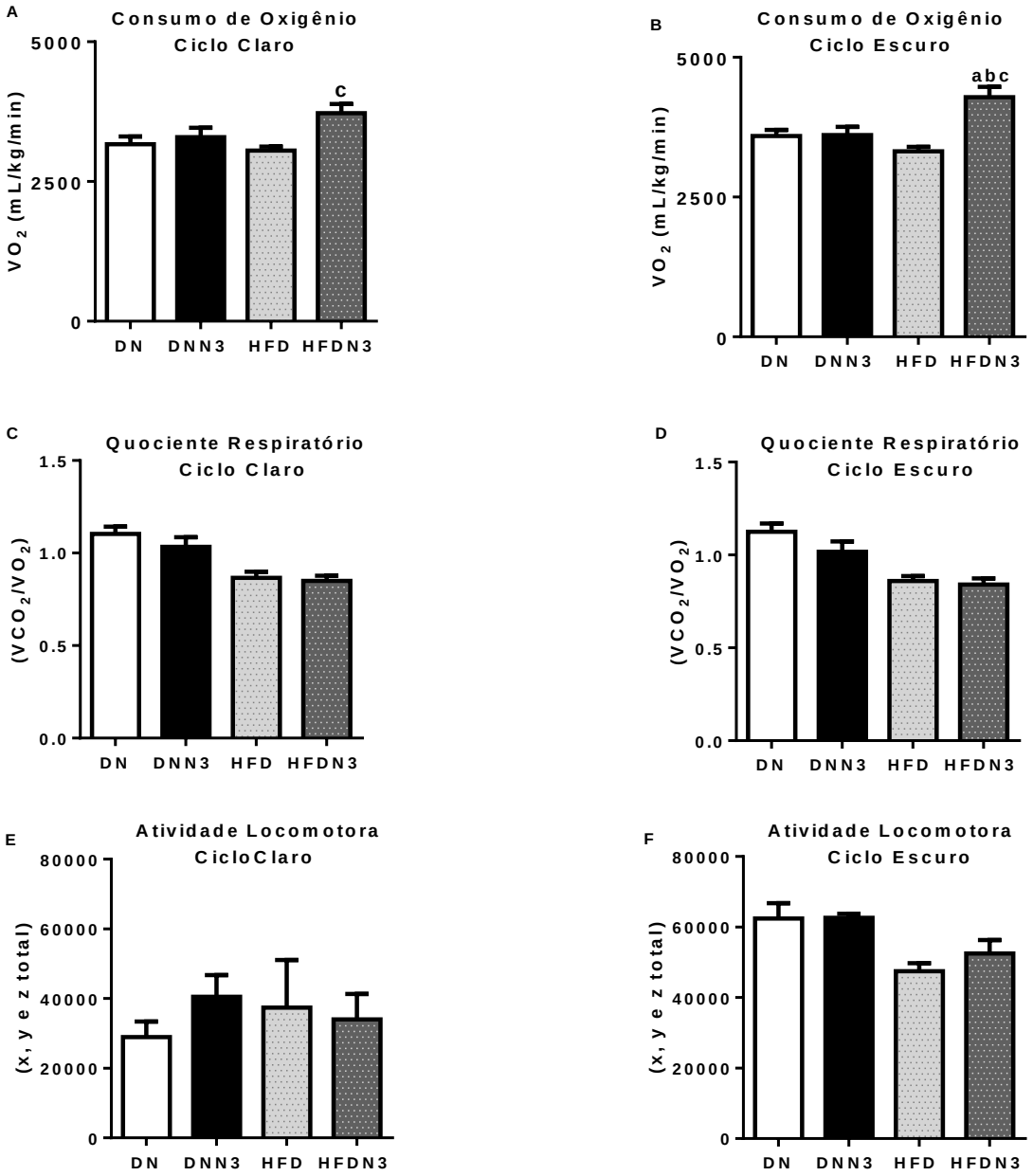


Figura 5. Consumo de oxigênio (A e B), quociente respiratório (C e D), e atividade locomotora (E e F) nos períodos claro e escuro em camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3 por 6 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4 camundongos/grupo).

Ao fim das 8 semanas de tratamento, alguns tecidos foram coletados e pesados. Como demonstrado nas Figuras 6A, B e C nenhuma diferença foi observada no peso dos tecidos adiposos epididimal, inguinal, retroperitoneal de camundongos alimentados com as dietas DN, DNN3 e HFDN3. Contudo, a dieta HFD aumentou a massa destes tecidos adiposos em comparação a todas as outras dietas. Como observado nas Figuras 6D, E e F, não foram encontradas diferenças significativas nas massas do tecido adiposo marrom, fígado e músculo gastrocnêmio em camundongos alimentados com as diferentes dietas.

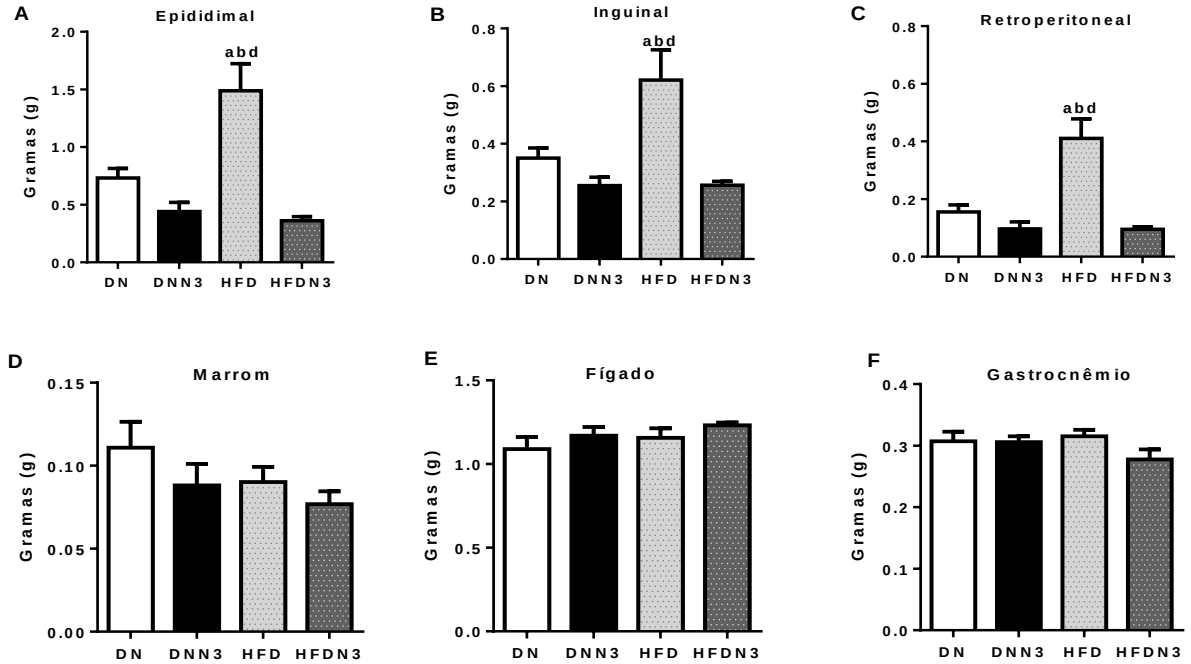


Figura 6. Massa dos tecidos adiposos epididimal (A), adiposo inguinal (B), adiposo retroperitoneal (C), adiposo marrom (D), fígado (E), baço (F), de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 6-7 camundongos/grupo).

Posteriormente realizamos análise histológica do TAI para verificar se a diminuição demonstrada no peso em gramas desse tecido no grupo HFDN3 encontra-se relacionada com uma redução da área dos adipócitos. Como ilustrado na Figura 7A, apesar da área dos adipócitos do TAI do grupo HFDN3 serem menores que a do grupo DN, isso não foi suficiente para promover diferença no peso em gramas desse tecido (Figura 6A). No entanto, a dieta HFD aumentou a área dos adipócitos, como evidenciado pelo aumento na porcentagem de adipócitos com área de 800.001-1200.000, 1.200.001-1.600.000 e >2.000.000 (Figura 7A e B). A ingestão de dieta HFDN3, entretanto, reduziu a área dos adipócitos como evidenciado pela maior porcentagem de adipócitos com área de 0-400.000 e reduzida área média (Figura 7B e C).

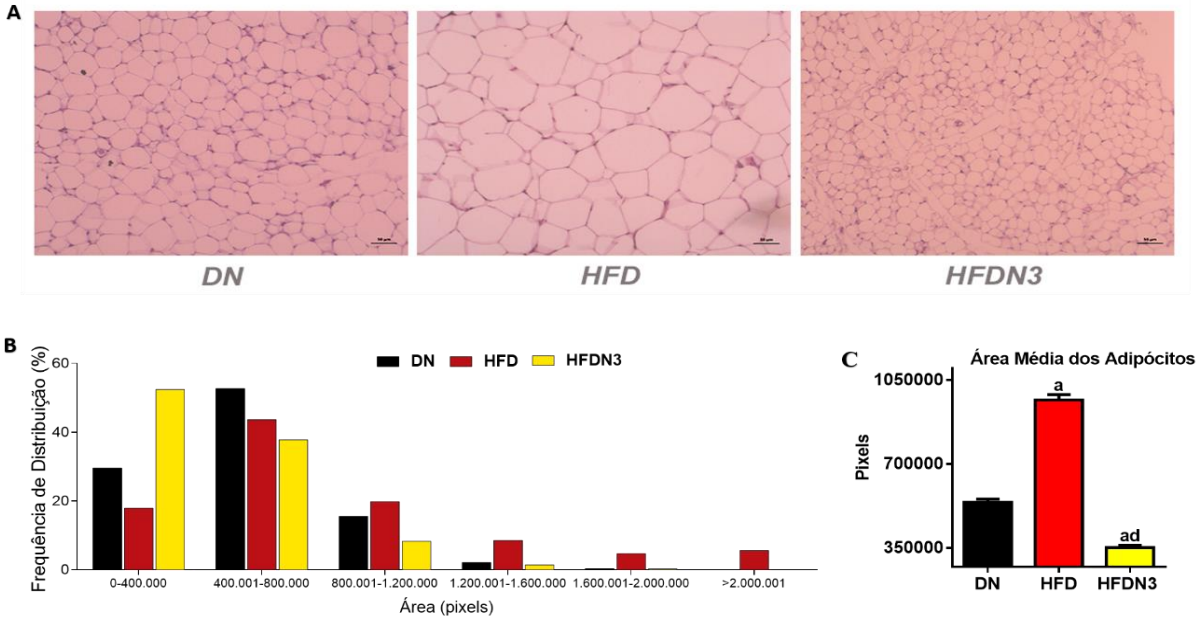


Figura 7. Secções do TAI coradas com hematoxilina e eosina (A), distribuição dos adipócitos por área (B), média da área total dos adipócitos (C) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de DN e d ≠ de HFD. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 3-4 camundongos/grupo).

Muitas vezes o aumento do peso corporal encontra-se relacionado com a piora da homeostase glicêmica, nesse sentido avaliamos alguns parâmetros relacionadas ao metabolismo da glicose. Como observado na Figura 8, a ingestão da dieta DNN3 não alterou significativamente a tolerância à glicose e os níveis séricos de glicose, insulina e adiponectina em jejum quando comparado a camundongos alimentados com dieta DN. Como esperado, a dieta HFD, promoveu intolerância à glicose e aumentou os níveis circulantes de glicose e insulina de jejum, mas não interferiu na tolerância à insulina e nos níveis circulantes de adiponectina. Interessantemente, camundongos alimentados com dieta HFDN3 apresentaram tolerância à glicose e níveis circulantes de glicose, insulina e adiponectina em jejum similares

aos demonstrados por camundongos alimentados com dieta com 10% de lipídeos (DN e DNN3).

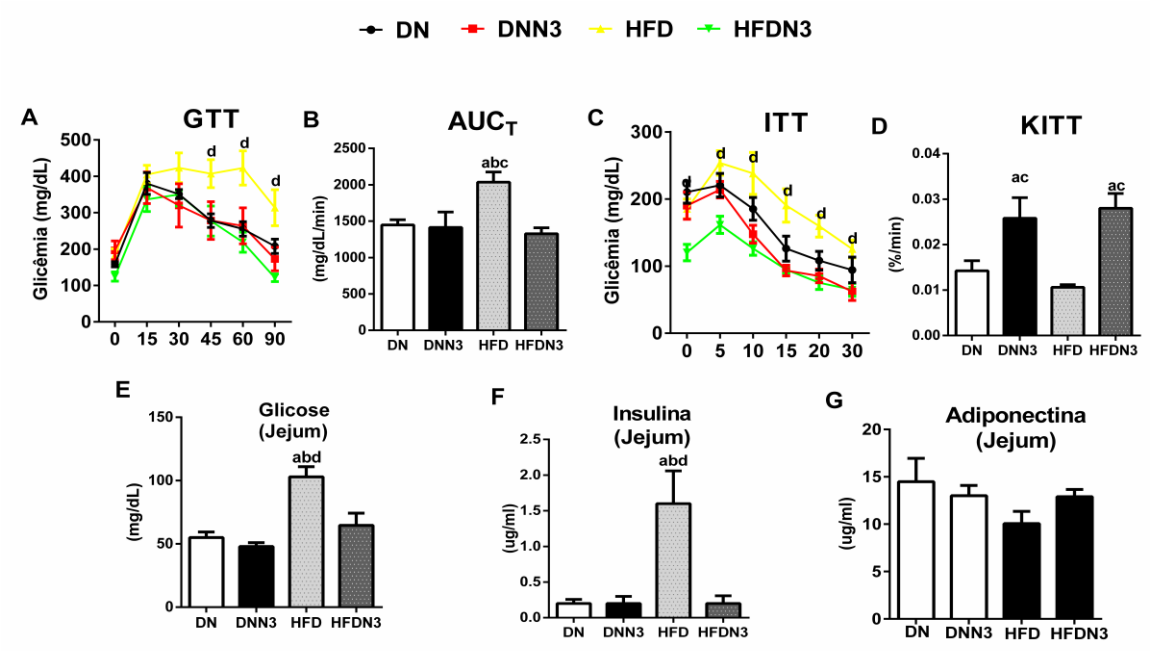


Figura 8. Teste de tolerância à glicose (A), área sob a curva (B), teste de tolerância à insulina (C), taxa de decaimento da glicose (kITT, D), glicose sérica de jejum (E), insulina sérica de jejum (F), adiponectina sérica de jejum em camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 3-7 camundongos/grupo).

Mediante o aumento no consumo de oxigênio total encontrado, decidimos avaliar a contribuição dos TAI e TAM efetivamente para esses efeitos. Como ilustrado na Figura 9A, a ingestão da dieta HFDN3 aumentou o consumo de oxigênio no TAI quando comparado ao grupo HFD. Esses efeitos da dieta HFDN3 não foram evidenciados no TAM, como demonstrado na figura 9B.

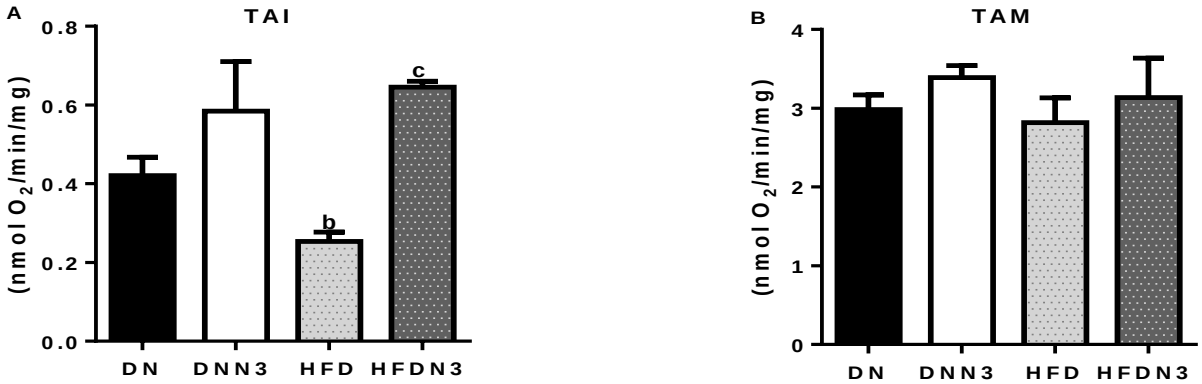


Figura 9. Consumo de oxigênio do TAI (A) e do TAM (B) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas

são apresentadas como (p<0,05) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 3-4 camundongos/grupo).

Diante do aumento do consumo de oxigênio total observado anteriormente pela calorimetria indireta no grupo HFDN3, decidimos avaliar o conteúdo da proteína UCP1 no TAM, tendo em vista a importante participação desta no balanço energético. Como observado na Figura 10, interessantemente a dieta HFD aumentou significativamente quantidade da proteína UCP1 quando comparado aos grupos DN, DNN3 e HFDN3.

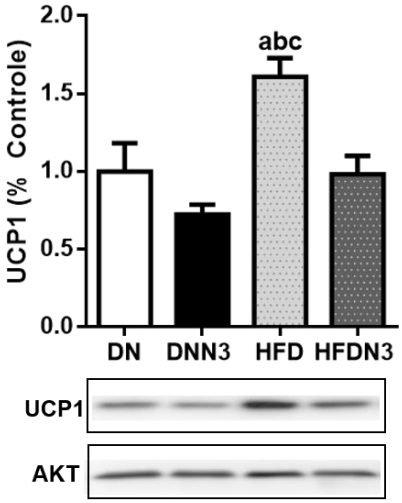
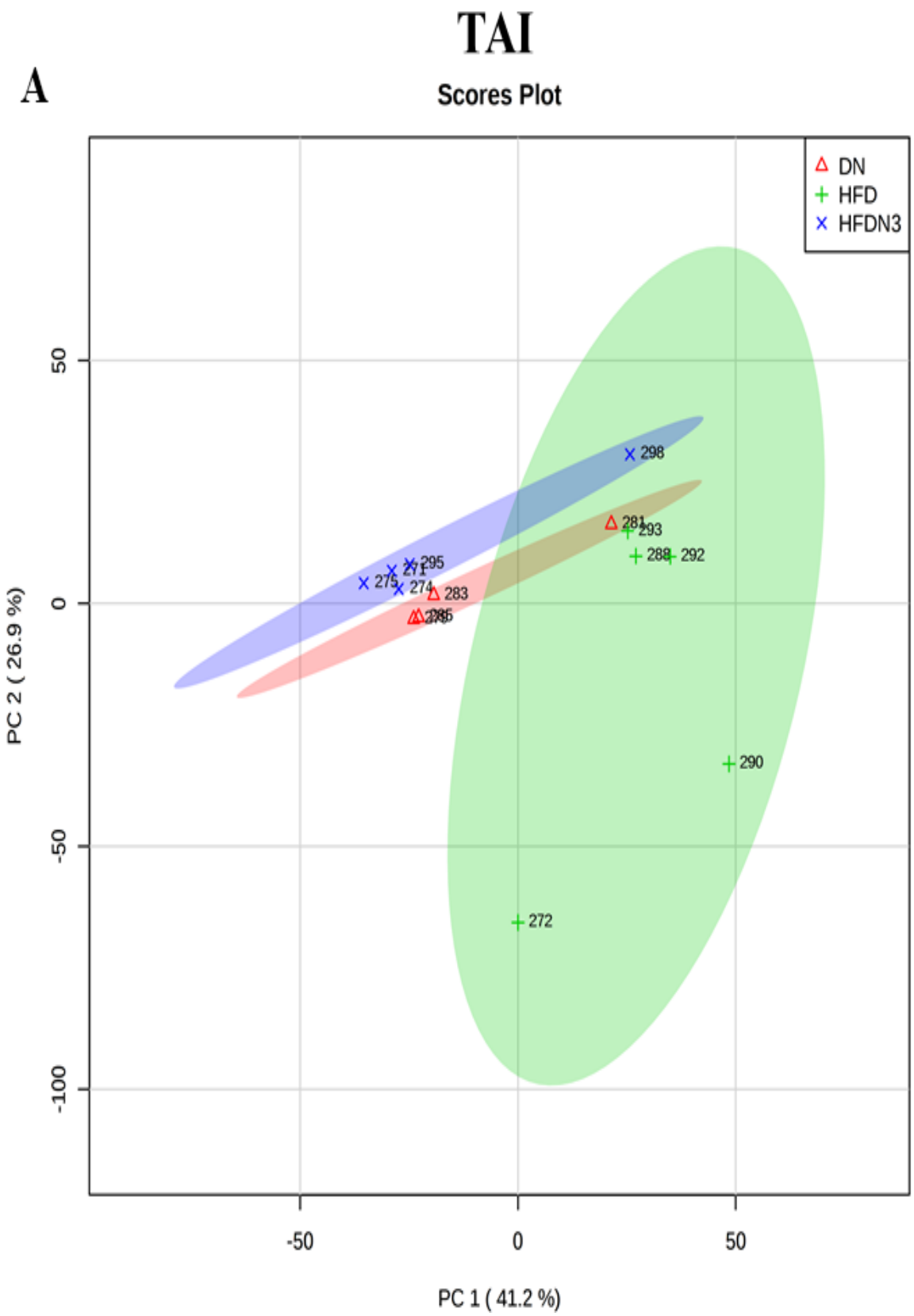


Figura 10. Western blotting do TAM de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, DNN3, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como (p<0,05) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de DNN3, c ≠ de HFD e d ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 3-4 camundongos/grupo).

Tendo em vista que a composição de lipídeos dieta tem efeitos importantes modulando o equilíbrio energético de camundongos C57BL6/J, decidimos analisar o lipidoma do TAI e TAM. O objetivo foi avaliar globalmente as espécies moleculares de lipídeos que compõem os tecidos adiposos para então verificar se grupos funcionais destes (tri- e diacilgliceróis, colesterol, ácidos graxos livres, fosfo- e esfingolipídeos) apresentam diferenças significativas em relação às dietas. No presente estudo, um total de 253 e 305 lipídeos individuais foram identificados e quantificados no TAI e TAM, respectivamente. Devido ao grande volume de dados gerados pela análise lipidômica, utilizou-se um programa estatístico especializado em metabolômica (MetaboAnalyst; XIA et al, 2006) para elucidar as variações dos lipídeos individuais em cada uma das amostras (Figuras 11 e 12).


TAI
A
Scores Plot
DN
HFD
HFDN3
298
281
293
288
292
295
271
275
274
283
290
272
50
0
-50
-100
-50
0
50
PC 2 (26.9 %)
PC 1 (41.2 %)

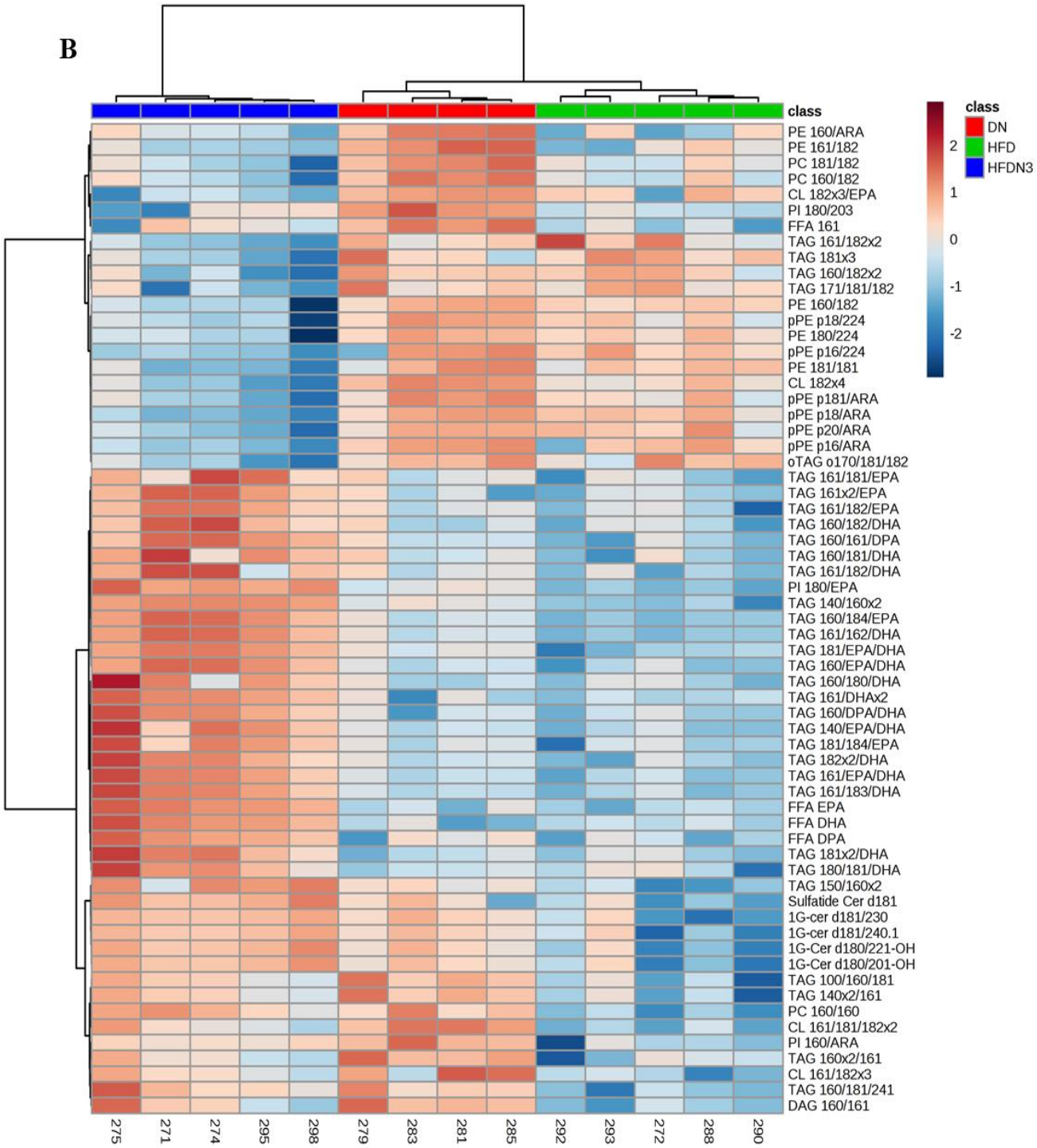
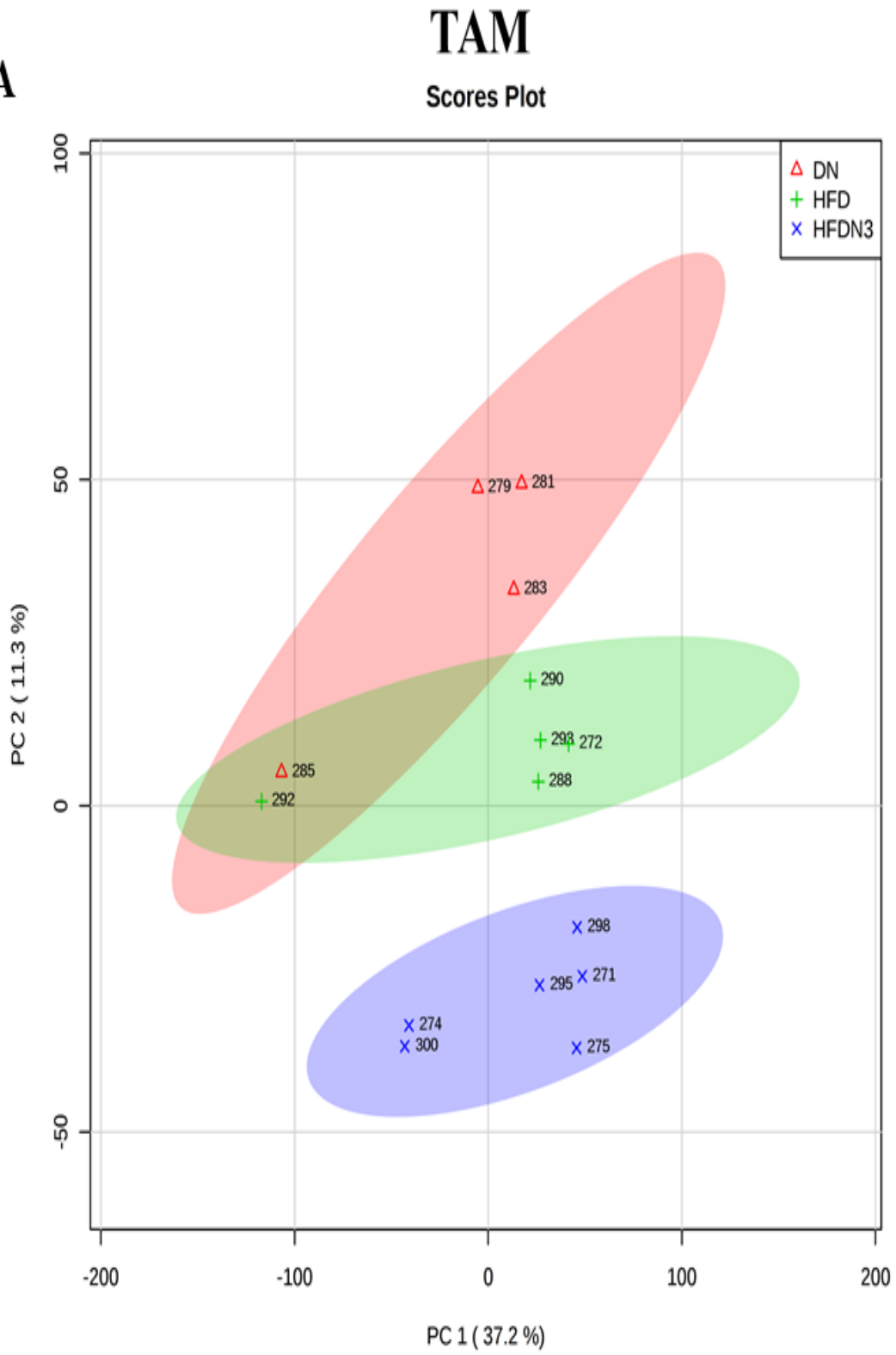


Figura 11. Análise de componente principal (A) e heatmap (B) do TAI de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo). Os grupos DN, HFD e HFDN3 estão representados pelos camundongos com a numeração: 279, 283, 281 e 285; 292, 293, 272, 288 e 290; 275, 271, 274, 295 e 298, respectivamente.

A


TAM
Scores Plot
DN
HFD
HFDN3
279
281
283
290
293
272
285
288
292
298
295
271
274
300
275
PC 2 (11.3 %)
PC 1 (37.2 %)
100
50
0
-50
-200
-100
0
100
200

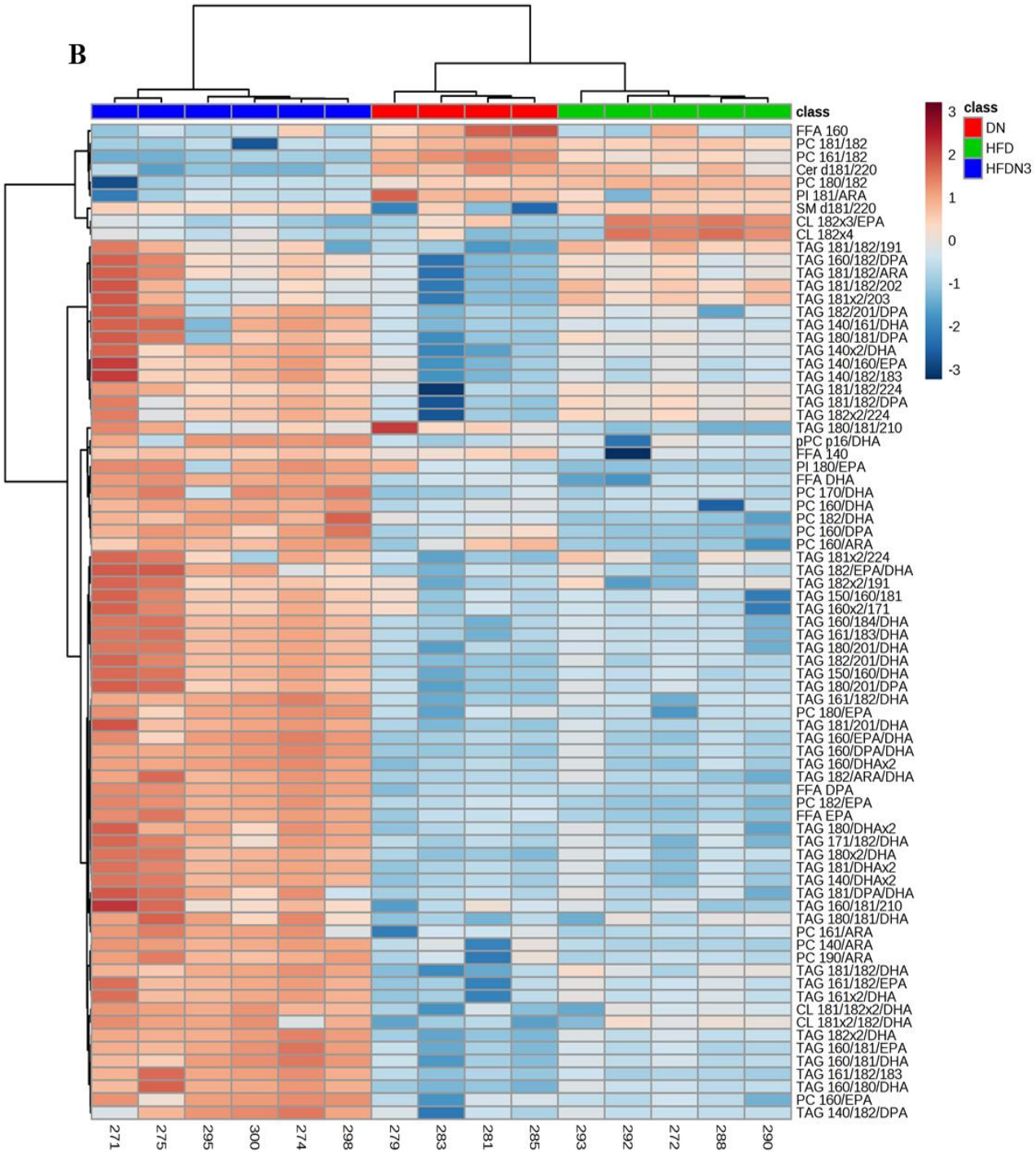


Figura 12. Análise de componente principal (A) e heatmap (B) do TAM de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo). Os grupos DN, HFD e HFDN3 estão representados pelos camundongos com a numeração: 279, 283, 281 e 285; 292, 293, 272, 288 e 290; 271, 275, 295, 300, 274 e 298, respectivamente.

As Figuras 11A e 12A exibem a análise de componente principal (PCA) para o TAI e TAM, respectivamente. Com estas análises podemos evidenciar que a ingestão das diferentes dietas promove alterações importantes no perfil de lipídeos que compõem estes tecidos, variações estas que estão diretamente associadas à distribuição das amostras na PCA. Através dos resultados da análise multivariada (ANOVA One-Way), constatou-se alterações significativas ($p<0,05$) na distribuição de aproximadamente um quarto do total de lipídeos monitorados neste estudo (63 de 253 para o TAI e 77 de 305 para o TAM). Estes lipídeos alterados foram utilizados para obter os heatmaps exibidos nas Figuras 11B e 12B. Assim como na PCA, os clusters de amostras dos heatmaps evidenciaram uma separação clara, tanto do TAI quanto do TAM baseada nas diferentes dietas. De modo geral, em ambos os tecidos adiposos destacam-se os TAG, particularmente aqueles contendo ácidos graxos ômega-3 (N3; e.g. ácido eicosapentaneoico, EPA/20:5, e docosahexaenoico, DHA/22:6). Embora em menor número, os fosfolipídeos e os ácidos graxos livres (FFA) também exibem espécies alteradas, sobretudo relacionadas à composição N3 ou ômega-6 (N6). Por exemplo, fosfolipídeos contendo ácidos graxos N6 como o ácido araquidônico (ARA/20:4) e linoleico (LA/18:2) são relativamente mais abundantes nos tecidos adiposos dos grupos DN e HFD se comparados ao HFDN3.

Tabela 3. Porcentagem de contribuição dos maiores grupos de lipídeos encontrados no lipidoma do TAI e TAM de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 durante 8 semanas. TAG=triacilglicerol, LM=lipídeos de membrana (somatório de fosfolipídeos e esfingolipídeos), DAG =diacilglicerol e FFA=ácidos graxos livres. Entre outras classes de lipídeos monitoradas, porém de porcentagem relativa <1% incluem-se total de colesterol e co-enzima Q9.

	TAI				**TAM**		
Grupo	DN	HFD	HFDN3		DN	HFD	HFDN3
TAG	93,8+/-2,8%	94,9+/-1,6%	91,4+/-3,3%		50,0+/-15,3%	70,3+/-7,4%	71,5+/-8,8%
LM	2,2+/-1,5%	1,7+/-0,9%	4,7+/-3,2%		35,0+/-13,4%	21,9+/-7,0%	21,9+/-7,0%
DAG	2,5+/-0,5%	2,1+/-0,4%	1,8+/-0,7%		1,6+/-0,7%	2,1+/-0,3%	0,8+/-0,1%
FFA	1,5+/-1,0%	1,3+/-0,6%	2,3+/-0,8		13,3+/-3,0%	5,5+/-1,0%	4,9+/-2,3%

Baseado nas alterações de espécies lipídicas individuais (Figuras 11 e 12), agrupamos os lipídeos em classes majoritárias para avaliarmos as variações qualitativas e globais dos lipidomas do TAI e TAM em relação às dietas. Como esperado para estes tipos de tecido a maior parte dos lipídeos estão representados pelos TAG (Tabela 3). Apesar das diferenças em

relação no peso corporal dos animais submetidos as diferentes dietas, não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de triacilglicerol (TAG) por miligrama de peso de tecido adiposo (Figura 13). Entretanto, como também observado por Hoene et al., 2014 e May et al., 2017, os níveis de TAG no TAI foram em geral superiores aos encontrados no TAM, especialmente nos grupos DN e HFD e em menor grau para HFDN3.

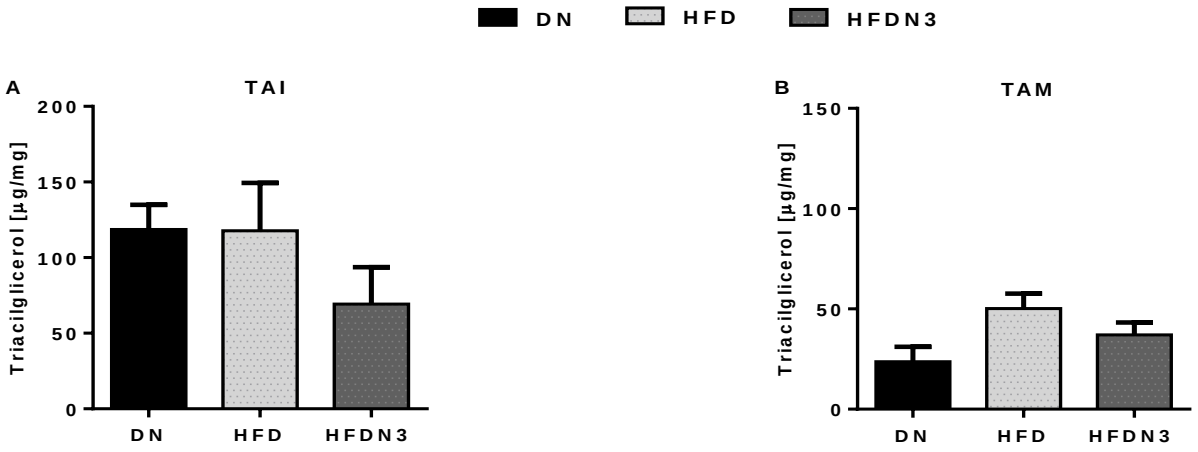


Figura 13. Concentração de triacilglicerol(TAG) do TAI (A) e do TAM (B) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo).

Outro dado interessante observado no presente estudo está relacionado à maior contribuição relativa de lipídeos de membrana (LM) e ácidos graxos livres (FFA) no TAM quando comparada àquela encontrada no TAI (Tabela 3). Dados similares foram reportados por Hoene et al 2014, os quais atribuíram a maior abundância de fosfolipídeos à maior contribuição de lipídeos derivados das mitocôndrias no TAM em relação ao TAI. Como observado na (Figura 14), as diferenças mais marcantes quanto à composição dos lipídeos de membrana entre TAI e TAM estão relacionadas à maior contribuição de fosfatidiletanolamina (PE) e cardiolipina (CL), dois dos fosfolipídeos mais abundantes no lipidoma de mitocôndrias (HORVATH; DAUM, 2013). Também pôde-se observar que a abundância relativa de esfingolipídeos é consideravelmente maior no TAI quando comparado ao TAM (Figura 14).

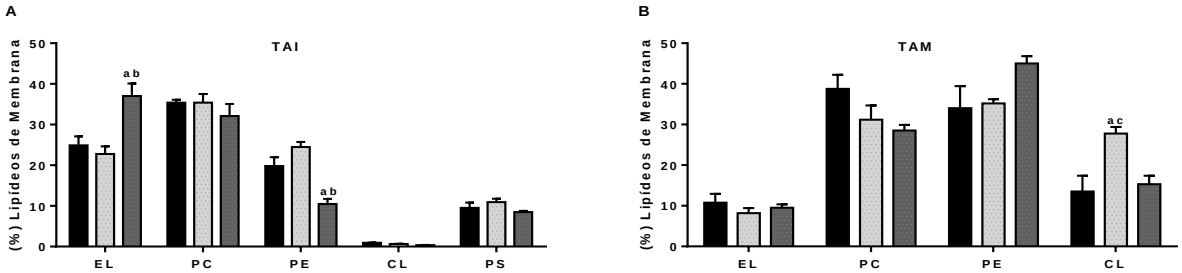


Figura 14. Percentual das principais classes de lipídeos de membrana do TAI (A) e do TAM (B) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças

estatísticas são apresentadas como (p<0,05) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de HFD e c ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo). **EL** (esfingolipideo), **PC** (fosfatidilcolina), **PE** (fosfatidiletanolamina), **CL** (cardiolipina) e **PS** (fosfatidilserina).

Devido à grande diferença na quantidade de ácidos graxos N6 em relação aos N3 ofertados nas diferentes dietas (Tabela 2), decidimos verificar a razão N6/N3 nos ácidos graxos das classes mais abundantes de lipídeos (Figura 15). Corroborando as observações prévias com lipídeos individuais (Figuras 11 e 12), constatou-se uma diminuição significativa na quantidade relativa de N6 nos TAG e FFA no grupo HFDN3 quando comparado aos grupos DN e HFD tanto no TAI como no TAM. Com exceção de fosfatidilcolina (PC) e CL no TAM, a maioria dos fosfolípideos não refletiram a diferença na razão N6/N3 encontrada entre dietas.

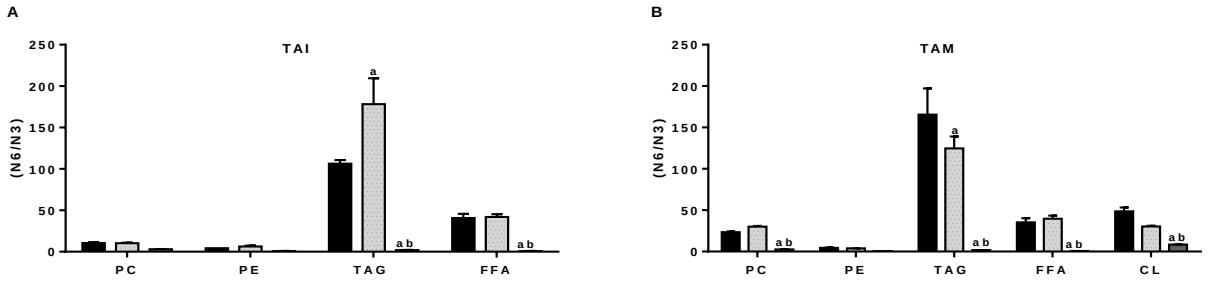


Figura 15. Razão entre os ácidos graxos N6 e N3 do TAI (A) e do TAM (B) de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como (p<0,05) da seguinte forma: a ≠ de DN, b ≠ de HFD e c ≠ de HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo). **PC** (fosfatidilcolina), **PE** (fosfatidiletanolamina), **pPE** (plasmalogênio de fosfatidiletanolamina) e **TAG** (triacilglicerol)**, FFA** (ácidos graxos livres) **e CL** (cardiolipina).

De acordo com as análises globais e específicas apresentadas acima, as maiores alterações observadas nos tecidos adiposos dos grupos DN, HFD e HFDN3 foram relacionadas aos TAG, e em menor grau aos FFA e fosfolipídeos. Subsequentemente, buscamos entender se as combinações de ácidos graxos dos TAG apresentavam alguma alteração significativa em relação à dieta. Para tanto, classificamos os ácidos graxos de TAG com relação ao número de duplas ligações (DB) por cadeia: saturados (**S**FA, nenhuma DB), monoinsaturados (**M**UFA, 1 DB), poliinsaturados (**P**UFA, 2 e 3 DB) e altamente insaturados (**H**UFA, 4 a 6 DB). Esta análise revelou que os TAG mais diferenciados continham pelo menos um HUFA esterificado em sua estrutura em ambos os tecidos adiposos analisados no grupo HFDN3 quando comparados aos outros grupos (Figura 16). Adicionalmente, percebemos que os grupos DN e HFD foram agrupados em clusters de acordo com a característica do tecido adiposo e não pela dieta. Vale ressaltar que os TAG contendo dois ou três PUFA em sua estrutura estiveram particularmente mais enriquecidos nos adipócitos do grupo HFD.

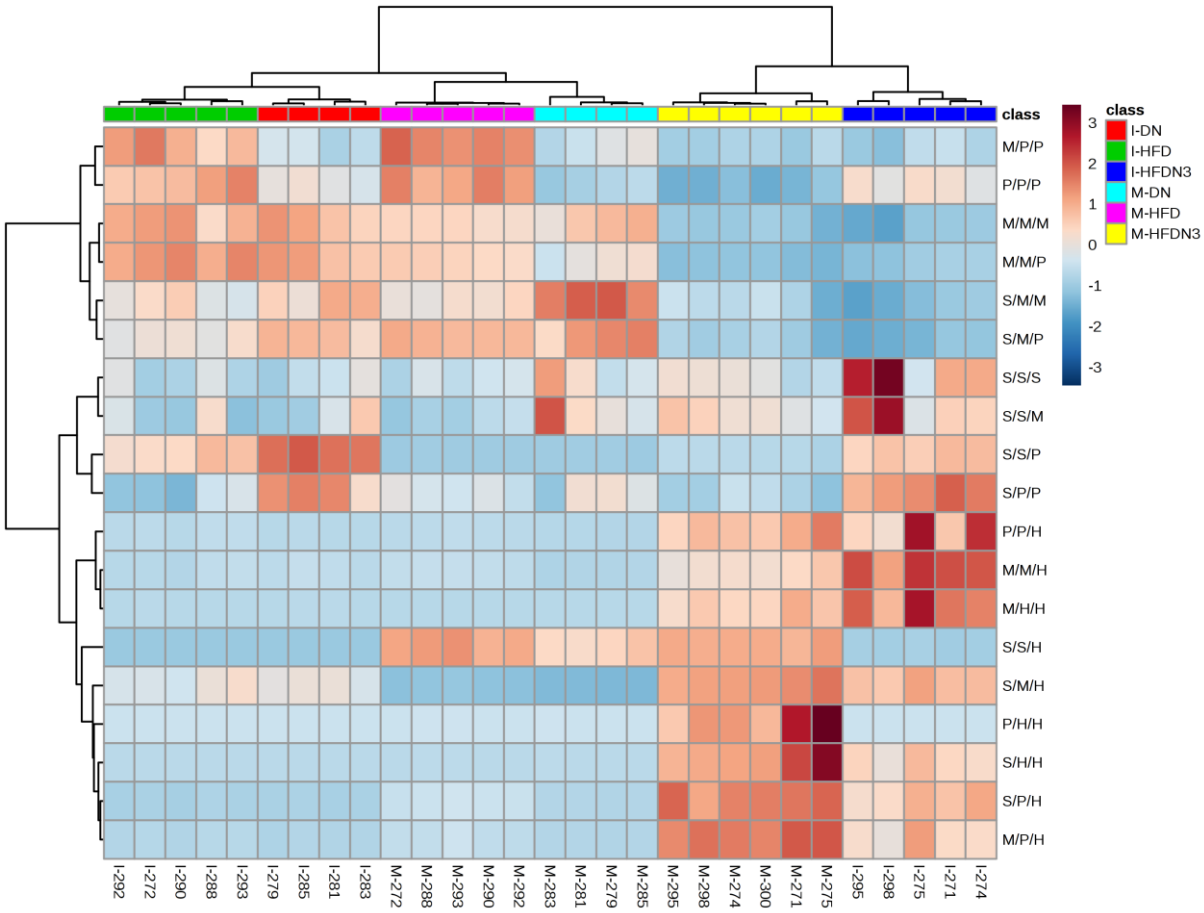


Figura 16. Análise de heatmap referente à combinação de ácidos graxos ligados às moléculas de TAG dos tecidos adiposos de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. Ácidos graxos foram classificados com relação ao número de duplas ligações por cadeia (DB): saturados (**S**, nenhuma DB), monoinsaturados (**M**, 1 DB), poliinsaturados (**P**, 2 e 3 DB) e altamente insaturados (**H**, 4 a 6 DB). A letra **I** refere-se ao tecido adiposo inguinal e a letra **M** ao tecido adiposo marrom. Os números representam a numeração de cada animal dentro do seu respectivo grupo.

Na Figura 17 podemos observar a contribuição relativa dos ácidos graxos nas moléculas de TAG para avaliarmos os principais SFA, MUFA, PUFA e HUFA. Como esperado (Figuras 11B, 12B e 16), camundongos submetidos à dieta HFDN3 apresentaram uma maior quantidade de HUFA em seus TAG, principalmente aqueles representados por ácidos graxos N3 (ácidos docosapentaenoico, DPA/22:5, EPA e DHA). Já os HUFA nos grupos DN e HFD em sua maior parte foram representados pelo ácido graxo N6 (araquidônico). Outra importante observação diz respeito a contribuição relativa de dois dos ácidos graxos mais abundantes em TAG, o ácido linoleico (18:2) e o oleico (18:1), os quais estiveram presentes em maior quantidade nos grupos DN e HFD em relação ao HFDN3 (Figura 17). O ácido oleico exibiu maior abundância relativa

no grupo HFD em relação ao DN apenas no TAI. Já o ácido linoleico, que pertence à família N6, foi o maior PUFA esterificado em TAG, apresentando maiores quantidades no grupo HFD em ambos os tecidos adiposos analisados. Com respeito aos SFA, destacou-se a maior porcentagem de ácidos graxos de cadeia curta (16:0 e 14:0) em relação ao 18:0 no grupo HFDN3 se comparado aos outros.

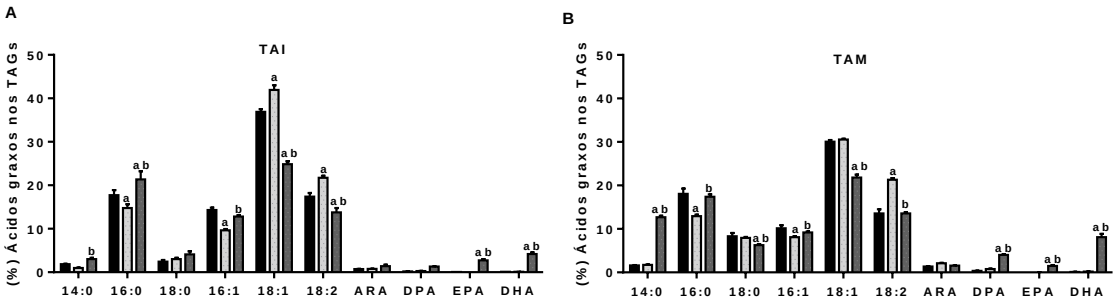


Figura 17. Percentual de ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis (TAGs) do TAI e TAM de camundongos C57BL6/J alimentados com dietas DN, HFD e HFDN3 por 8 semanas. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ DN, b ≠ HFD e c ≠ HFDN3. A ausência de letras representa ausência de diferenças estatísticas. As comparações são feitas para cada ácido graxo individualmente dentro dos diferentes grupos. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-6 camundongos/grupo).

RESULTADOS PROTOCOLO 2

Sabendo da importância da UCP1 para o balanço energético, resolvemos investigar se o efeito do óleo de peixe no aumento do gasto de energia é dependente dessa via. Para isso, administramos dieta HFD ou HFDN3 para camundongos selvagens (WT) e deficientes em UCP1 (UCP1 KO). Como evidenciado na Figura 18, o conteúdo da proteína UCP1 está ausente nos camundongos UCP1 KO quando comparados aos UCP1 WT independentemente da dieta, indicando de forma efetiva a deficiência desta proteína. Como observado na Figura 19, camundongos UCP1 WT e KO alimentados com a dieta HFD apresentaram ganho de peso corporal, eficiência energética, consumo de ração em gramas/kcal e conteúdo de kcal nas fezes similares. No entanto, quando alimentados com a dieta HFDN3, tanto os camundongos WT quanto KO apresentaram reduzido ganho de peso e a eficiência energética, independentemente de mudanças significativas no consumo de ração em gramas/kcal e no conteúdo de kcal nas fezes. Esses resultados sugerem que a ingestão da dieta HFDN3 (rica em óleo de peixe) reduz o ganho de peso corporal de maneira independente de UCP1. Além disso, a ausência dessa importante via termogênica facultativa não induziu maior ganho de peso corporal quando os camundongos foram alimentados com a dieta HFD.

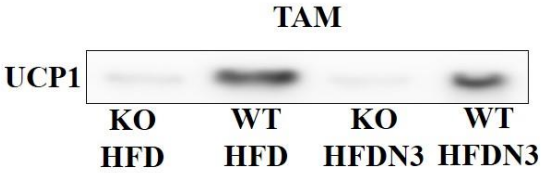


Figura 18. Western blotting do TAM de camundongos UCP1 WT e KO alimentados com dietas HFD e HFDN3 por 8 semanas.

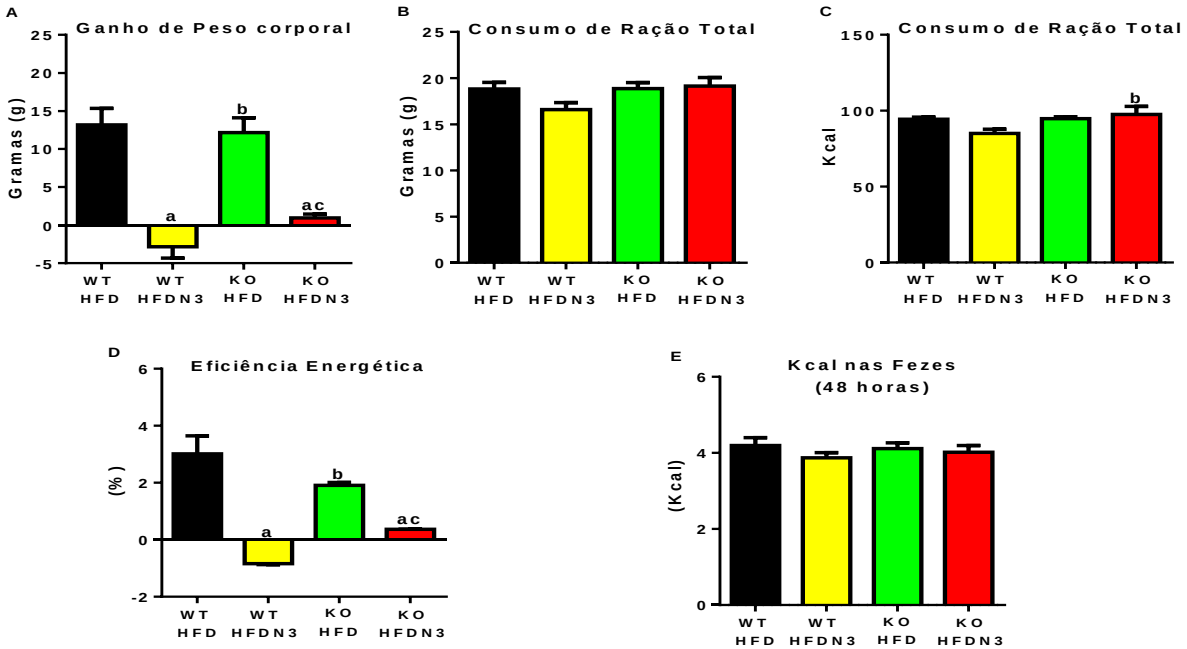


Figura 19. Ganho de peso corporal (A), ingestão alimentar em gramas (B), ingestão alimentar em Kcal (C), eficiência energética (D) e calorias nas fezes durante 48 horas (F), de camundongos WT e UCP1 KO alimentados por 8 semanas com dietas HFD e HFDN3. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de WT HFD b ≠ de WT HFDN3, c ≠ de KO HFD e d ≠ de KO HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-8 camundongos/grupo).

Posteriormente avaliamos se o reduzido ganho de peso corporal dos animais alimentados com a dieta HFDN3 estava relacionada com um maior gasto de energia avaliado pela calorimetria indireta. Como demonstrado na Figura 20A e B, tanto no ciclo claro quanto no escuro, camundongos WT e UCP1 KO alimentados com a dieta HFDN3 apresentaram consumo de oxigênio e assim gasto energético aumentados quando comparado aos camundongos WT e KO alimentados com dieta HFD. Com o objetivo de identificar se a atividade locomotora dos camundongos poderia contribuir para o aumento do gasto de energia, mensuramos essa variável. Como observado na Figura 20C e D, tanto no ciclo claro quanto no escuro, não houve diferenças significativas na atividade locomotora total entre os grupos. Outra variável avaliada foi o quociente respiratório. Como observado na Figura 20E e F, não houve

diferença entre os grupos tanto no ciclo claro como no escuro no quociente respiratório, que apresentou valores próximos de 0.7, indicando que o substrato energético utilizado para oxidação era principalmente ácidos graxos. Juntos, esses dados indicam que a ingestão de dieta rica em ácido graxo ômega 3 aumenta o gasto de energia independentemente do mecanismo de termogênese facultativa mediado pela UCP1.

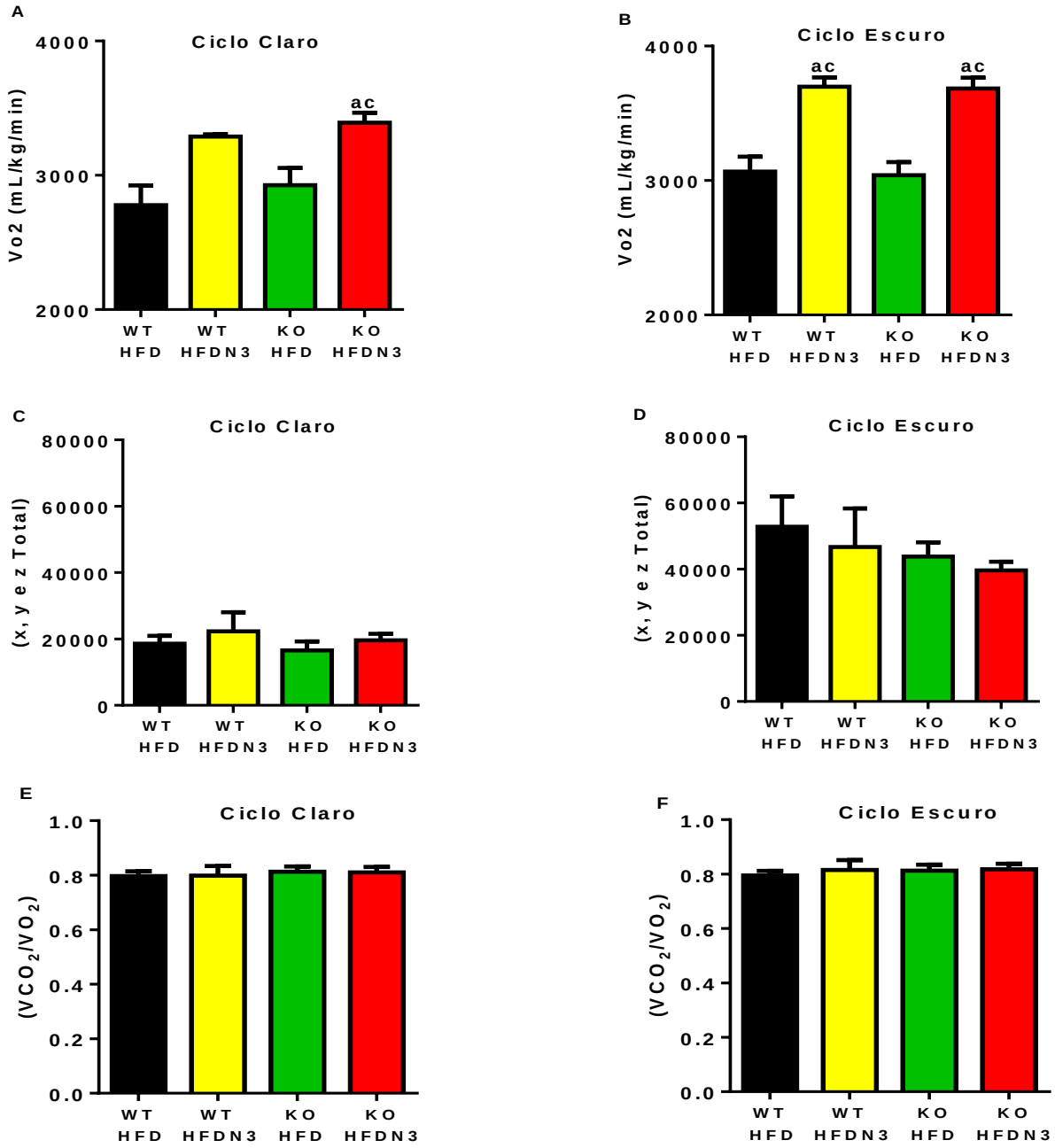


Figura 20. Consumo de oxigênio (A e B), atividade locomotora (C e D) e quociente respiratório durante 24 horas em camundongos UCP1 WT e KO alimentados por 5 semanas com dietas HFD e HFDN3. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de WT HFD b ≠ de WT HFDN3, c ≠ de KO HFD e d ≠ de KO HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 3-7 camundongos/grupo).

Como ilustrado na Figura 21, mensuramos também a massa de alguns tecidos adiposos nestes animais. Camundongos UCP1 KO alimentados com dieta HFD apresentaram reduzida massa dos depósitos epididimal (TAE) e retroperitoneal (TAR) e aumento da massa do TAM quando comparados aos camundongos selvagens alimentados com a mesma dieta. Não houve alterações nas massas do TAI, fígado e gastrocnêmio nestas condições. Corroborando com o peso corporal, a ingestão de dieta HFDN3 reduziu a massa dos tecidos adiposos epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e inguinal (TAI) tanto nos camundongos WT quanto UCP1 KO.

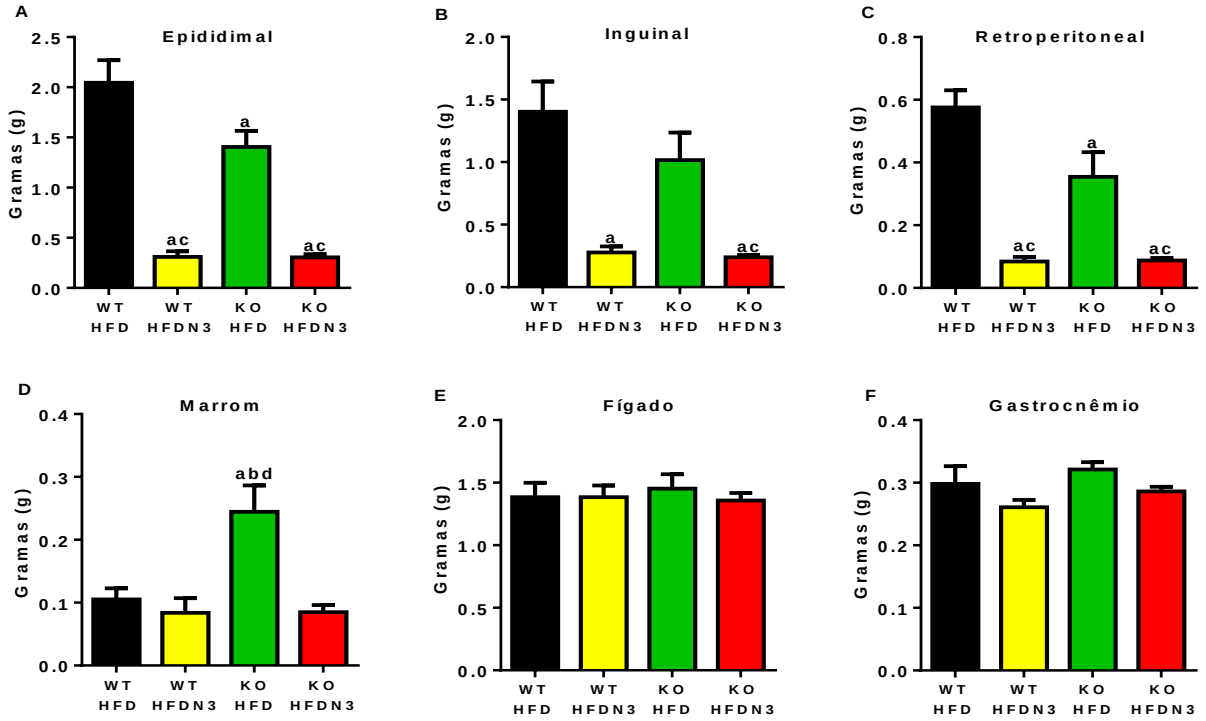


Figura 21. Massa dos tecidos adiposos epididimal (A), inguinal (B), retroperitoneal (C) e marrom (D), fígado (E) e gastrocnêmio (F) de camundongos UCP1 WT e KO alimentados por 8 semanas com dietas HFD e HFDN3. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de WT HFD b ≠ de WT HFDN3, c ≠ de KO HFD e d ≠ de KO HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-8 camundongos/grupo).

Como ilustrado na Figura 21, avaliamos também nestes animais a homeostase glicêmica por meio de teste de tolerância à glicose. Tanto os camundongos selvagens quanto os UCP1 KO alimentados com dieta HFD apresentaram maior intolerância à glicose que camundongos alimentados com dieta HFDN3. Esses resultados sugerem que a dieta HFDN3 rica em ômega 3 melhora a tolerância à glicose independentemente da termogênese facultativa mediada pela UCP1.

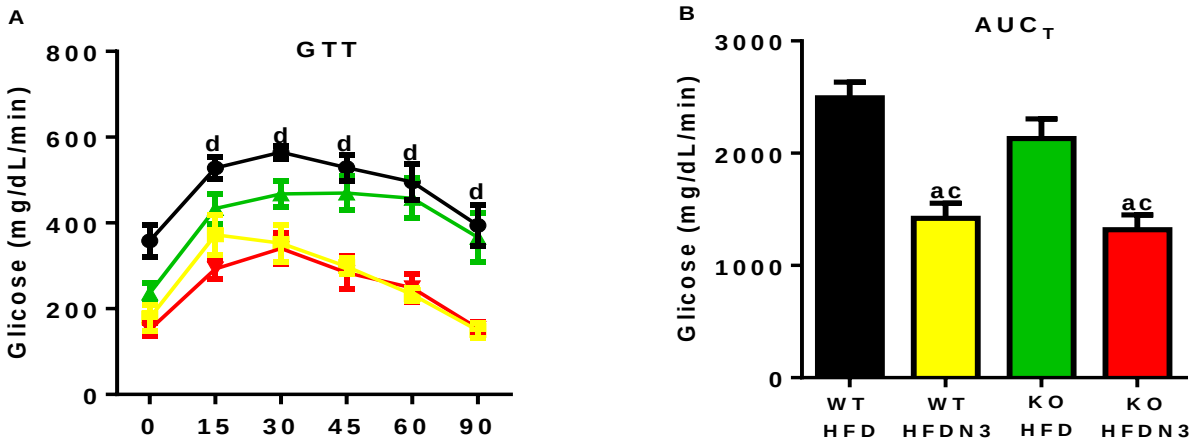


Figura 22. Teste de tolerância à glicose (A) e área sob à curva (B) de camundongos UCP1 WT e KO alimentados por 6 semanas com dietas HFD e HFDN3. As diferenças estatísticas são apresentadas como ($p<0,05$) da seguinte forma: a ≠ de WT HFD b ≠ de WT HFDN3, c ≠ de KO HFD e d ≠ de KO HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-7 camundongos/grupo).

Na tentativa de entender a contribuição do TAM e fígado para o aumento do gasto de energia total induzido pela dieta HFDN3, avaliamos o consumo de oxigênio nestes tecidos através da respirometria de alta resolução (OROBORUS). Como observado na Figura 21A, não há diferenças significativas no consumo de oxigênio do TAM entre os grupos, apesar de observamos uma pequena diminuição no grupo KO HFD. Os mesmos resultados também são observados na Figura 22B, entretanto, a dieta HFD promoveu uma leve diminuição no consumo de oxigênio quando comparado à dieta HFDN3 de forma independente do genótipo. Experimentos adicionais serão realizados com o objetivo de reavaliar a participação destes tecidos no gasto de energia.

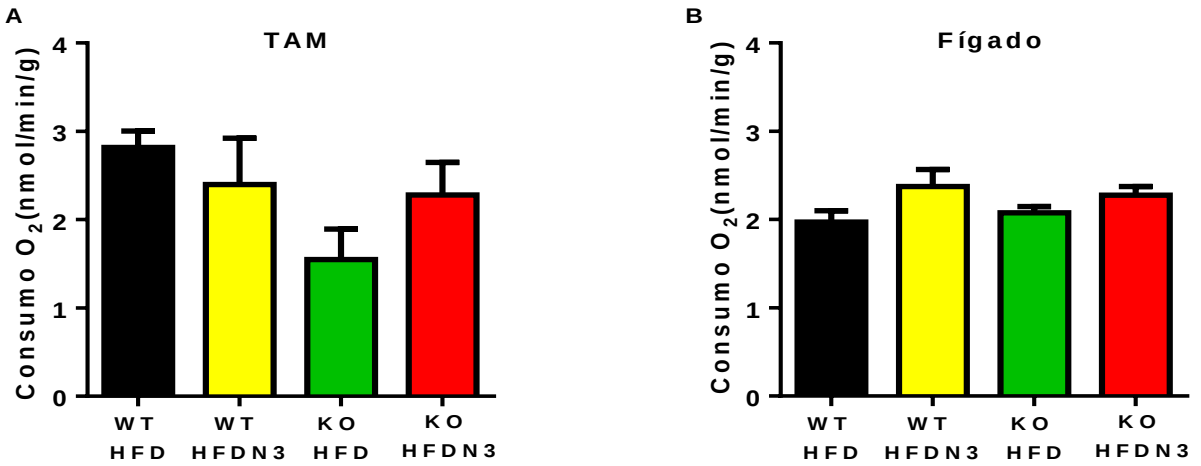


Figura 23. Consumo de oxigênio do TAM (A) e do fígado (B) de camundongos UCP1 WT e KO alimentados por 8 semanas com dietas HFD e HFDN3. A ausência de letras representa a ausência de diferenças estatísticas. Dados apresentados como média ± SEM (n= 4-8 camundongos/grupo).

DISCUSSÃO

No nosso estudo, os principais resultados encontrados foram: **1-** a dieta HFDN3 reduziu o ganho de peso corporal, aumentou o gasto energético total e o consumo de oxigênio do TAI e melhorou a homeostase glicêmica independentemente de mudanças nas concentrações de adiponectina em camundongos C57BL6/J. **2-** a dieta HFDN3 reduziu o ganho de peso corporal, aumentou o gasto energético total, melhorou a homeostase glicêmica e reduziu a massa do TAM igualmente em camundongos WT e UCP1 KO. **3-** A análise lipidômica realizada no TAI e TAM de camundongos C57BL6/J, demonstrou que dentre as classes de lipídeos analisadas, a principal mudança observada foi na composição dos ácidos graxos esterificados nos TAG.

Alguns estudos apontam que os ácidos graxos N3 reduzem o ganho de peso corporal e adiposidade de roedores induzidos pela ingestão de dieta hiperlipídica constituída de banha de porco como fonte de gordura, prevenindo o desenvolvimento da obesidade e de desordens metabólicas associadas (JANOVSKA et al., 2013; PARRISH; PATHY; ANGEL, 1990; BELZUNG, RACLOT & GROSCOLAS, 1993). Nossos resultados indicam que apesar de igual porcentagem de calorias na forma de lipídeos (60%), a simples substituição da banha de porco pelo óleo de peixe como fonte de lipídeos na dieta HFDN3 promoveu redução no ganho de peso corporal dos camundongos (Figura 4B), na ausência de diferenças significativas na ingestão alimentar (Figura 4D), sugerindo um aumento de gasto energético como mecanismo responsável por estas ações. Estes achados estão de acordo com diversos estudos que encontraram um maior gasto energético e ausência de alterações no consumo alimentar após ingestão de óleo de peixe (BARGUT et al., 2016; OUDART et al., 1997). Todavia, esses trabalhos não avaliaram a quantidade de calorias eliminadas nas fezes desses roedores que indicariam possíveis alterações no processo de digestão e absorção. Com o objetivo de entender se as variações no balanço energético encontradas no nosso estudo estavam acontecendo devido a um problema na absorção das calorias, avaliamos a quantidade de calorias contidas nas fezes dos camundongos. Observamos, após a análise das fezes produzidas durante 48 horas, que não existem diferenças entre os grupos HFD e HFDN3 (Figura 4e). De fato, os resultados do presente estudo, sugerem que o maior ganho de peso corporal do grupo HFD em relação ao HFDN3 é devido a sua maior eficiência energética definida como a capacidade de transformar a energia dos nutrientes obtidos da dieta em massa corporal, principalmente lipídeos que são armazenados no tecido adiposo (Figura 4c). Em conjunto nossos achados indicam que a composição de ácidos graxos presentes na dieta é fator tão importante quanto a quantidade na determinação do equilíbrio energético. Contudo, os mecanismos pelos quais essas respostas

acontecem são desconhecidos (BARGUT et al., 2014; OUDART et al., 1997; de SÁ et al., 2016). É importante mencionar que a proteção contra o ganho de peso corporal associada com a ingestão de dieta rica em óleo de peixe (HFDN3) parece ser dependente da quantidade de ácidos graxos N3 quando comparada às dietas DN e HFD. Como visto em nossos dados, o ganho de peso corporal do grupo DNN3 foi igual ao grupo DN, mais uma vez sem diferenças na quantidade de calorias nas fezes, eficiência energética, consumo total em gramas e quilocalorias durante as 8 semanas de tratamento (Figura 4).

O peso corporal permanece estável em situações em que a quantidade de energia ingerida seja igual à quantidade de energia gasta na manutenção das funções fisiológicas e metabólicas. Ao contrário, quando ocorre desequilíbrio nesta relação, por exemplo com ingestão energética maior que o gasto energético, há ganho de peso corporal (HILL O., 2012). O aumento no gasto de energia está associado a um maior consumo de oxigênio tanto em seres humanos quanto em roedores. Em temperaturas abaixo da termoneutralidade, o organismo aumenta a produção de calor por mecanismos dependentes e independentes do tremor muscular e assim o gasto energético com o objetivo de manter a homeotermia, (DAANEN; VAN MARKEN LICHTENBELT, 2016). Uma outra forma de aumentar o gasto energético é através do aumento da disponibilidade de ácidos graxos N3. Estudos como de Sato et al., 2010, Belchior et al., 2015, Kim et al., 2015 e Bargut et al., 2016 observaram que o aumento de ácidos graxos N3 na dieta protege camundongos contra o ganho de peso corporal e obesidade por mecanismos que envolvem o aumento do consumo de oxigênio (gasto energético). Confirmamos no presente estudo que camundongos alimentados com dieta HFDN3 apresentam maior consumo de oxigênio total no período claro e escuro quando comparados aos alimentados com dieta HFD (Figura 5A e B), sem alterações significativas na atividade motora espontânea (Figura 5 E e F). O quociente respiratório, entretanto, foi similar (próximo de 0.7) entre as duas dietas hiperlipídicas, indicando metabolismo oxidativo preferencial de ácidos graxos (Figura 5C e D). Esse último pode ser explicado pelo fato de serem duas dietas com a maior parte das calorias oriundas dos lipídeos, por essa razão, promovendo uma maior oxidação desses nutrientes.

O conteúdo e o tipo de ácido graxo existentes nas dietas são determinantes para o controle do peso corporal e da massa dos tecidos adiposos em roedores. A administração de dieta HFD enriquecida com ácidos graxos N6 é um modelo experimental bem estabelecido por induzir obesidade (YAMADA et al., 2013). Entretanto, dietas hiperlipídicas enriquecidas com ácidos graxos N3 promovem efeitos contrários (BARGUT et al., 2016; KIM et al., 2015; PARRISH; PATHY; ANGEL, 1990). Tendo em vista a relação entre peso corporal e aumento/diminuição na massa de alguns tecidos, analisamos as ações das diferentes dietas nesse

contexto. Como observado, as dietas com 10% das calorias oriundas dos lipídeos (DN e DNN3) não alteraram a massa dos tecidos avaliados (Figura 6). Em parte, podemos afirmar que baixas quantidades de ácidos graxos N3 não são suficientes para impactarem o equilíbrio energético, o peso corporal e a adiposidade. Já em relação aos grupos que consumiram dietas com 60% das calorias oriundas dos lipídeos, demonstramos importantes alterações na massa de alguns tecidos adiposos. Nesse sentido, o grupo alimentado com dieta HFDN3 que possui aproximadamente 27% de ácidos graxos N3 apresentou menor adiposidade e massa em gramas dos tecidos adiposos epididimal, inguinal e retroperitoneal (Figura 6a, b e c). Assim, podemos sugerir que a quantidade e o tipo de calorias ingeridas a partir da dieta contribuem de forma importante para a determinação da adiposidade, modulando o diâmetro e número de adipócitos maduros. Em geral, aumentos de adiposidade estão associados com processo de hiperplasia, ou seja, aumento no número dos adipócitos, e hipertrofia, aumento no diâmetro de adipócitos (FAUST et al., 1978). Alguns estudos sugerem que a ingestão de dieta HFD aumenta a massa do tecido adiposo em roedores promovendo primeiramente o processo de hipertrofia seguido de hiperplasia (JO et al., 2008; FAUST et a., 1978; HILL et al., 1993). Em nosso estudo, a análise histológica do TAI demonstrou que a HFD aumentou a área dos adipócitos quando comparado aos grupos DN e HFDN3 (Figura 7c). Entretanto, não avaliamos se houve hiperplasia.

Além de proteger contra o ganho de peso corporal e obesidade, o enriquecimento da dieta com ácidos graxos N3 também promoveu alterações positivas na homeostase da glicose (Figura 8). Alguns estudos indicam que os efeitos dos ácidos graxos N3 na melhora da homeostase da glicose parecem envolver a ativação do receptor 120 acoplado a proteína G (GPR120) nos tecidos adiposos e macrófagos. A ativação do GPR120 pelos ácidos graxos N3 em adipócitos aumenta a translocação de GLUT4, a captação da glicose e diminui a inflamação do tecido adiposo como avaliado pelo reduzido conteúdo de macrófagos do tipo próinflamatório M1 e a expressão de marcadores inflamatórios como IL-6, TNF-α, MCP-1, IL-1β (OH et al., 2010; OH; WALENTA, 2014). Digno de nota, OLIVEIRA et al., 2015 demonstraram que os efeitos benéficos dos ácidos graxos N3 na homeostase da glicose podem também ser mediados pela ativação do receptor 40 acoplado a proteína G (GPR40) no músculo esquelético. Em contraste as estes estudos, PÆRREGAARD et al., 2016 encontraram que os efeitos anti-inflamatórios e a melhora da sensibilidade à insulina induzidas pelos ácidos graxos N3 independem de GPR120. Nesse sentido, Belchior et al., 2015 sugerem que quantidades elevadas de ácidos graxos N3 em animais transgênicos *fat-1* protegem da intolerância à glicose e resistência à insulina induzidas pela ingestão de dieta HFD, em parte pela ativação dos receptores PPARγ. Em nosso estudo, a ingestão da dieta HFDN3 aumentou as tolerâncias à

glicose e à insulina e diminuiu concentrações séricas de glicose e insulina de jejum. Observamos também que a melhora na homeostase glicêmica aconteceu na ausência de alterações significativas nas concentrações séricas de adiponectina (Figura 8G), corroborando os resultados demonstrados por Belchior et al., 2015. Contudo, Flachs et al., 2006 e Paerregaard et al., 2016 reportaram que os ácidos graxos N3 aumentam a produção de adiponectina podendo ser um mecanismo responsável pela melhora na homeostase glicêmica. Em parte, a divergência nas concentrações de adiponectina entre estes estudos podem ser devido as diferenças de background dos camundongos, na quantidade de ácidos graxos N3 das dietas utilizadas e a duração do protocolo experimental. Finalmente, é importante ressaltar que ácidos graxos N3 são metabolizados formando mediadores lipídicos como resolvinas, maresinas e protectinas que exercem importantes efeitos benéficos anti-inflamatórios e de melhora da homeostase da glicose (GONZALEZ-PERIZ et al., 2009; KIM et al., 2015; SPITE; CLÀRIA; SERHAN, 2014; WHITE et al., 2014), por mecanismos que envolvem a ativação dos PPARs e a inibição de NFkB (WAHLI; MICHALIK, 2012).

Embora algumas evidências demonstrem que o TAM e os adipócitos beges do TAI são importantes determinantes da homeostase energética (BARTESAGHI et al., 2015; CANNON; NEDERGAARD, 2004; CHECHI; CARPENTIER; RICHARD, 2013; HARMS; SEALE, 2013; IKEDA et al., 2017; MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2014; OUELLET et al., 2012; SAITO, 2013; SHABALINA et al., 2013; YONESHIRO et al., 2011), a real contribuição desses tecidos, principalmente dos adipócitos beges para o aumento de gasto energético induzidos pelos ácidos graxos N3 não está clara (CASTRO; SILVA; FESTUCCIA, 2017; KEIPERT; JASTROCH, 2014). Nossos resultados indicam que grupo HFD reduziu o consumo de oxigênio no TAI, enquanto o grupo HFDN3 aumentou o consumo de oxigênio no TAI. No entanto, ainda não sabemos se esse efeito acontece via UCP1. Interessantemente a ingestão de dieta HFD aumentou o conteúdo de UCP1 no TAM, efeito estes que não refletiu em maior gasto energético total, nem protegeu camundongos contra o ganho de peso corporal, corroborando os dados de GARCÍA-RUIZ et al., 2015; e SHU et al., 2017. Estudos como de Sadurkis et al., 1995; Kim et al., 2015; Bargut et al., 2016 demonstraram que o óleo de peixe presente na dieta aumentou o conteúdo de UCP1 no TAM, embora essa resposta não tenha sido observada em nosso estudo. Apesar desta divergência, os resultados encontrados por Kim et al., 2015 e Bargut et al., 2016 de redução do peso corporal induzido pela dieta rica em óleo de peixe foram similares aos nossos. Nesse sentido, avaliamos os efeitos das dietas HFD e HFDN3 em camundongos selvagens e deficientes em UCP1 com o objetivo de investigar a verdadeira contribuição da termogênese independente do tremor muscular no aumento de gasto energético induzido pela

dieta HFDN3. Nossos resultados indicam que a dieta HFDN3 foi igualmente efetiva em reduzir o ganho de peso corporal, a adiposidade e melhorar a tolerância à glicose em camundongos selvagens e deficientes para a UCP1 (Figuras 19, 21 e 22). Esses efeitos foram acompanhados por menor eficiência energética e maior gasto de energia como avaliado pelo consumo de oxigênio (Figura 19D e 20A e B). Os mecanismos pelos quais a dieta HFDN3 aumenta o gasto energético independentemente da termogênese mediada pela UCP1 são ainda desconhecidos e experimentos futuros estão programados para tentar desvendá-los. Vale ressaltar, que camundongos UCP1 KO alimentados com dieta HFD (rica em banha de porco) e mantidos em termoneutralidade (30 °C), ganham mais peso corporal e diminuem o consumo de oxigênio total estimulado pela noradrenalina, indicando em parte, a importância da termogênese mediada pela UCP1 para o controle do balanço energético (FELDMANN et al., 2009). Embora, o TAM seja um importante sítio de termogênese independente do tremor muscular, camundongos UCP1 KO sobrevivem, após período de adaptação, a baixas temperaturas produzindo calor suficiente para a manutenção da homeotermia (ANUNCIADO-KOZA et al., 2008; UKROPEC et al., 2006). Mecanismos termogênicos alternativos que independem da produção de calor via UCP1 podem ser importantes mediadores dessa resposta. Nesse sentido, aumento na capacidade oxidativa, atividade da AMPK e SERCAs, expressão de PGC1-α e COX II foram observadas no TAI de camundongos UCP1 KO aclimatados a 4ºC (UKROPEC et al., 2006). A ativação beta-3 adrenérgica aumenta a taxa metabólica e a temperatura corporal em camundongos selvagens e UCP1 KO, demonstrando a existência de rotas termogênicas alternativas que podem ser associadas à biogênese mitocondrial e aumento na expressão de genes envolvidos na beta-oxidação dos ácidos graxos (GRANNEMAN et al., 2003). Mais recentemente, alguns trabalhos demonstraram que a ativação de ciclos metabólicos consumidores de ATP nos adipócitos beges de animais UCP1 KO aclimatados à baixas temperaturas pode responder pelo aumento do gasto de energia e produção de calor necessários para a manutenção da homeotermia destes animais. Os mecanismos que participam destas respostas envolvem o aumento no metabolismo da creatina e do cálcio (IKEDA et al., 2017; KAZAK et al., 2015, 2017). Outro importante mecanismo envolvido na termogênese e no gasto energético é controlado pelo metabolismo do cálcio no músculo esquelético mediado pelas proteínas sarcolipina e SERCAs. O desacoplamento das proteínas SERCAs pela sarcolipina aumenta a hidrólise da molécula de ATP e produção de calor. Camundongos que não expressam sarcolipina ($SLN^{-/-}$) não conseguem manter a temperatura corporal quando aclimatados em baixas temperaturas e são mais sensíveis ao ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica rica em banha de porco. Em contrapartida, a superexpressão da sarcolipina promove resistência ao

ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica rica em banha de porco. Desta forma os ácidos graxos N3 podem aumentar o gasto energético ativando algumas destas vias alternativas de produção de calor. Experimentos futuros serão realizados para avaliar esta hipótese.

Somando-se às análises metabólicas descritas até o momento, buscamos por meio da análise lipidômica, identificar e compreender os efeitos das diferentes dietas sobre a composição lipídica do TAI e TAM dos camundongos C57BL6/J. Poucos estudos investigaram a composição lipídica (TAG, FFA, fosfolipídeos, esfingolipídeos) dos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos (HOENE et al., 2014; MAY et al., 2017) e nenhum estudo investigou os efeitos da dieta HFDN3 sobre estas variáveis. No presente trabalho, alterações significativas foram identificadas em pelo menos um quarto do total de lipídeos avaliados em ambos TAI e TAM, sobretudo em relação à composição de TAG (Figuras 11 e 12). Vale lembrar que o conteúdo de TAG por miligrama de tecido adiposo não apresentou variação significativa tanto no TAI como no TAM (Figura 13), e, portanto, indica que alterações na quantidade de TAG estiveram diretamente ligadas à composição dos seus ácidos graxos. Neste sentido, buscamos desenvolver modelos que unificassem o papel dos TAG tanto no acúmulo de gordura no grupo HFD como na proteção contra o ganho de peso corporal evidenciado no grupo HFDN3.

O modelo descrito a seguir é baseado na energia termal que rege o movimento espontâneo de moléculas biológicas. Dados físico-químicos indicam que o ponto de fusão ("melting point") de ácidos graxos varia em função do número de carbono e duplas ligações (FELLER; GAWRISCH; MACKERELL, 2002; RABINOVICH; RIPATTI, 1991). De modo que quanto maior o número de moléculas de carbono e menor o número de dupla ligações, maior a energia de ativação (ou seja, temperatura) necessária para passar do estado cristalino ou sólido para o estado fluido ou líquido-gel. Estas propriedades físico-químicas dos ácidos graxos vêm sendo amplamente utilizadas em modelos de fluidez de membrana (ELDHO et al., 2003; FELLER; GAWRISCH, 2005; VALENTINE; VALENTINE, 2004) e sugerimos que também possam explicar a mobilização seletiva de TAG nos tecidos adiposos para ação das lipases (Figura do anexo). A mobilização preferencial de TAG contendo HUFA, em comparação à TAG ligados a cadeias de ácidos graxos menos insaturados como SFA, MUFA ou PUFA, pode explicar a proteção contra o ganho de peso corporal evidenciado no grupo HFDN3 (Figura 4 e 16). De fato, experimentos *in vivo* e *in vitro* no TAI de mamíferos demonstram que a liberação de ácidos graxos livres a partir da lipólise dos TAG pela enzima lipolítica lipase hormônio sensível (HSL) é altamente seletiva no sentido de favorecer TAG compostos de HUFA (CONNER; LIN; COLVIS, 1996; GAVINO; GAVINO, 1992;

HALLIWELL et al., 1996; RACLOT, 2003; RACLOT; GROSCOLAS, 1993; RACLOT; HOLM; LANGIN, 2001). Já a lipase de TAG dos adipócitos (ATGL) parece ser específica na clivagem dos ácidos graxos da molécula de TAG na posição sn-2 (EICHMANN et al., 2012), onde a maior parte dos HUFA encontra-se geralmente esterificada.

Quando comparados ao grupo HFDN3 e DN, os tecidos adiposos do grupo HFD exibiram maiores quantidades de ácido linoleico (18:2/LA) esterificado nos TAG (Figura 17). Considerando que o LA é um importante precursor para a síntese de ARA (SPRECHER, 2000), um HUFA da família N6, questionamos a razão pela qual animais alimentados por HFD não estocam ARA no TAG de adipócitos, mobilizando mais efetivamente ácidos graxos para ação das lipases (Figura do anexo). Uma possível explicação para as baixas quantidades de ARA no TAG seria a ação de oxigenases (ciclooxigenase, lipooxigenase e citocromo P-450) que podem gerar prostaglandinas e leucotrienos (Figura do anexo). A hidrólise de ARA dos TAG pela ATGL é considerada a principal via de geração de prostaglandinas e leucotrienos em células do sistema imune (DICHLBERGER et al., 2014). Estes metabólitos do ARA, também conhecidos por mediadores inflamatórios, exercem papel fundamental no aumento da massa de tecido adiposo, por uma combinação de hiperplasia/hipertrofia e diminuição da capacidade termogênica (BARQUISSAU et al., 2016; FLECKENSTEIN-ELSEN et al., 2016; FORMAN et al., 1995; PISANI et al., 2014; VASSAUX et al., 1992). Ao contrário dos efeitos dos metabólitos oxigenados do ARA, pouco se conhece sobre os mediadores lipídicos derivados do LA (VANAGVETI et al., 2016). Em um estudo recente, LENG; WINTER; AUKEMA, 2017 evidenciaram um aumento nos metabólitos oxigenados tanto de LA quanto de ARA no fígado e rins de ratos suplementados com LA. Nossos dados sugerem que o grupo HFD pode adotar uma estratégia conservadora armazenando TAG esterificados com LA ao invés de ARA nos tecidos adiposos (Figura 17). Isto é, de acordo com o modelo de mobilização preferencial de TAG contendo HUFA, TAG ligados a ARA seriam altamente mobilizados à lipólise gerando metabólitos oxigenados, ao passo que o armazenamento com LA retardaria este efeito (Figura do anexo).

Acredita-se, portanto, que as diferenças significativas na porcentagem de LA nos TAG do grupo HFD em relação aos grupos DN e HFDN3 (Figura 17) podem explicar o aumento da massa do TAI (Figura 6b) e a hipertrofia de suas células evidenciadas pelas análises histológicas (Figura 7). Por exemplo, Fleckenstein-Elsen et al., 2016 demonstraram que o tratamento de adipócitos primários humanos com ARA promove disfunção mitocondrial e aumento do tamanho da gotícula lipídica diferentemente dos efeitos de EPA, DHA e ácido oleico (18:1) nestas células. Em contraste ao ARA, a oxidação enzimática de HUFA da família N3 gera

mediadores anti-inflamatórios como resolvinas e maresinas que possuem ação direta contra obesidade (FLACHS et al., 2011; LUMENG et al., 2008; NEUHOFER et al., 2013). Por exemplo, recentemente reportou-se que a suplementação de EPA em adipócitos tratados com ARA pode reverter os efeitos inibitórios do ARA na capacidade oxidativa (GHANDOUR et al., 2018). Portanto, nossos dados sugerem que o tamanho reduzido das células e massa do TAI em camundongos alimentados com a dieta HFDN3, como já observado por outros trabalhos (BARBER; SINCLAIR; CAMERON-SMITH, 2013), possa provavelmente estar relacionado à maior mobilização de TAG ligados à HUFA-N3 para lipólise e subsequente oxidação (Figura do anexo).

Diferentemente do TAI, não houve alterações na massa do TAM entre as dietas (Figura 6D). Entretanto, a geração de metabólitos oxigenados N6 (devido à grande abundância de LA ligados a TAG no grupo HFD; Figura 17B), pode promover redução da capacidade oxidativa do TAM (PISANI et al., 2014; FLECKENSTEIN-ELSEN et al., 2016; GHANDOUR et al., 2018). Na tentativa de reverter essa situação, destaca-se a regulação da quantidade de cardiolipina (CL) no grupo HFD que atingiu cerca de 30% de todos os lipídeos de membrana no TAM (Figura 14b). A CL é um lipídeo específico da membrana mitocondrial interna considerado essencial para manutenção da morfologia e atividade respiratória das mitocôndrias (CHICCO; SPARAGNA, 2006; PARADIES et al., 2014; SCHLAME; RUA; GREENBERG, 2000). Normalmente, membranas de mitocôndrias altamente funcionais como a de hepatócitos e cardiomiócitos possuem de 15 a 20% de CL em relação ao total de lipídeos de membrana (HORVATH & DAUM, 2013; HATCH, 1996). Portanto, quantidades relativas elevadas de CL acima dos 30% no TAM do grupo HFD quando comparados aos outros grupos, sugerem uma tentativa de regular a função mitocondrial. Isto explicaria tanto a proteção do tecido contra ganho de massa (Figura 6D) quanto o aumento no conteúdo proteico de UCP1 no grupo HFD (Figura 10).

O presente trabalho, entretanto, não evidenciou um aumento significativo no consumo de oxigênio total e tecidual nos camundongos do grupo HFD (Figura 9a) que corroborasse o aumento no conteúdo de UCP1. Assim, acreditamos que essa resposta está associada à tentativa de recuperar a função mitocondrial do TAM possivelmente prejudicada pela produção de metabólitos oxigenados N6 (FJÆRE et al., 2014; FLECKENSTEIN-ELSEN et al., 2016; GHANDOUR et al., 2018; MANUSCRIPT, 2010; PISANI et al., 2014). Vale ressaltar que animais do grupo HFD deficientes em UCP1 exibiram um significante aumento de massa no TAM ao contrário dos animais selvagens (Figura 21D). Seria interessante verificar se este aumento de massa do TAM esteve ligado à deficiência de UCP1 e seu papel funcional/estrutural

contrabalanceando os níveis elevados de CL na membrana interna mitocondrial como apontado acima, já que ambos, UCP1 e CL encontram-se na membrana interna mitocondrial.

CONCLUSÃO

Demonstramos que a substituição da banha de porco pelo óleo de peixe na dieta aumenta o gasto de energia, protege contra o ganho de peso corporal induzido por dieta hiperlipídica e melhora da homeostase da glicose de camundongos. De forma interessante, nosso estudo é o primeiro a observar que esses efeitos foram independentes da UCP1 e que o perfil de ácidos graxos da dieta pode modificar a composição dos lipídeos de armazenamento e de membrana dos TAI e TAM. Acreditamos que o enriquecimento dos TAG com HUFA, pode ser importante para as respostas observadas no gasto de energia dos animais C57BL6/J alimentados com dieta HFDN3, em parte, pela alta mobilização dos HUFA para a beta-oxidação em paralelo com a ativação de vias alternativas de gasto energético. No momento, não podemos afirmar se esses efeitos se repetem nos animais selvagens e UCP1 KO. Os mecanismos responsáveis por estas ações serão investigados futuramente. Compreender como os ácidos graxos podem controlar o balanço energético poderá trazer novas contribuições para a prevenção e tratamento da obesidade

REFERÊNCIAS

ANUNCIADO-KOZA, R.; UKROPEC, J.; KOZA, R. A.; KOZAK, L. P. Inactivation of UCP1 and the glycerol phosphate cycle synergistically increases energy expenditure to resist diet-induced obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27688–27697, 2008.

BARBER, E.; SINCLAIR, A. J.; CAMERON-SMITH, D. Comparative actions of omega-3 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 5, p. 359–366, 2013.

BARGUT, T. C. L.; FRANTZ, E. D. C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. **Lipids**, v. 49, n. 5, p. 431–444, 2014.

BARGUT, T. C. L.; SILVA-E-SILVA, A. C. A. G.; SOUZA-MELLO, V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 159–169, 2016.

BARQUISSAU, V.; BEUZELIN, D.; PISANI, D. F.; BERANGER, G. E.; MAIRAL, A.; MONTAGNER, A.; ROUSSEL, B.; TAVERNIER, G.; MARQUES, M. A.; MORO, C.; GUILLOU, H.; AMRI, E. Z.; LANGIN, D. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 5, p. 352–365, 2016.

BARTELT, A.; BRUNS, O. T.; REIMER, R.; HOHENBERG, H.; ITTRICH, H.; PELDSCHUS, K.; KAUL, M. G.; TROMSDORF, U. I.; WELLER, H.; WAURISCH, C.; EYCHMÜLLER, A.; GORDTS, P. L. S. M.; RINNINGER, F.; BRUEGELMANN, K.; FREUND, B.; NIELSEN, P.; MERKEL, M.; HEEREN, J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 200–206, 2011.

BARTESAGHI, S.; HALLEN, S.; HUANG, L.; SVENSSON, P.-A.; MOMO, R. A.; WALLIN, S.; CARLSSON, E. K.; FORSLÖW, A.; SEALE, P.; PENG, X.-R. Thermogenic Activity of UCP1 in Human White Fat-Derived Beige Adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 130–139, 2015.

BELCHIOR, T.; PASCHOAL, V. A.; MAGDALON, J.; CHIMIN, P.; FARIAS, T. M.; CHAVES-FILHO, A. B.; GORJ??O, R.; ST.-PIERRE, P.; MIYAMOTO, S.; KANG, J. X.; DESHAIES, Y.; MARETTE, A.; FESTUCCIA, W. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR??-dependent and PPAR??-independent actions. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 5, p. 957–967, 2015.

BLOUET, C.; JO, Y.-H.; LI, X.; SCHWARTZ, G. J. Mediobasal Hypothalamic Leucine Sensing Regulates Food Intake through Activation of a Hypothalamus-Brainstem Circuit. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8302–8311, 2009.

CALDER, P. C. P. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 2012.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.

CASAZZA, K.; FONTAINE, K. R.; ASTRUP, A.; BIRCH, L. L.; BROWN, A. W.; BOHAN BROWN, M. M.; DURANT, N.; DUTTON, G.; FOSTER, E. M.; HEYMSFIELD, S. B.; MCIVER, K.; MEHTA, T.; MENACHEMI, N.; NEWBY, P. K.; PATE, R.; ROLLS, B. J.; SEN, B.; SMITH, D. L.; THOMAS, D. M.; et al. Myths, presumptions, and facts about obesity. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 5, p. 446–54, 2013.

CASTRO, É.; SILVA, T. E. O.; FESTUCCIA, W. T. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 31, n. 2, p. 1–9, 2017.

CHECHI, K.; CARPENTIER, A. C.; RICHARD, D. Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 24, n. 8, p. 408–420, 2013.

CHICCO, A. J.; SPARAGNA, G. C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. **AJP: Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C33–C44, 2006.

CONNER, W. E.; LIN, D. S.; COLVIS, C. Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. **Journal of lipid research**, v. 37, n. 2, p. 290–8, 1996.

CYPESS MD, PHD, MMSC, A. M.; LEHMAN MB, BS, S.; WILLIAMS MB, BS, PHD, G.; TAL PHD, I.; RODMAN MD, D.; GOLDFINE MD, A. B.; KUO MD, PHD, F. C.; PALMER MD, E. L.; TSENG PHD, Y.-H.; DORIA MD, PHD, MPH, A.; KOLODNY MD, G. M.; KAHN MD, C. R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009.

DAANEN, H. A. M.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. Human whole body cold adaptation. **Temperature**, v. 3, n. 1, p. 104–118, 2016.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.

DEROGIS, P. B. M. C.; FREITAS, F. P.; MARQUES, A. S. F.; CUNHA, D.; APPOLINÁRIO, P. P.; DE PAULA, F.; LOURENÇO, T. C.; MURGU, M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G.; MIYAMOTO, S. The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

DICHLBERGER, A.; SCHLAGER, S.; MAANINKA, K.; SCHNEIDER, W. J.; KOVANEN, P. T. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 12, p. 2471–2478, 2014.

EATON, S. B.; KONNER, M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. **The New England journal of medicine**, v. 312, n. 5, p. 283–9, 1985.

EICHMANN, T. O.; KUMARI, M.; HAAS, J. T.; FARESE, R. V.; ZIMMERMANN, R.; LASS, A.; ZECHNER, R. Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O- acyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41446–41457, 2012.

ELDHO, N. V.; FELLER, S. E.; TRISTRAM-NAGLE, S.; POLOZOV, I. V.; GAWRISCH, K. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid - Differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 21, p. 6409–6421, 2003.

FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; STERN, J. S.; HIRSCH, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **The American journal of physiology**, v. 235, n. 3, p. E279–E286, 1978.

FELDMANN, H. M.; GOLOZOUBOVA, V.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 2, p. 203–209, 2009.

FELLER, S. E.; GAWRISCH, K. Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 4, p. 416–422, 2005.

FELLER, S. E.; GAWRISCH, K.; MACKERELL, A. D. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: Intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 2, p. 318–326, 2002.

FINUCANE, M. M.; STEVENS, G. A.; COWAN, M. J.; DANAEI, G.; LIN, J. K.; PACIOREK, C. J.; SINGH, G. M.; GUTIERREZ, H. R.; LU, Y.; BAHALIM, A. N.; FARZADFAR, F.; RILEY, L. M.; EZZATI, M. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9??1 million participants. **The Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557–567, 2011.

FJÆRE, E.; AUNE, U. L.; RØEN, K.; KEENAN, A. H.; MA, T.; BORKOWSKI, K.; KRISTENSEN, D. M.; NOVOTNY, G. W.; MANDRUP-POULSEN, T.; HUDSON, B. D.; MILLIGAN, G.; XI, Y.; NEWMAN, J. W.; HAJ, F. G.; LIASET, B.; KRISTIANSEN, K.; MADSENA, L. Indomethacin treatment prevents high fat diet-induced obesity and insulin resistance but not glucose intolerance in C57BL/6J mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 23, p. 16032–16045, 2014.

FLACHS, P.; MOHAMED-ALI, V.; HORAKOVA, O.; ROSSMEISL, M.; HOSSEINZADEH-ATTAR, M. J.; HENSLER, M.; RUZICKOVA, J.; KOPECKY, J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 49, n. 2, p. 394–397, 2006.

FLACHS, P.; RÜHL, R.; HENSLER, M.; JANOVSKA, P.; ZOUHAR, P.; KUS, V.; MACEK JILKOVA, Z.; PAPP, E.; KUDA, O.; SVOBODOVA, M.; ROSSMEISL, M.; TSENOV, G.;

MOHAMED-ALI, V.; KOPECKY, J. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2626–2638, 2011.

FLECKENSTEIN-ELSEN, M.; DINNIES, D.; JELENIK, T.; RODEN, M.; ROMACHO, T.; ECKEL, J. Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 9, p. 2065–2075, 2016.

FORMAN, B. M.; TONTONOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-Deoxy-Δ12,14-Prostaglandin J2is a ligand for the adipocyte determination factor PPARγ. **Cell**, v. 83, n. 5, p. 803–812, 1995.

GALARRAGA, M.; CAMPIÓN, J.; MUÑOZ-BARRUTIA, A.; BOQUÉ, N.; MORENO, H.; MARTÍNEZ, J. A.; MILAGRO, F.; ORTIZ-DE-SOLÓRZANO, C. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2791–2796, 2012.

GARCÍA-RUIZ, E.; REYNÉS, B.; DÍAZ-RÚA, R.; CERESI, E.; OLIVER, P.; PALOU, A. The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 11, p. 1619–1629, 2015.

GAVINO, V. C.; GAVINO, G. R. Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. **Lipids**, v. 27, n. 12, p. 950–954, 1992.

GHANDOUR, R. A.; COLSON, C.; GIROUD, M.; MAURER, S.; REKIMA, S.; AILHAUD, G. P.; KLINGENSPOR, M.; AMRI, E.; PISANI, D. F. Impact of dietary ω3 polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and brite adipocyte function. **Journal of Lipid Research**, p. jlr.M081091, 2018.

GONZALEZ-PERIZ, A.; HORRILLO, R.; FERRE, N.; GRONERT, K.; DONG, B.; MORAN-SALVADOR, E.; TITOS, E.; MARTINEZ-CLEMENTE, M.; LOPEZ-PARRA, M.; ARROYO, V.; CLARIA, J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1946–1957, 2009.

GRANNEMAN, J. G.; BURNAZI, M.; ZHU, Z.; SCHWAMB, L. A. White adipose tissue

contributes to UCP1-independent thermogenesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 285, n. 6, p. E1230–E1236, 2003.

HALLIWELL, K. J.; FIELDING, B. A; SAMRA, J. S.; HUMPHREYS, S. M.; FRAYN, K. N. Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast. **J.Lipid Res.**, v. 37, n. 0022–2275 SB–IM, p. 1842–1848, 1996.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–63, 2013.

HILL O., J. NIH Public Access. **Circulation**, v. 126, n. 1, p. 126–132, 2012.

HOENE, M.; LI, J.; HÄRING, H. U.; WEIGERT, C.; XU, G.; LEHMANN, R. The lipid profile of brown adipose tissue is sex-specific in mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 10, p. 1563–1570, 2014.

HORVATH, S. E.; DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 590–614, 2013.

IKEDA, K.; KANG, Q.; YONESHIRO, T.; CAMPOREZ, J. P.; MAKI, H.; HOMMA, M.; SHINODA, K.; CHEN, Y.; LU, X.; MARETICH, P.; TAJIMA, K.; AJUWON, K. M.; SOGA, T.; KAJIMURA, S. UCP1-independent signaling involving SERCA2bmediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. **Nature Medicine**, v. 23, n. 12, p. 1454–1465, 2017.

ISHIBASHI, J.; SEALE, P. Beige Can Be Slimming. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1113–1114, 2010.

JANOVSKA, P.; FLACHS, P.; KAZDOVA, L.; KOPECKY, J. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 62, n. 2, p. 153–161, 2013.

JO, Y.-H.; SU, Y.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; CHUA, S. Oleic Acid Directly Regulates POMC Neuron Excitability in the Hypothalamus. **Journal of Neurophysiology**, v. 101, n. 5, p. 2305–2316, 10 dez. 2008.

KAPTEIN, E. M.; BEALE, E.; CHAN, L. S. Thyroid hormone therapy for obesity and

nonthyroidal illnesses: A systematic review. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 3663–3675, 2009.

KAZAK, L.; CHOUCHANI, E. T.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; ERICKSON, B. K.; SHINODA, K.; COHEN, P.; VETRIVELAN, R.; LU, G. Z.; LAZNIK-BOGOSLAVSKI, D.; HASENFUSS, S. C.; KAJIMURA, S.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 643–655, 2015.

KAZAK, L.; CHOUCHANI, E. T.; STAVROVSKAYA, I. G.; LU, G. Z.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; EGAN, D. F.; KUMARI, M.; KONG, X.; ERICKSON, B. K.; SZPYT, J.; ROSEN, E. D.; MURPHY, M. P.; KRISTAL, B. S.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. UCP1 deficiency causes brown fat respiratory chain depletion and sensitizes mitochondria to calcium overload-induced dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 30, p. 7981–7986, 2017.

KEIPERT, S.; JASTROCH, M. Brite/beige fat and UCP1 - Is it thermogenesis? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, n. 7, p. 1075–1082, 2014.

KIM, M.; GOTO, T.; YU, R.; UCHIDA, K.; TOMINAGA, M.; KANO, Y.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, p. 18013, 2015.

LAIGLESIA, L. M.; LORENTE-CEBRIÁN, S.; PRIETO-HONTORIA, P. L.; FERNÁNDEZ-GALILEA, M.; RIBEIRO, S. M. R.; SÁINZ, N.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Eicosapentaenoic acid promotes mitochondrial biogenesis and beige-like features in subcutaneous adipocytes from overweight subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 37, p. 76–82, 2016.

LEE, J.-Y.; TAKAHASHI, N.; YASUBUCHI, M.; KIM, Y.-I.; HASHIZAKI, H.; KIM, M.-J.; SAKAMOTO, T.; GOTO, T.; KAWADA, T. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 302, n. 2, p. C463-72, 2012.

LENG, S.; WINTER, T.; AUKEMA, H. M. Dietary linoleic acid and sex effects on oxylipin profiles in rat kidney, liver and serum differ from their effects on polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 8, p. 1702–1712, 2017.

LOPEZ, M. Central control of metabolism by thyroid hormone. **83rd Annual meeting of the american thyroid association**, v. 2013, 2013.

LUMENG, C. N.; DELPROPOSTO, J. B.; WESTCOTT, D. J.; SALTIEL, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239–3246, 2008.

MALIK, V. S.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 13–27, 2013.

MANUSCRIPT, A. Beige can be slimming. v. 328, n. 5982, p. 1113–1114, 2010.

MARTÍNEZ DE MORENTIN, P. B.; VARELA, L.; FERNØ, J.; NOGUEIRAS, R.; DIÉGUEZ, C.; LÓPEZ, M. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 350–361, mar. 2010.

MAY, F. J.; BAER, L. A.; LEHNIG, A. C.; SO, K.; CHEN, E. Y.; GAO, F.; NARAIN, N. R.; GUSHCHINA, L.; ROSE, A.; DOSEFF, A. I.; KIEBISH, M. A.; GOODYEAR, L. J.; STANFORD, K. I. Lipidomic Adaptations in White and Brown Adipose Tissue in Response to Exercise Demonstrate Molecular Species-Specific Remodeling. **Cell Reports**, v. 18, n. 6, p. 1558–1572, 2017.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M. L.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B. C.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359–370, 2009.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 741–756, 2014.

MORTON, G.; SCHWARTZ, M. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature Reviews**, v. 443, n. 7109, p. 289–95, 2006.

MOUSSAVI, N.; GAVINO, V.; RECEVEUR, O. Could the Quality of Dietary Fat, and Not Just Its Quantity, Be Related to Risk of Obesity? **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 1, p. 7–15, 2008.

MUNRO, I. A.; GARG, M. L. Dietary supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults. **Obesity research & clinical practice**, v. 7, n. 3, p. e173-81, 2013.

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

NEUHOFER, A.; ZEYDA, M.; MASCHER, D.; ITARIU, B. K.; MURANO, I.; LEITNER, L.; HOCHBRUGGER, E. E.; FRAISL, P.; CINTI, S.; SERHAN, C. N.; STULNIG, T. M. Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1945–1956, 2013.

OH, D. Y.; TALUKDAR, S.; BAE, E. J.; IMAMURA, T.; MORINAGA, H.; FAN, W. Q.; LI, P.; LU, W. J.; WATKINS, S. M.; OLEFSKY, J. M. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010.

OH, D. Y.; WALENTA, E. Omega-3 fatty acids and FFAR4. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. JUL, p. 2–6, 2014.

OLIVEIRA, V.; MARINHO, R.; VITORINO, D.; SANTOS, G. A.; MORAES, J. C.; DRAGANO, N.; SARTORI-CINTRA, A.; PEREIRA, L.; CATHARINO, R. R.; DA SILVA, A. S. R.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CINTRA, D. E. Diets containing ??-linolenic (??3) or oleic (??9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4033–4046, 2015a.

OLIVEIRA, V.; MARINHO, R.; VITORINO, D.; SANTOS, G. A.; MORAES, J. C.; DRAGANO, N.; SARTORI-CINTRA, A.; PEREIRA, L.; CATHARINO, R. R.; DA SILVA, A. S. R.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CINTRA, D. E. Diets containing α-linolenic (ω3) or oleic (ω9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4033–4046, 2015b.

OUDART, H.; GROSCOLAS, R.; CALGARI, C.; NIBBELINK, M.; LERAY, C.; LE MAHO, Y.; MALAN, A. Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, n. 11, p. 955–62, 1997.

OUELLET, V.; LABBÉ, S. M.; BLONDIN, D. P.; PHOENIX, S.; GUÉRIN, B.; HAMAN, F.; TURCOTTE, E. E.; RICHARD, D.; CARPENTIER, A. C. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributles to energy expenditure during cold exposure in humans. **Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 2, p. 545, 2012.

PÆRREGAARD, S. I.; AGERHOLM, M.; SERUP, A. K.; MA, T.; KIENS, B.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; JENSEN, B. A. H. FFAR4 (GPR120) Signaling Is Not Required for Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 1536047, 2016.

PARADIES, G.; PARADIES, V.; DE BENEDICTIS, V.; RUGGIERO, F. M.; PETROSILLO, G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, n. 4, p. 408–417, 2014.

PARRISH, C. C.; PATHY, D. A.; ANGEL, A. Dietary Fish Oils Limit Adipose Tissue Hypertrophy in Rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 39, n. 3, p. 217–219, 1990.

PEIRCE, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. The different shades of fat. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 76–83, 2014.

PETROVIC, N.; WALDEN, T. B.; SHABALINA, I. G.; TIMMONS, J. A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7153–7164, 2010.

PISANI, D. F.; GHANDOUR, R. A.; BERANGER, G. E.; LE FAOUDER, P.; CHAMBARD, J. C.; GIROUD, M.; VEGIOPOULOS, A.; DJEDAINI, M.; BERTRAND-MICHEL, J.; TAUC, M.; HERZIG, S.; LANGIN, D.; AILHAUD, G.; DURANTON, C.; AMRI, E. Z. The ω6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 9, p. 834–847, 2014.

RABINOVICH, A. L.; RIPATTI, P. O. On the conformational, physical properties and functions of polyunsaturated acyl chains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1085, n. 1, p. 53–62, 1991.

RACLOT, T. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 4, p. 257–288, 2003.

RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. **Journal of lipid research**, v. 34, n. 9, p. 1515–26, 1993.

RACLOT, T.; HOLM, C.; LANGIN, D. Fatty acid specificity of hormone-sensitive lipase. Implication in the selective hydrolysis of triacylglycerols. **J Lipid Res**, v. 42, n. 12, p. 2049–2057, 2001.

ROTHWELL, N.; STOCK, M. Luxuskonsumption, dietinduced thermogenesis and brown fat: the case in favour. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 64, p. 19–23, 1983.

SADURSKIS, A; DICKER, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 2 Pt 1, p. E351–E360, 1995.

SAELY, C. H.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. **Gerontology**, v. 58, n. 1, p. 15–23, 2011.

SAITO, M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 37, n. 1, p. 22–29, 2013.

SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 3, p. 257–288, 2000.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

SHABALINA, I.; PETROVIC, N.; DEJONG, J. A.; KALINOVICH, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. **Cell Reports**, v. 5, n. 5, p. 1196–1203, 2013.

SHU, L.; HOO, R. L. C.; WU, X.; PAN, Y.; LEE, I. P. C.; CHEONG, L. Y.; BORNSTEIN, S. R.; RONG, X.; GUO, J.; XU, A. A-FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–16, 2017.

SIDOSSIS, L. S.; PORTER, C.; SARAF, M. K.; BØRSHEIM, E.; RADHAKRISHNAN, R. S.; CHAO, T.; ALI, A.; CHONDRONIKOLA, M.; MLCAK, R.; FINNERTY, C. C.; HAWKINS, H. K.; TOLIVER-KINSKY, T.; HERNDON, D. N. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 219–227, 2015.

SILVA, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. **Physiological reviews**, v. 86, n. 2, p. 435–464, 2006.

SILVA, V. R. R.; MICHELETTI, T. O.; PIMENTEL, G. D.; KATASHIMA, C. K.; LENHARE, L.; MORARI, J.; MENDES, M. C. S.; RAZOLLI, D. S.; ROCHA, G. Z.; DE SOUZA, C. T.; RYU, D.; PRADA, P. O.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R. Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis. **Nature communications**, v. 5, n. May, p. 4859, 2014.

SIMONIDES, W. S.; THELEN, M. H. M.; VAN DER LINDEN, C. G.; MULLER, A.; VAN HARDEVELD, C. Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: Implications for thermogenesis. **Bioscience Reports**, v. 21, n. 2, p. 139–154, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1–17, 2016.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 21–36, 2014.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1486, n. 2–3, p. 219–231, 2000.

SUMITHRAN, P.; PROIETTO, J. The defence of body weight: a physiological basis for weight regain after weight loss. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 124, n. 4, p. 231–41, 2013.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.

UKROPEC, J.; ANUNCIADO, R. P.; RAVUSSIN, Y.; HULVER, M. W.; KOZAK, L. P. UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1-/- mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31894–31908, 2006.

VALENTINE, R. C.; VALENTINE, D. L. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: A unified concept. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 383–402, 2004.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; VANHOMMERIG, J. W.; SMULDERS, N. M.; DROSSAERTS, J. M. A. F. L.; KEMERINK, G. J.; BOUVY, N. D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G. J. J. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 2009.

WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 351–363, 2012.

WHITE, P. J.; ST-PIERRE, P.; CHARBONNEAU, A.; MITCHELL, P. L.; ST-AMAND, E.; MARCOTTE, B.; MARETTE, A. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 664–669, 2014.

WILLIAMS, K. W.; ELMQUIST, J. K. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1350–1355, 2012.

YONESHIRO, T.; AITA, S.; MATSUSHITA, M.; KAMEYA, T.; NAKADA, K.; KAWAI, Y.; SAITO, M. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 13–16, 2011.

ANEXO

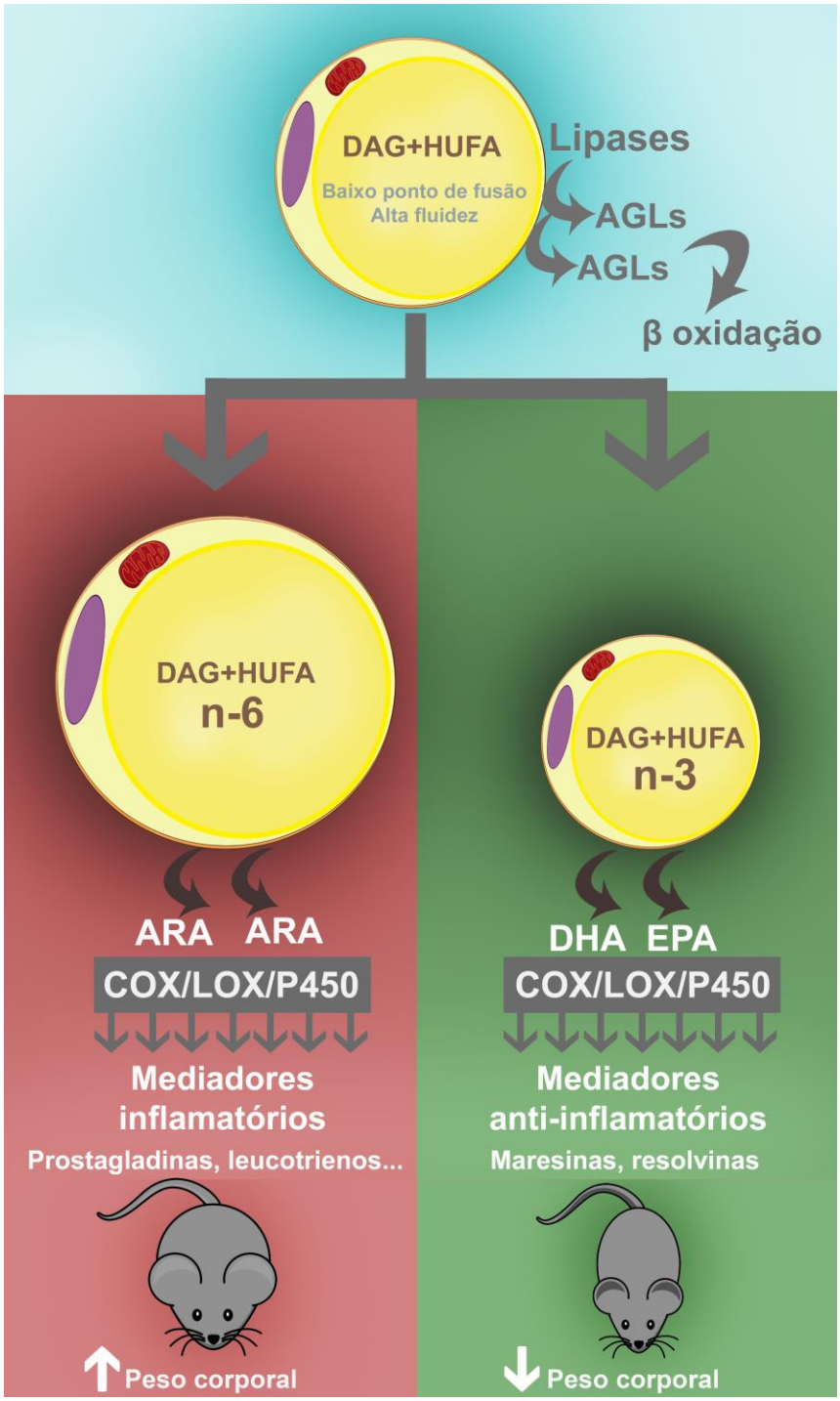


Figura 24. Modelo hipotético baseado na mobilização seletiva de ácidos graxos HUFA provenientes dos TAG.