



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

RAPHAEL CAMPOS GUIMARÃES

O PAPEL DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA)
COMO UMA LIPOCINA ANTI-LIPOGÊNICA
NECESSÁRIA PARA A ADAPTAÇÃO DO FÍGADO À
EXPOSIÇÃO AO FRIO

CAMPINAS

2020

RAPHAEL CAMPOS GUIMARÃES

**O PAPEL DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) COMO
UMA LIPOCINA ANTI-LIPOGÊNICA NECESSÁRIA PARA A
ADAPTAÇÃO DO FÍGADO À EXPOSIÇÃO AO FRIO**

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na Área de Bioquímica*

Orientador: Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAPHAEL
CAMPOS GUIMARÃES, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA

CAMPINAS

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G947p Guimaráes, Raphael Campos, 1993-
O papel do ácido docosahexaenoico (DHA) como uma lipocina anti-lipogênica necessária para a adaptação do fígado ao frio / Raphael Campos Guimaráes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Luiz Osório Silveira Leiria.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido docosahexaenoico. 2. Frio. 3. Fígado. I. Leiria, Luiz Osório, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evidences for cold-induced adipose tissue-liver crosstalk involving docosahexanoic acid (DHA) as an anti-lipogenic lipokine

Palavras-chave em inglês:

Docosahexaenoic acid

Cold

Liver

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Luiz Osório Silveira Leiria [Orientador]

Dennys Esper Correa Cintra

Leonardo dos Reis Silveira

Data de defesa: 01-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4826-717X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2678754006572007>

Campinas, 01/10/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

Dedico essa dissertação a minha falecida avó, Luiza da Silva Menezes, uma mulher negra, pobre e nordestina, que, apesar das imensuráveis dificuldades que a vida lhe impôs, criou a mim, minha mãe e irmã com todo carinho e dedicação. A grandiosidade de sua história faz com que suas lembranças nos acompanhem pelo resto de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Luiz Osório Silveira Leiria, pelas grandes lições e ensinamentos que me tornaram uma pessoa e um profissional muito melhor do que quando terminei minha graduação.

Gostaria de agradecer também ao meu colega e parceiro de laboratório, Tiago Tomazini Gonçalves, que sempre me ajudou e apoiou nas questões profissionais e pessoais. Também agradeço aos meus outros colegas de laboratório, como a Andrea Rocha, Beatriz Guerra e Gerson Profeta, pela paciência de terem me ensinado como trabalhar em um laboratório. Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LaBE) nesse período por terem incentivado grandes discussões no âmbito da ciência e da vida.

Agradeço aos professores Marcelo Mori e Lício Velloso que cederam espaço, equipamento e reagentes dos seus laboratórios para que meu trabalho de mestrado fosse possível. Em especial, agradeço ao prof. Marcelo Mori por ter participado da minha banca de qualificação e agregado sua experiência a esse trabalho. Também gostaria de estender meus agradecimentos à bióloga responsável pelo LanSinCel, Joseane Morari, por ter dedicado muita de sua paciência e tempo para me mostrar o funcionamento do laboratório o qual realizei grande parte dos meus experimentos.

Agradeço aos meus pais, que me sempre me apoiaram incondicionalmente, independente das minhas decisões. Gostaria de agradecer, em especial, a minha falecida avó, Luiza da Silva Meneses, que me criou com toda dedicação possível e que, sem dúvida, foi a pessoa que mais contribuiu para a pessoa que sou hoje.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo 157274/2018-7 –, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) – processo 2018/25053-3 – por terem financiado minha bolsa de estudos e meu projeto de pesquisa.

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

RESUMO

Em resposta a exposição ao frio, organismos endotérmicos ajustam seu metabolismo para indução da produção de calor a fim de manter a temperatura corpórea adequada. Para que essa modulação se dê de forma eficiente, os tecidos de um organismo se comunicam através de moléculas sinalizatórias. Os lipídeos, além de atuarem como fonte energética, também podem atuar como essas moléculas sinalizatórias, sendo, nesse contexto, chamados de lipocinas. Durante a exposição ao frio, o tecido adiposo libera ácidos graxos, através de lipólise, que são consumidos como substrato energético. Esse tecido também libera lipocinas, como o 12,13-diHOME e o 12-HEPE, os quais estimulam a captação de ácidos graxos e glicose de forma autócrina e endócrina. No entanto, pouco se sabe sobre a natureza de outras lipocinas liberadas pelo tecido adiposo. Devido a isso, e a dados preliminares do nosso grupo, que mostraram que a exposição ao frio em camundongos induz um aumento nos níveis de ácido docosaheptaenoico (DHA) no fígado, ao mesmo tempo em que ocorre uma diminuição do mesmo no tecido adiposo, esse trabalho teve como objetivo investigar se o DHA pode agir como uma lipocina anti-lipogênica liberada pelo tecido adiposo durante a exposição ao frio. O trabalho indica que o DHA, captado no fígado, age para diminuir o acúmulo de triacilgliceróis (TAG) nesse órgão pela regulação negativa da via responsável pela síntese de ácidos graxos a partir de carboidratos, via chamada de *de novo* lipogênese (DNL). Nossos dados também sugerem que esse DHA é proveniente de uma maior conversão de seu precursor, o ácido α -linolênico (C18:3, ALA), devido ao aumento da expressão gênica de *Fads2*, enzima essencial nessa conversão, no tecido adiposo de animais expostos ao frio (4°C). Para mostrar o papel do DHA como uma lipocina, utilizamos um experimento em *time course*, o qual camundongos foram expostos ao frio por diferentes períodos. Isso nos permitiu confirmar que o tempo necessário para que ocorresse o aumento dos níveis de DHA no fígado é o mesmo tempo necessário para que ocorresse a diminuição de ALA no tecido adiposo. Além disso, o tempo em que houve aumento de DHA no fígado também coincidiu com o tempo necessário para a diminuição da transcrição de genes relativos a DNL hepática, alvos conhecidos da ação do DHA. Adicionalmente, também obtivemos maiores consumos de oxigênios pelos complexos mitocondriais no fígado de animais expostos, o que sugere maior oxidação de ácidos graxos. Esses resultados parecem justificar a diminuição do acúmulo de TAGs mensurada nesse órgão. Com isso, nossos dados sugerem que o DHA é sintetizado e transportado do tecido adiposo ao fígado para modular negativamente a produção hepática de TAG durante a exposição ao frio.

ABSTRACT

During cold exposure, endothermic organisms, such as mammals, fine tune their metabolism to induce a process called thermogenesis. The main purpose of thermogenesis is to convert chemical energy from macronutrients into heat, in order to maintain body temperature. For an efficient modulation of the metabolism, the different tissues of an organism communicate with each other through signaling molecules. In addition to their role as an energy substrate, lipids can also act as signaling molecules. In this context, lipids are called lipokines. During cold exposure, adipose tissue releases fatty acids, through lipolysis, which are consumed as an energy substrate, and lipokines, such as 12,13-diHOME and 12-HEPE, which stimulate the uptake of fatty acids and glucose in an autocrine or endocrine manner. Therefore, this work aimed to investigate whether the docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA), can act as lipokine release by adipose tissue during cold exposure. Our preliminary data indicates that mice exposed to cold show an increase in DHA levels in the liver and a decrease in DHA levels in adipose tissue. This suggested a transport of DHA from adipose tissue to the liver. Our work also indicates that DHA captured in the liver, acts to decrease the accumulation of triacylglycerols (TAG) in the liver by the downregulation of the metabolic pathway responsible for the synthesis of fatty acids from carbohydrates, pathway called *de novo* lipogenesis (DNL). In the adipose tissue, our data suggest that DHA is provided from a previous conversion of α -linolenic acid (C18:3, ALA) into DHA in white adipose tissue, via Sprecher pathway, since we observed an increased expression in the *Fads2* gene, an essential enzyme in this pathway. To show the role of DHA as a lipokine, we used a time course experiment, in which mice were exposed to 4° C at different periods. This experiment showed that the time required for the increase in DHA levels in the liver was the same time required for the decrease in ALA in adipose tissue and the increase in *Fads2* expression. Also, at the same time-point, we found a decrease in the transcription of genes related to hepatic DNL, known targets of the action of DHA in the liver. Additionally, we also obtained higher oxygen consumption by the mitochondrial complexes in the liver of exposed animals, which suggests greater oxidation of fatty acids caused by the inhibition of DNL. These results seem to justify the decrease in the accumulation of TAGs measured in the liver. Thus, our data suggest that DHA is synthesized and transported from adipose tissue to the liver to downregulate hepatic TAG production during cold exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Lipólise do tecido adiposo.....	15
Figura 2. <i>Nonshivering</i> termogênese do tecido adiposo marrom (BAT)	17
Figura 3. De novo lipogênese hepática	20
Figura 4. Via Sprecher	22
Figura 5. O frio induz um aumento de DHA no fígado e diminuição de ALA e DHA nos tecidos adiposos	32
Figura 6. O aumento de DHA no fígado parece induzir uma diminuição da razão MUFA/SFA através da diminuição da transcrição de <i>Scd1</i>	34
Figura 7. Composição porcentual de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo perigonadal dos camundongos expostos ao frio no experimento <i>time course</i>	36
Figura 8. O aumento de DHA no fígado pode estar relacionado com a diminuição da expressão de genes da DNL e com o menor acúmulo de TAGs nesse órgão	40
Figura 9. O frio induz a expressão gênica de <i>Fads2</i> no tecido adiposo perigonadal (pgWAT).....	41
Figura 10. Conclusão parcial do experimento <i>time course</i>	43
Figura 11. Os maiores níveis de DHA hepático levam a um aumento do consumo de oxigênio mitocondrial	46
Figura 12. Camundongos submetidos a dieta hiperlipídica não transportam o DHA para o fígado	50
Figura 13. Determinação de temperatura do grupo controle	53
Figura 14. Modelo proposto.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACLY	ATP-dependent citrate lyase
ALA	Ácido α -linoleico
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
ATP	Adenosine triphosphate
BAT	Brown Adipose Tissue
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
ChREBP	Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein
CPT	Carnitine Palmitoyltransferase
CREB	cAMP response element-binding protein
DHA	Ácido docosaenoico
DNL	<i>de novo</i> lipogênese
ELOVL	Elongase
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FADS	Fatty acid desaturase
FASN	Fatty acid synthase
G6P	Glucose-6-phosphate
HSL	Hormone-sensitive Lipase
L-PK	Liver pyruvate kinase
LPL	Lipoprotein lipase
MUFA	Monounsaturated fatty acid

NEFA	Non-esterified fatty acid
PDH	Pyruvate dehydrogenase complex
PKA	Protein Kinase A
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SFA	Saturated fatty acid
TAG	Triacylglycerol
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TF	Transcriptional factor
UCP1	Uncoupling Protein 1
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
WAT	White Adipose Tissue

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	14
2.	Hipótese	25
3.	Objetivos	25
4.	Materiais e métodos.....	26
4.1.	Exposição de camundongos ao frio.....	26
4.2.	Composição das dietas utilizadas	26
4.3.	Análise de expressão gênica por Real Time-qPCR.....	27
4.4.	Análises dos perfis lipídicos por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (GC-MS).....	28
4.5.	Extração e quantificação de lipídeos totais em fígado e soro de camundongos	29
4.6.	Consumo de oxigênio mitocondrial	30
4.7.	Análise estatística.....	30
5.	Resultados	31
5.1.	Resultados preliminares 1: O frio induz aumento dos níveis de DHA no fígado e diminuição nos tecidos adiposos.....	31
5.2.	Resultados Preliminares 2: O aumento DHA parece estar relacionado com a inibição de <i>Scd1</i> e menor grau de dessaturação no fígado	33
5.3.	O tempo necessário para o aumento de DHA no fígado coincide com o tempo necessário para a diminuição de ALA no tecido adiposo	35
5.4.	O aumento de DHA no fígado pode estar associado a diminuição da DNL nesse órgão	37
5.5.	O frio induz o aumento de expressão gênica de <i>Fads2</i> no tecido adiposo perigonadal	41
5.6.	Conclusão parcial do experimento <i>time course</i>	42

5.7.	O transporte de DHA, induzido pelo frio, parece estimular a atividade mitocondrial hepática.....	44
5.8.	Camundongos obesos são resistentes ao transporte DHA para fígado	47
5.9.	Determinação da temperatura do grupo controle: termoneutralidade (30° C) versus temperatura ambiente (22° C)	51
6.	Discussão	54
7.	Conclusões Parciais	62
8.	Referências	63
9.	Anexos	77
9.1.	Termo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP)	77
9.2.	Declaração de que a dissertação não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora	78

1. Introdução

O fígado e o tecido adiposo são órgãos centrais na regulação do metabolismo energético em mamíferos. Para que essa regulação se dê de forma eficiente, há uma intensa e complexa rede de comunicação capaz de modular as ações desses tecidos em diferentes condições fisiológicas e fisiopatológicas (Priest & Tontonoz, 2019; Scheja & Heeren, 2016). Essa regulação pode ser mediada por diversos fatores, como lipídeos, os quais podem ser obtidos através da dieta ou mesmo liberados na circulação como consequência da lipólise do tecido adiposo (Calderon-Dominguez et al., 2016; Scheja & Heeren, 2016; Yilmaz & Claiborn, 2016). Quando os lipídeos possuem ação sinalizatória, estes são classificados como lipocinas, termo que foi utilizado pela primeira vez para descrever a ação sinalizatória do ácido palmitoleico (C16:1), que age na inibição da lipogênese hepática e no aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético (Cao et al., 2008; Hern, 2019; Scheja & Heeren, 2016). Após essa descoberta, outras lipocinas começaram a ser descritas na literatura, como é o caso do 12,13-diHOME e do 12-HEPE, os quais são liberados pelo tecido adiposo marrom (BAT) durante a exposição ao frio (Leiria et al., 2019; Lynes et al., 2017). Esses lipídeos estimulam a captação de ácidos graxos e aumentam sensibilidade a insulina em tecidos periféricos.

Além de estimular a liberação de lipocinas, o frio também ativa o sistema nervoso simpático (SNS), o qual induz a liberação de catecolaminas, como noradrenalina e adrenalina. Essas catecolaminas agem nos receptores β 3-adrenérgicos dos adipócitos e ativam eixo de sinalização cAMP/PKA/CREB, estimulando a hidrólise de TAGs, através da ação da *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) e *Hormone-sensitive lipase* (HSL), para a liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFA, também chamados de ácidos graxos livres, FFA) e glicerol na circulação (Cannon & Nedergaard, 2004; Carpentier et al., 2018; Ramseyer & Granneman, 2016) (**Figura 1**). Esse processo é conhecido como lipólise. No BAT, os NEFA são captados e utilizados para a produção de calor através do aumento de

atividade da *Uncoupling Protein 1* (UCP1) e oxidação como substrato energético (Chouchani et al., 2019; Fedorenko et al., 2012) (**Figuras 2A e 2B**).

A proteína UCP1 é a principal proteína envolvida no processo de geração de calor no BAT, processo de chamado de *nonshivering* termogênese. Sua função é aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, permitindo que os prótons, bombeados para o espaço intermembrana, pelos complexos mitocondriais, retornem a matriz dessa organela sem que haja a síntese de ATP (Betz & Enerbäck, 2018). Esse processo resulta em um rápido consumo de ácidos graxos e glicose para a manutenção do potencial elétrico intermembrana da mitocôndria, promovendo a produção de calor (Chouchani et al., 2019). De maneira concomitante, a exposição ao frio também estimula a atividade do músculo esquelético. Esse processo se dá principalmente através do tremor e, portanto, é denominado *shivering* termogênese (Betz & Enerbäck, 2018). A *shivering* termogênese também resulta em maior consumo de substratos energéticos pelo músculo.

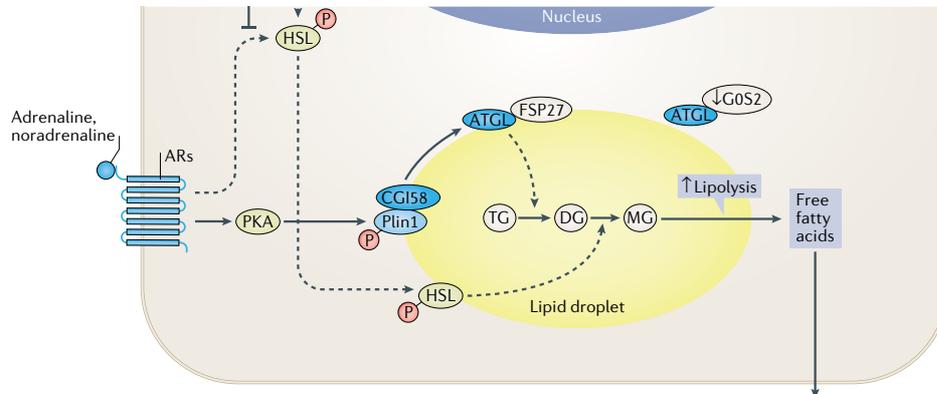


Figura 1. Lipólise do tecido adiposo

O frio estimula a liberação de noradrenalina, que age nos receptores β_3 dos adipócitos para estimular a síntese de AMP cíclico (cAMP) pela ação da adenilato ciclase. O cAMP ativa a proteína cinase A (PKA) que ativa a ação de enzimas, como lipase hormônio sensível (HSL), perilipinas (Plin1) e *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL), ativando o processo de hidrólise de triacilglicerídeos (TAGs) na gota lipídica dos adipócitos. Primeiramente a ATGL hidrolisa os TAGs em diacilgliceróis (DG) liberando um ácido graxo não esterificado (ou *free fatty acid*, FFA), em seguida, a HSL hidrolisa o DGs em monoacilgliceróis (MG) para a liberação de mais um FFA. Os FFAs são lançados na corrente sanguínea para serem consumidos por outros tecidos. Imagem retirada de Kopchick et al., 2020.

Devido a essa maior demanda energética imposta pelo BAT e músculo durante a termogênese, o fígado sofre profundas alterações metabólicas visando fornecer substratos energéticos para esses tecidos. Uma dessas alterações é a maior produção hepática de glicose, o qual ocorre através do aumento da quebra do glicogênio hepático, processo chamado de glicogenólise, e do aumento da conversão de alanina, lactato e glicerol em glicose, processo chamado de gliconeogênese (Cunningham et al., 1985; Sepa-Kishi et al., 2018). A glicose, assim como os ácidos graxos, também é utilizada como substrato energético para a produção de calor no BAT e no músculo (Blondin et al., 2015; Townsend & Tseng, 2014). Além disso, o fígado pode captar os NEFAs, liberados através da lipólise, e direcioná-los para a reesterificação e produção de TAGs, que são exportados para a circulação como *very low density lipoprotein* (VLDL)-TAG (Gibbons et al., 2004; Gruffat et al., 1996).

No endotélio vascular, as *Lipoprotein lipase* (LPL) hidrolisam os TAGs associados a VLDL e os libera aos tecidos para serem captados na forma de ácidos graxos livres (Hoeke et al., 2016). O processo de transporte de ácidos graxos para dentro das células é mediado por proteínas transportadoras, como a FATP e CD36 (**Figura 2A**) (Bartelt et al., 2011). Adicionalmente, a lipólise do tecido adiposo branco (WAT) também estimula o fígado a sintetizar acil-carnitinas para serem oxidadas no BAT (Simcox et al., 2017). Acil-carnitinas são moléculas resultantes da esterificação de ácidos graxos com carnitina, e sua produção é necessária para que esses ácidos graxos possam atravessar a membrana mitocondrial interna, a fim de serem posteriormente utilizados como substrato da β -oxidação mitocondrial. Essas acil-carnitinas são produzidas pela ação da *Carnitine palmitoyltransferase 1a* (CPT1a), enzima limitante da β -oxidação (Schooneman et al., 2013; Simcox et al., 2017). Esses processos destacam a importância do fígado durante a termogênese.

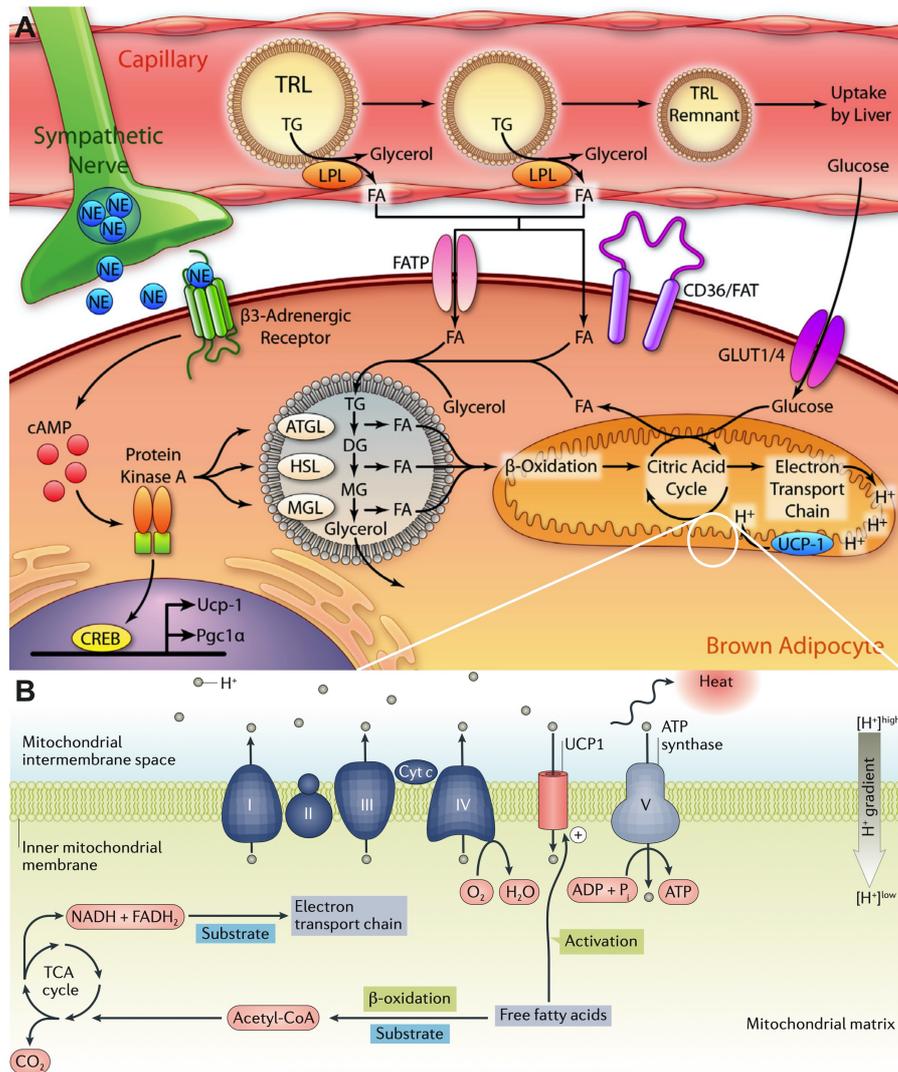


Figura 2. Nonshivering termogênese do tecido adiposo marrom (BAT)

A) Processo de ativação do metabolismo de ácidos graxos e glicose nos adipócitos marrom. A sinalização adrenérgica ativa o eixo cAMP/PKA/CREB, ativando a lipólise e transcrição de UCP1 e PGC1- α . Concomitantemente, a captação de glicose e ácidos graxos é estimulada através das proteínas transportadoras GLUT1/4 (transportadores de glicose) e FATP e CD36 (transportadores de ácidos graxos). A maior captação de ácidos graxos também é estimulada pelo aumento da lipólise de *Triglyceride rich lipoproteins* (TRL) (VLDL e quilomícrons) através da *Lipoprotein Lipase* (LPL). B) Os ácidos graxos entram na β -oxidação para a produção de Acetil-CoA e NADH e FADH₂. O Acetil-CoA sofre consecutivas reações no Citric Acid Cycle (ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) ou ciclo de Krebs) para a produção de mais NADH e FADH₂. Por fim, as coenzimas reduzidas são oxidadas pelos complexos mitocondriais (complexos I-V, complexo V também chamado de complexo ATP-sintase) para o transporte de elétrons e bombeamento de prótons para o espaço intermembranas. O complexo IV utiliza os elétrons recebidos para a redução de O₂ em H₂O metabólica. Já o complexo V utiliza a força próton motriz para a síntese de ATP, a partir de ADP e íons fosfato. A UCP1, ativada por ácidos graxos livres, permite o retorno desses prótons para a matriz mitocondrial, produzindo calor. Imagem retirada de A) Hoeke et al., 2016 B) Betz & Enerbäck, 2018.

No entanto, pouco se sabe se a lipólise pode liberar lipídeos capazes de modular o metabolismo lipídico do fígado durante a termogênese. Isso torna os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) fortes candidatos a esse papel, já que podem ser estocados no tecido adiposo (Lin & Connor, 1990) e são agentes anti-lipogênicos hepático bem documentados (Jump et al., 2013; Scorletti & Byrne, 2013). Estruturalmente, os PUFAs são caracterizados como ácidos graxos de cadeia longa que apresentam mais que uma dupla ligação (instauração) entre os carbonos de sua cadeia. Eles podem ser classificados como ômega-3 ou ômega-6, dependendo da posição da primeira dupla ligação em relação a extremidade metila (Saini & Keum, 2018). Dentre os ômega-3, o ácido eicosapentaenoico (EPA, molécula com 20 carbonos e 5 insaturações, portanto C20:5) e o ácido docosaexaenoico (DHA, C22:6) são bastante conhecidos por inibirem a *de novo* lipogênese (DNL) hepática através da inibição de fatores de transcrição (TF) lipogênicos *Sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c) e *Carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP) (Dentin et al., 2005; Takeuchi et al., 2010; Xu et al., 1999). Além disso, os PUFAs também podem se ligar aos *Peroxisome proliferator-activated receptors α* (PPAR α) que são receptores nucleares que estimulam a transcrição de genes associados a β -oxidação mitocondrial no fígado (Pawar & Jump, 2003). Adicionalmente, o EPA pode melhorar a resposta termogênica do BAT ao se ligar aos receptores GPR120/FFA4, que promovem a diferenciação e a expressão de UCP1 em adipócitos marrons (Ghandour et al., 2018; Kim et al., 2015).

Os fatores de transcrição SREBP1c e ChREBP estimulam a transcrição de genes da DNL e da glicólise, como *fatty acid synthase (Fasn)*, *acetyl-CoA carboxylase (Acc)*, *ATP-citrate lyase (Acl)*, *Stearoyl-CoA desaturase-1 (Scd1)* e *Liver-piruvate kinase (L-Pk)* (Wang, et al. 2015), e, apesar desses TFs parecerem redundantes em suas funções, eles são diferentes nas suas formas de regulação. Enquanto o SREBP1c é ativado pela sinalização da insulina, o ChREBP é ativado por xilulose-5-fosfato ou glicose-6-fosfato, metabólitos produzidos na via das pentoses fosfato (Dentin et al., 2012; Linden et al., 2018; Postic et al., 2007; Y. Wang et al., 2015) e via glicolítica (Dentin et al., 2012), respectivamente. O ChREBP possui duas isoformas, α e β , que são reguladas conjuntamente, mas de

maneira distinta. A isoformas ChREBP α é sensível aos metabólitos da glicólise e via das pentoses citados, e o aumento da sua atividade induz a transcrição da isoformas β , que, por sua vez, induz a transcrição de genes da DNL e glicólise (Postic et al., 2007). Apesar de SREBP1c e ChREBP poderem ser ativados separadamente, quando agem em conjunto esses dois TFs levam a maior capacidade da DNL (Linden et al., 2018).

A DNL é a via metabólica responsável pela síntese de TAG a partir do excesso de carboidratos na célula. O processo se inicia quando o excesso de monossacarídeos, como glicose e frutose, no tecido gera uma grande quantidade de Acetil-CoA mitocondrial, produzido a partir da glicólise e a da ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH). Esse excesso de Acetil-Coa é transportado para o citoplasma na forma de citrato. No citoplasma da célula, esse citrato é convertido novamente em Acetil-CoA pela ação da ACLY e, em seguida, a ACC adiciona um grupo carboxilato ao Acetil-CoA para a formação de Malonil-CoA. O Malonil-CoA tem função regulatória nessa via, inibindo a atividade de CPT1a e limitando a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, conseqüentemente inibindo a β -oxidação (**Figura 3**). Isso impede a ocorrência simultânea da geração e oxidação de ácidos graxos na célula. Em seguida, a FASN forma o palmitato (C16:0) através de uma série de condensações entre a Malonil-CoA e a Acetil-CoA. Apesar do Malonil-CoA ser o mesmo tanto para a inibição de CPT1a, como para a condensação com o Acetil-CoA, as isoformas da ACC que o produzem são diferentes para essas duas situações. Enquanto a ACC1 é citosólica e produz Malonil-CoA para a formação do palmitato, a ACC2 é ancorada na membrana mitocondrial externa e é responsável pela produção do Malonil-CoA para a inibição da CPT1a (**Figura 3**). As duas isoformas são ativadas durante a DNL (Tong, 2005; Wu & Huang, 2020).

O palmitato formado sofre diversos processos de modificação, como alongação e dessaturação, que aumentam e inserem duplas ligações a cadeia carbônica em sua cadeia (**Figura 3**). Por último, os ácidos graxos formados são esterificados com a molécula de glicerol para a formação dos TAG, que podem ser armazenados em nas gotas lipídicas ou exportados na forma de VLDL (**Figura 3**) (Hellerstein et al., 1996; Hodson & Gunn, 2019).

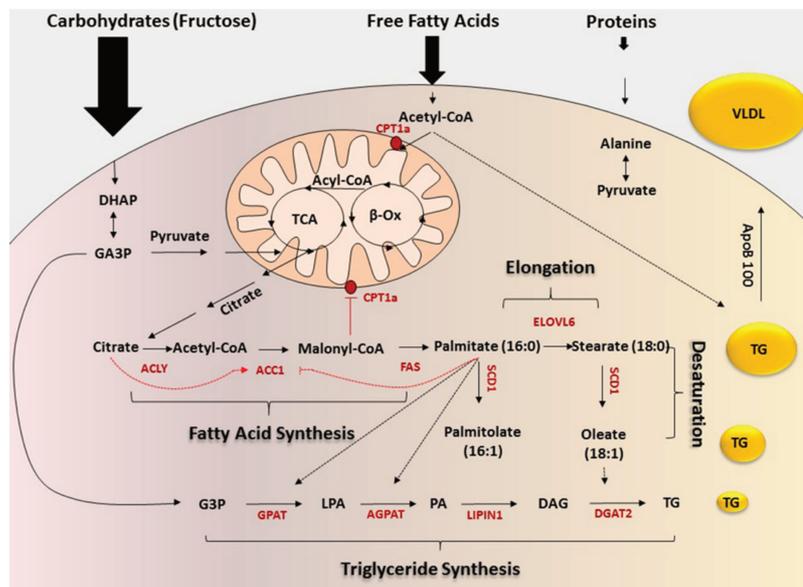


Figura 3. De novo lipogênese hepática

A figura, retirada de Softic et al., 2016, destaca as possíveis vias para a produção e exportação de triacilgliceróis nos hepatócitos. Em especial, há destaque para a de novo lipogênese, via de conversão de carboidratos (como a frutose) em ácidos graxos livres. A frutose entra na via glicolítica onde é transformada em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e piruvato. O GA3P é utilizado para síntese de glicerol e o piruvato é direcionado para a mitocôndria, onde é convertido em citrato no ciclo de Krebs (TCA). Em um balanço energético positivo, o citrato é transportado para o citosol, onde é convertido em Acetil-CoA por ação da ATP-citrato liase. Em seguida, o Acetil-CoA é convertido em Malonil-CoA por ação da Acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1). O Malonil-CoA inibe a entrada de ácidos graxos na mitocôndria através da inibição da CPT1A. A ácido graxo sintase (FAS) faz sucessivas reações de condensação entre o Malonil-CoA e Acetil-Coa para a produção do palmitato, que é posteriormente alongado, através da ação da ELOVL6, e dessaturado, através da ação da SCD1. Após o processamento, os ácidos graxos resultantes desse processo são incorporados ao glicerol pela atividade de GPAT, AGPAT, LIPIN1 e DGAT2, resultando nas moléculas de triacilglicerídeos (TG), que podem ser condensados a apolipoproteína B100 para exportação como very-low-density lipoprotein (VLDL).

A SCD1 é uma das enzimas responsáveis por inserir duplas ligações na cadeia carbônica de ácidos graxos. Como essa dupla ligação é inserida entre os carbonos 9 e 10 em relação a extremidade carboxila, essa enzima é denominada uma dessaturase Δ^9 . Sua atividade resulta na produção do palmitoleato (C16:1) e oleato (C18:1), a partir do palmitato (C16:0) e estearato (C18:0), respectivamente (ALJohani et al., 2017; Mauvoisin & Mounier, 2011). Tanto a sua atividade, quanto seus produtos são associados a regulação da gliconeogênese e DNL no fígado (ALJohani et al., 2017). Já a deficiência da SCD1 é relacionada a um aumento de atividade da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (Dobrzyn et al., 2004), proteína que estimula o catabolismo celular. Mecanicamente, a atividade de AMPK leva a inibição da ACC, o que resulta na diminuição da concentração de Malonil-CoA, aliviando a supressão da CPT1a e aumentando a β -oxidação. Portanto, a inibição de SCD1 parece ser uma estratégia eficiente para a diminuição da lipogênese e acúmulo de TAGs no fígado. Além disso, os próprios PUFAs ômega-3 podem inibir a ação da SCD1, seja por via direta ou mesmo pela inibição de SREBP1c e ChREBP. Camundongos obesos possuem alta expressão e atividade de SCD1 no fígado, enquanto camundongos que não expressam essa proteína são protegidos contra o acúmulo de gordura hepático induzido por dieta rica em frutose (ALJohani et al., 2017; Miyazaki et al., 2007).

Apesar da presença da dessaturase Δ^9 , os mamíferos não expressam dessaturase Δ^{12} e Δ^{15} , o que impede a síntese de PUFAs a partir do palmitato. Essas dessaturases são necessárias para a conversão do ácido oleico (C18:1) em ácido α -linolênico (ALA, C18:3), o precursor do EPA e DHA. Ainda sim, esses organismos expressam dessaturases Δ^5 e Δ^6 (chamadas FADS1 e FADS2, respectivamente) e elongases (ELOVL2 e ELOVL5), o que torna viável a síntese desses PUFAs a partir do ALA adquirido pela dieta (Castro et al., 2016; Wallis et al., 2002). Porém, essa conversão parece ser bastante limitada em humanos, tornando a dieta a principal fonte desses PUFAs (Arterburn et al., 2006; Rapoport et al., 2010; Wallis et al., 2002; Zhang et al., 2016). A baixa conversão pode ser explicada devido a maior parte do ALA ser direcionado para a β -oxidação e não para síntese de PUFAs (Zhang et al., 2016). No entanto, alguns estudos recentes desafiam a literatura clássica ao mostrarem que a baixa taxa de conversão reportada na maioria dos

estudos, seria devido a imediata captação do DHA pelos tecidos e não necessariamente por uma conversão ineficiente. Essa maior captação resultaria em variações plasmáticas próximas de zero, o que daria uma impressão errônea de que essa conversão acontece em taxas muito baixas (Metherel & Bazinet, 2019).

Apesar dessa suposta baixa conversão, existem algumas vias metabólicas propostas para esse processo. A via mais aceita é chamada de via Sprecher (Voss et al., 1991), o qual consiste em uma série de reações de alongação e dessaturação, mediadas por FADS1, -2 e ELOVL2, -5, que resultam na produção do ácido tetracosaeicoico (THA, C24:6). O THA, por sua vez, sofre a perda de dois carbonos, através β -oxidação perioxossomal, resultando na molécula de DHA (Figura 4, a esquerda). Essa via também atua na conversão ácido linoleico (C18:2) em ácido araquidônico (C20:4) (Figura 4, a direita).

Atualmente também tem se proposto outras vias para a produção do DHA, já que experimentos mostraram que células tratadas com EPA marcado isotopicamente mostram aumento de DHA antes do aumento de THA (Metherel & Bazinet, 2019), sugerindo que a produção de DHA ocorre antes da produção de THA e indicando uma conversão direta do EPA em DHA. Contudo a via mais aceita atualmente ainda continua sendo a via Sprecher, que é mostrada na **Figura 4**, a seguir.

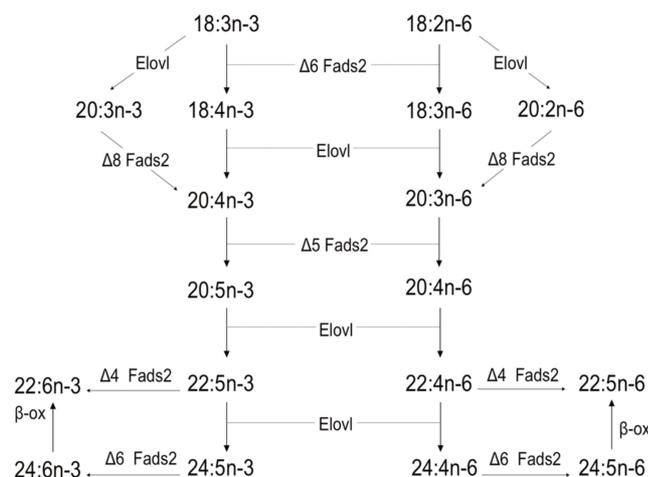


Figura 4. Via Sprecher

Via metabólica de conversão de ácido α -linolênico (C18:3, ALA) em ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) (esquerda). Também chamada de via Sprecher. Imagem adaptada de Oboh et al., 2017.

De maneira oposta a DNL, a β -oxidação tem como função oxidar ácidos graxos para a formação de Acetil-CoA e coenzimas reduzidas, como NADH e FADH₂. O Acetil-CoA formado entra no ciclo de Krebs para a formação de mais NADH e FADH₂. Em seguida, essas coenzimas reduzidas são reoxidadas pelos complexos (I, III e IV) componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, os quais utilizam a energia dessas reações para transportar prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (Herst et al., 2017). Esses prótons são utilizados como força motriz pelo complexo ATP-sintase (também chamado de complexo V) para a síntese de ATP a partir do ADP e íons fosfato (vias resumidas na **Figura 2**). Ao mesmo tempo, os elétrons adquiridos da reoxidação das coenzimas são transportados do complexo I ao complexo IV, que utiliza o oxigênio molecular comoceptor final desses elétrons. A cadeia transportadora de elétrons e a síntese de ATP são processos acoplados e ocorrem inteiramente nas mitocôndrias. Juntos, esses processos são chamados de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Chow et al., 2017).

O maior acúmulo de espécies lipídicas nos hepatócitos pode ocorrer tanto devido ao aumento da DNL, quanto pela diminuição da β -oxidação mitocondrial. Esse maior acúmulo pode levar a lipotoxicidade, que é o dano ou mesmo morte celular causada pelo excesso de lipídeos na célula (Ertunc & Hotamisligil, 2016; Hauck & Bernlohr, 2016; Marra & Svegliati-Baroni, 2018). Algumas espécies de lipídeos em particular, como os ácidos graxos saturados, ceramidas e diacilgliceróis, são especialmente correlacionados com a lipotoxicidade (Marra & Svegliati-Baroni, 2018). Eles podem levar ao estresse de retículo, maior produção de espécies reativas de oxigênio e dano mitocondrial, causando apoptose, piroptose e resistência a insulina (Kitade et al., 2017; Tilg et al., 2017).

Vale destacar que os hepatócitos possuem uma capacidade considerável de acúmulo de lipídeos, porém a lipotoxicidade é desencadeada quando esse acúmulo se torna exacerbado (Arab et al., 2018). A lipotoxicidade é dos principais fatores que levam a *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), doença bastante associada a outras doenças metabólicas, como a síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (Houten et al., 2016).

Um dos fatores que auxiliam a lipotoxicidade é o alto consumo de frutose, que estimula a DNL hepática e aumenta os níveis de lipídeos nos hepatócitos. Em indivíduos com a NAFLD, a contribuição da DNL hepática para o acúmulo de lipídeos no fígado é de 23%, enquanto em indivíduos saudáveis esse número é de apenas 5% (Softic et al., 2016). Por isso, existe a necessidade de se buscar meios para a diminuição da DNL hepática.

Devido ao que foi exposto, esse trabalho visa entender se o DHA age como uma lipocina liberada pelo WAT, durante a exposição ao frio, capaz de inibir a DNL hepática. A ideia do projeto se deu a partir de dados preliminares do grupo, os quais mostraram maiores níveis de DHA no fígado de camundongos expostos ao frio por 7 dias, enquanto os níveis desse PUFA se encontravam diminuídos nos tecidos adiposos desses animais. Esses dados eram acompanhados de uma menor expressão de *Scd1* e uma menor razão entre a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e saturados (SFA), o que nos sugeriu, inicialmente, que o DHA secretado pelo WAT estaria envolvido na diminuição da ação da SCD1 e, consequentemente, diminuição dos níveis de MUFA. No entanto, dados do trabalho mostraram que os TFs SREBP1c e ChREBP β são os alvos mais prováveis do aumento do DHA no fígado.

Para se entender como o aumento dos níveis de DHA hepático está relacionado com a diminuição de DHA no tecido adiposo, uma coorte de camundongos foi exposta ao frio por diferentes períodos. O intuito era verificar se o tempo de exposição em que ocorria o aumento de DHA no fígado coincidiria com o tempo da diminuição desse PUFA no tecido adiposo. Nesse experimento não só confirmamos nossa hipótese, como também descobrimos que a DNL hepática é estimulada em curtos períodos de exposição ao frio, de até mais ou menos 12 horas. Enquanto a após esse período, que coincide com o aumento de DHA, a DNL é fortemente inibida. Nós acreditamos que o DHA, secretado pelo tecido adiposo, seja responsável por essa inibição da DNL.

2. Hipótese

Nossa hipótese é que o frio possa regular negativamente a DNL hepática através do aumento dos níveis de DHA nesse tecido. Dados preliminares do grupo mostraram que há um aumento dos níveis de DHA no fígado em camundongos expostos ao frio por 7 dias. Esses dados eram acompanhados de diminuição no tecido adiposo perigonadal (pgWAT). Portanto, nossa hipótese é que esse DHA seja transportado do pgWAT, durante a lipólise estimulada pelo frio, para o fígado. O aumento de DHA seria responsável por inibir a DNL hepática, através da diminuição da atividade de ChREBP β e SREBP1c, e, como consequência, aumentando a β -oxidação mitocondrial no fígado.

Também consideramos a hipótese de que esse DHA seja direcionado para a síntese de fosfolipídios de membrana, já que esse órgão possui uma maior preferência para a síntese desses lipídeos de membrana que contenham o DHA na sua estrutura (Harayama & Riezman, 2018). Levamos isso em consideração, já que o BAT é capaz de sintetizar lipídeos de membrana mitocondrial durante a exposição ao frio (Sustarsic et al., 2018). No entanto, essa hipótese ainda não pôde ser testada.

3. Objetivos

O objetivo desse projeto é investigar se o DHA, liberado durante a lipólise, pode exercer um papel anti-lipogênico no fígado durante a termogênese. Para isso, camundongos machos C57BL6/J, alimentados com dieta padrão, foram expostos ao frio (4° C) por diferentes períodos. Os tecidos adiposos e fígado foram extraídos para análises de composição de NEFA, através do GC-MS, e de expressão gênica, com o RT-qPCR.

Outro objetivo do projeto é elucidar se o frio pode estimular a conversão de precursores de DHA, como o ácido α -linoleico (ALA, C18:3), em DHA. Para isso

avaliamos a expressão do RNA mensageiro (mRNA) da *Fads2*, enzima necessária durante a síntese de DHA (**Figura 4**).

4. Materiais e métodos

4.1. Exposição de camundongos ao frio

Camundongos de linhagem C57BL6/J com até 18 semanas de vida, obtidos do CEMIB – Unicamp, foram colocados, isoladamente, em uma câmara ambientada a 4° C por diferentes períodos. Em seguida, o fígado, tecido adiposo branco perigonadal, subcutâneo e tecido adiposo marrom foram coletados para análises

4.2. Composição das dietas utilizadas

Os camundongos foram alimentados com dieta padrão (chow diet) (NUVILAB CR-1®-Sogorb Inc) ou dieta hiperlipídica (Rhoster). A composição da dieta da Nuvilab contém 70% das calorias provindas de carboidratos, 20% de proteína e 10% de gordura. A dieta hiperlipídica contém 60% das calorias provindas de lipídeos, 20% de carboidratos e 20% de proteínas.

4.3. Análise de expressão gênica por Real Time-qPCR

A extração de RNA total de cada tecido foi realizada utilizando o TRIzol (ThermoFisher), clorofórmio e isopropanol como reagentes de extração. Primeiramente, as amostras eram homogeneizadas em Trizol (~500 uL) para seguida adição de clorofórmio (~100 uL). Após a mistura, as amostras eram centrifugadas em 12000 rpm e o sobrenadante obtido era coletado através de uma pipeta. Em seguida, adicionava-se isopropanol (~250 uL) ao sobrenadante para estimular a precipitação do RNA total e depois centrifugava-se mais uma vez para obter-se o RNA na forma de pellet. Em seguida, o isopropanol era removido e o pellet era lavado com álcool 70% e 100%. O RNA total extraído era quantificado e normalizado para concentrações entre 150 a 500 ng/uL. Após a normalização, utilizava-se de 500 a 1000 ng RNA para a reação de síntese cDNA, o qual foi realizada através do kit Mix da MultiScribe Reverse Transcriptase (ThermoFisher). O volume de reação foi de 10 uL. O ciclo de temperatura utilizado foi: 25° C por 10 min, 37° C por 2 horas e 85° C por 5 minutos. O termociclador utilizado foi o CFX96 da marca Bio-Rad. Ao fim dos ciclos, cada amostra foi diluída 20x (volume final de 200 uL) com água deionizada MilliQ. Para a reação do PCR, foram utilizadas 3 uL da solução de cDNA e 3 uL de SYBR Green Master Mix + Primers (forward e reverse) de cada gene (Tabela 1). Esses reagentes foram pipetados em placas de 384 poços, onde a fluorescência da sonda SYBR Green foi detectada no CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System da marca Bio-Rad.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados

Acaca - F	GATGAACCATCTCCGTTGGC
Acaca - R	GACCCAATTATGAATCGGGAGTG
Acly - F	ACCCTTTCACCTGGGGATCACA
Acly - R	GACAGGGATCAGGATTTTCCTTG
Arbp - F	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC
Arbp - R	TCGGGTCCTAGACCAGTGTTTC
Chrebp-a F	CGACACTCACCCACCTCTTC
Chrebp-a R	TTGTTTCAGCCGGATCTTGTC
Chrebp-b F	TCTGCAGATCGCGTGGAG
Chrebp-b R	CTTGTCCCGGCATAGCAAC
Cpt1a - F	CTCCGCCTGAGCCATGAAG
Cpt1a - R	CACCAGTGATGATGCCATTCT
Dgat2 - F	GCGCTACTTCCGAGACTACTT
Dgat2 - R	GGGCCTTATGCCAGGAAACT
Fasn - F	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
Fasn - R	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
Scd1 F	TTCTTGCGATACTCTGGTGC
Scd1 R	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
Ucp1-F	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT
Ucp1-R	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT

4.4. Análises dos perfis lipídicos por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (GC-MS)

As frações lipídicas dos tecidos foram extraídas a frio por meio da técnica de adaptada de Folch (Folch et al., 1987) e, posteriormente, esterificadas segundo o método proposto por Shirai, Suzuki e Wada (Shirai et al., 2005). A fração lipídica dos tecidos eram extraídas através de uma solução 2:1 de clorofórmio/metanol. Os lipídeos extraídos eram sujeitos ao processo de hidrólise pelo uso de uma solução fortemente básica (NaOH/metanol), o que resultou na produção de ácidos graxos livres não esterificados. Esses ácidos graxos foram submetidos a reações de metilação, através de uma solução contendo ácido sulfúrico e metanol, o que

produziu ésteres metilados dos ácidos graxos. Esses ésteres metilados eram suspensos em octanol para a injeção no aparelho de GC-MS. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu), utilizando coluna de sílica fundida Stabilwax (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 µm de espessura; Restek®). O gás hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,3 mL/min. Foi injetada 1 µL de amostra com taxa de divisão de 1:25. A temperatura do injetor era de 250 °C enquanto a programação de aquecimento do forno era iniciada a 80 °C com velocidade de aquecimento de 5 °C/min até 175 °C, seguido por uma taxa de aquecimento de 3 °C/min até 230 °C, sendo a temperatura mantida por 20 minutos. O espectrômetro de massa seguiu as seguintes condições: voltagem de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de ionização de 200 °C, modo de escaneamento completo com amplitude de 35-500 m/z com velocidade de 0,2 seg. por escaneamento.

4.5. Extração e quantificação de lipídeos totais em fígado e soro de camundongos

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

Para a quantificação, foi adicionado 2 uL de sobrenadante obtido na extração e 200 uL do reagente 1 do kit da labtest. Os primeiros poços da placa foram utilizados como branco da reação.

4.6. Consumo de oxigênio mitocondrial

Fígados de animais expostos ao frio foram analisados *post mortem* no respirômetro Oroboros Oxygraph-2k para avaliação do consumo de oxigênio de cada complexo mitocondrial. Após a exposição ao frio, o fígado dos animais era retirado e imediatamente colocados em tampão de pH 8. Em seguida, esse fígado era cortado em pedaços menores para posterior pesagem e aplicação no Oroboros. Cada droga administrada no equipamento teve como objetivo estimular ou inibir a atividade de algum complexo mitocondrial (I, II e IV). Primeiramente, ADP + GMP (glutamato, malato e piruvato) tiveram como objetivo estimular o complexo I. Em seguida, o FCCP teve como função desacoplar a cadeia respiratória com a produção de ADP, levando a respiração mitocondrial, teoricamente, ao seu máximo. A rotenona inibiu o complexo I. O succinato, como substrato do complexo II, estimula sua atividade máxima, enquanto a antimicina A (AA) inibe o complexo III. Por último a mistura de Ascorbato + TMPD (N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenediamina) estimula a máxima atividade do complexo IV. Assim, foi possível estimar a atividade máxima de cada um dos 3 complexos propostos.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no programa Graphpad Prism 8.4. Para experimentos com apenas uma variável, como tempo de exposição ao frio, foi utilizado o teste One-Way ANOVA com post hoc Tukey. Já para experimentos com duas variáveis, como exposição ao frio e tipo de dieta, utilizou-se o teste Two-Way ANOVA. Para experimentos comparando apenas 1 variável entre 2 grupos, foi utilizado teste t de Student.

5. Resultados

5.1. Resultados preliminares 1: O frio induz aumento dos níveis de DHA no fígado e diminuição nos tecidos adiposos

Os dados preliminares mostraram que os níveis de DHA no fígado de camundongos expostos ao frio, por 7 dias, se encontravam aumentados em relação aos seus controles não expostos (**Figura 5A**). Ao mesmo tempo, foi observado uma diminuição desse PUFA nos tecidos adiposos (**Figura 5B**), em especial no pgWAT (**Figura 5C**) e no BAT (**Figura 5D**). Como o DHA pode ser armazenado no WAT (Lin & Connor, 1990), esses dados nos sugeriram que ele possa ser transportado do pgWAT e BAT para o fígado durante a exposição ao frio. Também foi observada uma diminuição de ALA, o precursor metabólico do DHA, no subWAT (**Figura 5B**) e pgWAT (**Figura 5C**), o que indica uma possível conversão de ALA em DHA, através da via Sprecher, previamente à liberação do DHA pelos tecidos adiposos.

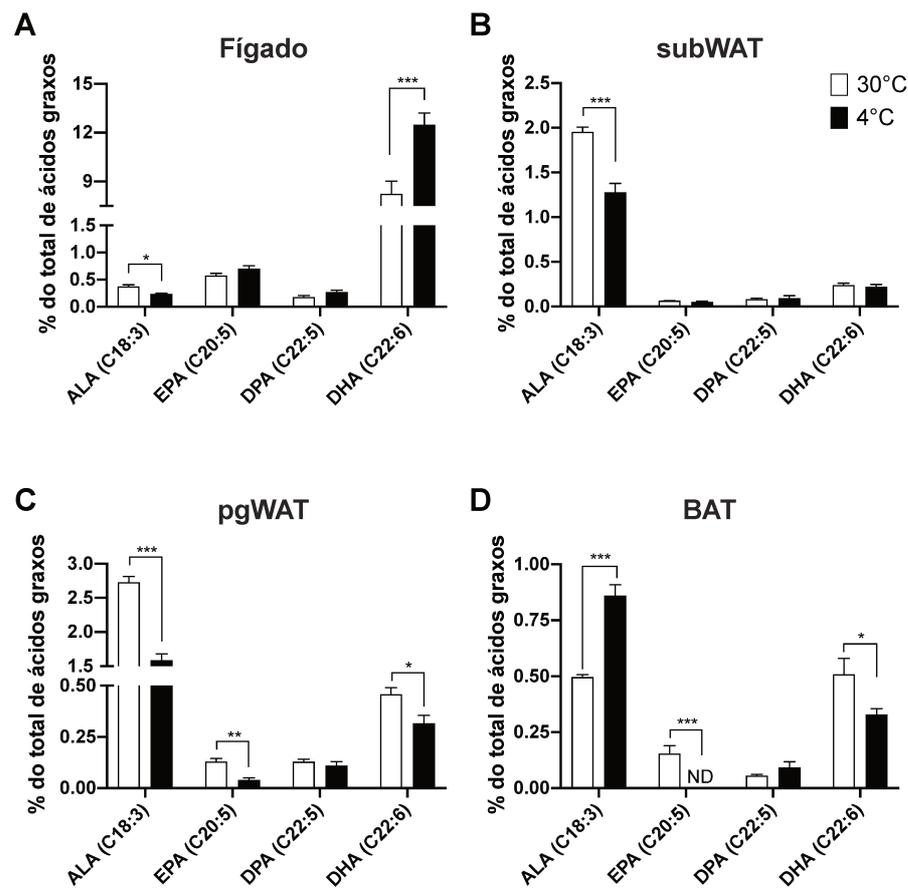


Figura 5. O frio induz um aumento de DHA no fígado e diminuição de ALA e DHA nos tecidos adiposos

Dados foram obtidos a partir da análise dos tecidos extraídos de camundongos expostos ao frio (4°C) por 7 dias através da técnica de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS).

A) Fígado

B) Tecido adiposo branco subcutâneo (subWAT)

C) Tecido adiposo branco perigonadal (pgWAT)

D) Tecido adiposo marrom (BAT).

Para cada ácido graxo, o número entre parêntese indica o número de carbonos e a quantidade de duplas ligações presente na cadeia carbônica. Assim ALA (C18:3) denota um ácido graxo com 18 carbonos e 3 duplas ligações (ou insaturações)

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ baseado no teste t de student.

5.2. Resultados Preliminares 2: O aumento DHA parece estar relacionado com a inibição de *Scd1* e menor grau de dessaturação no fígado

Como o DHA possui capacidade bem documentada de inibir a transcrição de *Scd1* no fígado (Mauvoisin & Mounier, 2011), foi sugerido que os maiores níveis desse PUFA pudessem diminuir o grau de dessaturação nesse tecido através da inibição da expressão de *Scd1*. O grau de dessaturação é mensurado pela razão MUFA/SFA, que é uma medida indireta da atividade da SCD1. No fígado, ação dessa enzima é associada com a maior síntese de TAG, acúmulo de gordura e obesidade (Jeyakumar et al., 2009).

Os dados obtidos a partir da GC-MS, mostraram uma menor razão MUFA/SFA (**Figura 6A**) no fígado dos animais expostos ao frio por 7 dias. Por outro lado, essa razão se encontrou aumentada nos tecidos adiposos desses animais (**Figuras 6B, 6C e 6D**). Como a razão MUFA/SFA é resultado da atividade de SCD1, mediu-se a expressão desse gene através do RT-qPCR. Os resultados corroboraram com as razões MUFA/SFA obtidas, já que observamos uma menor expressão gênica de *Scd1* no fígado (**Figura 6E**). De maneira oposta, nos tecidos adiposos (**Figuras 6E, 6F e 6G**), a expressão de *Scd1* mostrou-se aumentada.

Esses resultados nos indicaram que os maiores níveis de DHA hepáticos poderiam estar associados a menor lipogênese nesse órgão através da inibição de SCD1. Enquanto nos tecidos adiposos, a diminuição do DHA estaria associada a um estímulo a lipogênese pelo aumento de ação de SCD1.

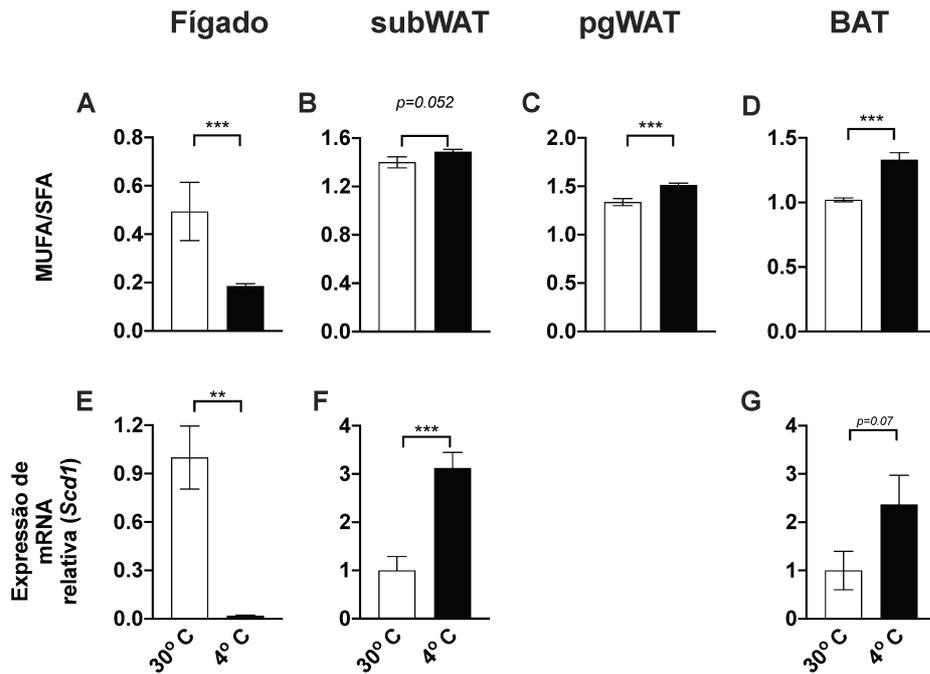


Figura 6. O aumento de DHA no fígado parece induzir uma diminuição da razão MUFA/SFA através da diminuição da transcrição de Scd1

A, B, C e D) Razão MUFA/SFA obtida através da GC-MS **A)** Fígado **B)** subWAT **C)** pgWAT **D)** BAT.

E, F e G) Expressão relativa de mRNA referente ao gene Scd1 **E)** Fígado **F)** subWAT **G)** BAT.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ baseado no teste t de student.

5.3. O tempo necessário para o aumento de DHA no fígado coincide com o tempo necessário para a diminuição de ALA no tecido adiposo

Considerando a possibilidade do aumento de DHA no fígado e diminuição nos tecidos adiposos serem processos interconectados, realizamos um experimento em que grupos de camundongos eram expostos ao frio por diferentes períodos (experimento *time course*). O intuito era verificar se o período em que ocorre o aumento de DHA coincide com o período em que ocorre a diminuição de DHA e/ou ALA nos tecidos adiposos e com as mudanças na razão MUFA/SFA observadas nos experimentos preliminares. Os tempos escolhidos, além dos 7 dias, foram 12 horas, 3 dias, 5 dias.

A partir do experimento, foi possível confirmar que, mesmo em diferentes condições dos experimentos preliminares, houve o aumento dos níveis de DHA no fígado (**Figura 7A**). Observamos que esse aumento foi significativo ($p < 0.001$) nos animais expostos por 3 dias ao frio em relação aos controles não expostos. No pgWAT, houve diminuição de 11% de ALA (C18:3), mas sem diferença significativa (**Figura 7B**). No entanto, essa diminuição se tornou significativa ($p < 0.0001$) no quinto e sétimo dia de exposição, o que reforçou a possibilidade de conversão do ALA para DHA no pgWAT.

Ademais, também confirmamos a relação entre as menores razões MUFA/SFA e os níveis de DHA, os quais diminuíram a partir do terceiro dia e que também mantiveram-se nos períodos seguintes (**Figura 7C**). No entanto, não confirmamos os mesmos resultados dos experimentos preliminares dessa razão no pgWAT (**Figura 7D**). O resultado mostrou apenas um aumento da razão em 12 horas de exposição e não se manteve nos períodos seguintes (**Figura 7D e 7E**).

A menor razão MUFA/SFA observada no fígado provavelmente ocorreu devido a diminuição da contribuição relativa de oleato (C18:1) e um aumento expressivo (de 43%, $p < 0.0001$) de estearato (C18:0) (**Figura 7E**). Assim, esses resultados sugeriram, mais uma vez, a relação entre a quantidade de DHA no

fígado e a diminuição da ação de SCD1, como observado nos experimentos preliminares.

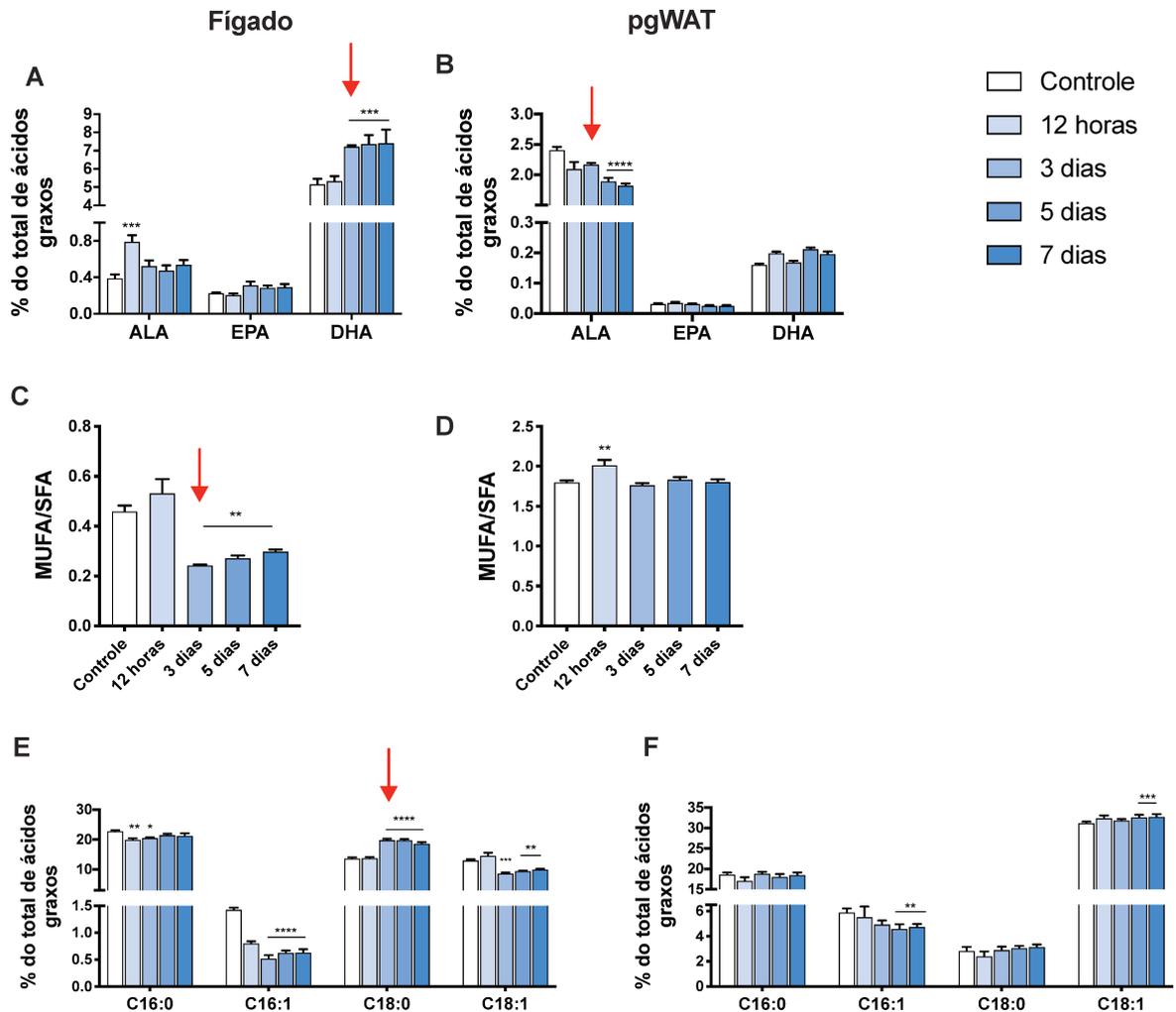


Figura 7. Composição porcentual de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo perigonadal dos camundongos expostos ao frio no experimento time course

A e B) Ácidos graxos poli-insaturados A) Fígado B) pgWAT

C e D) Ácidos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) C) Fígado D) pgWAT

E e F) Razão MUFA/SFA E) Fígado e F) pgWAT

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$, baseado no teste One-Way ANOVA e post hoc Tukey.

5.4. O aumento de DHA no fígado pode estar associado a diminuição da DNL nesse órgão

Como observamos que o aumento de DHA no fígado estava associado temporalmente com a diminuição da razão MUFA/SFA, investigamos a possibilidade do envolvimento do aumento de DHA na menor expressão de *Scd1* nos animais do experimento *time course*. Ademais, como o DHA pode inibir não só a transcrição de *Scd1*, como também a transcrição de outras enzimas e fatores de transcrição ligados a DNL (Dentin et al., 2005; Y. Wang et al., 2015), medimos a expressão gênica de *Scd1*, *Sreb1*, *Chrebp α* , *Chrebp β* , *Fatty acid synthase (Fasn)* e *Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2)*. A intenção era verificar se os aumentos de DHA também coincidiam temporalmente com uma diminuição na expressão desses genes.

Os resultados mostraram que alguns desses genes seguiram um perfil de expressão bifásico (**Figura 8A**). Sendo que em 12 horas de exposição, ocorreu um aumento significativo ($p < 0.05$) da expressão de *Fasn*, *Chrebp β* e *Dgat2*. Enquanto a partir do terceiro dia de exposição, ocorreu diminuição da expressão de todos os genes da DNL (**Figura 13D**), seja em relação ao controle não exposto ao frio, seja em relação a 12 horas de exposição.

Em 12 horas de exposição ao frio, houve um aumento de 2,4 vezes na expressão relativa *Chrebp β* em relação aos controles não expostos. Já *Fasn* e *Dgat2* o aumento foi de 91% e 29%, respectivamente. Isso indica um aumento de DNL estimulada pela atividade de *Chrebp β* em curtos períodos de tempo. No entanto, nesse mesmo período, houve diminuição da expressão de *Sreb1* e *Scd1*, em 24% e 72% respectivamente.

A partir do terceiro dia de exposição, período em que há o aumento de DHA no fígado, o padrão do perfil de expressão adquire grande diferença (**Figura 8A**). A expressão de todos os genes diminui ou pelo menos voltam aos níveis dos controles não expostos ao frio. No caso dos genes que sofreram aumento em 12 horas de exposição, como *Fasn*, *Chrebp β* e *Dgat2*, observamos uma tendência ao

retorno nos níveis do controle. Enquanto a expressão de genes que não mostraram aumento em 12 horas de exposição, como *Scd1* e *Srebf1*, continuaram a diminuir. A expressão de *Scd1* diminuiu significativamente ($p < 0.001$), o que justificaria a diminuição de MUFA/SFA observada a partir do terceiro dia. Já a expressão de *Srebf1*, também em queda, chegou a uma diminuição de 50% no quinto dia de exposição.

O aumento da expressão de *Chrebp β* e diminuição de *Srebf1* no fígado parece, a princípio, paradoxal, visto que a expressão desses fatores de transcrição costuma estar associada devido ao metabolismo da glicose e a secreção de insulina serem processos fortemente conectados (Linden et al., 2018; Ridgway & McLeod, 2015; Y. Wang et al., 2015). Contudo, uma possível explicação para esse fenômeno é a sinalização de hormônios tireoidianos nos hepatócitos.

Como já mostrado na literatura, esses hormônios podem estimular a expressão de *Chrebp β* e inibir a de *Srebf1* (Hashimoto et al., 2006, 2009; Sinha et al., 2018). Além disso, eles possuem papel fundamental durante a exposição ao frio (De Jesus et al., 2001; Oppenheimer et al., 1991; Sinha et al., 2018). Com isso, sugerimos que eles seriam os responsáveis por essa dissociação entre a expressão de *Chrebp β* e *Srebf1* em curtos períodos de tempo de exposição ao frio. Outra explicação possível, é ação da recém descoberta Neuregulina 4 (NRG4) sob o fígado (G. X. Wang et al., 2014). Essa proteína é secretada pelo BAT em pequenos períodos de exposição ao frio em camundongos (cerca de 4 horas de exposição) e age nos hepatócitos inibindo apenas a transcrição de *Srebf1*, sem qualquer efeito sob a expressão de *Chrebp β* .

Além da expressão gênica, também medimos a quantidade total de TAGs no fígado, que é um parâmetro relacionado com maior captação e/ou produção de TAGs no fígado. Essa medida poderia indicar se as variações da expressão gênica da DNL resultariam em algum impacto para o acúmulo de TAGs no fígado. Isso porque muitas vezes ocorre aumento da expressão de um gene sem que isso resulte em um aumento líquido da expressão/atividade da proteína efetora. Ou seja, os processos de transcrição e tradução de um gene/mRNA podem ser desacoplados

graças aos diferentes mecanismos de regulação que existem entre a expressão de um gene/mRNA até o aumento da atividade de uma proteína.

Em relação as medidas de TAGs total no fígado, os resultados indicaram que houve um aumento de 16% ($p < 0.01$) na concentração de TAGs no fígado dos animais expostos por 12 horas ao frio (**Figura 8B**). A concentração de TAGs aumentou de 348,14 mg/dL, do controle, para 404,71 mg/dL, em 12 horas de exposição. Isso mostrou que o aumento da expressão de *Chrebpβ*, *Fasn* e *Dgat2* pode ter resultado em um aumento real da DNL hepática. Após as 12 horas de exposição, como esperado, a diminuição da expressão de todos os genes resultou em diminuição da concentração de TAGs no fígado, que voltou a valores próximos aos dos controles não expostos ao frio, ficando ao redor de 357,88 mg/dL. Esse resultado mostrou que as variações na expressão de genes da DNL podem ter se correlacionado bem com as variações reais da taxa de DNL. Além disso, a diminuição do acúmulo de TAGs coincidiu temporalmente com o aumento de DHA, sugerindo, mais uma vez, a participação desse PUFA na diminuição de DNL no fígado.

Já foi reportado na literatura que em períodos de 4 horas de exposição ao frio, o fígado aumenta a quantidade de TAGs como consequência da lipólise do WAT (Heine et al., 2018). Porém, nossos dados sugerem que a DNL hepática também contribui para esse fenômeno.

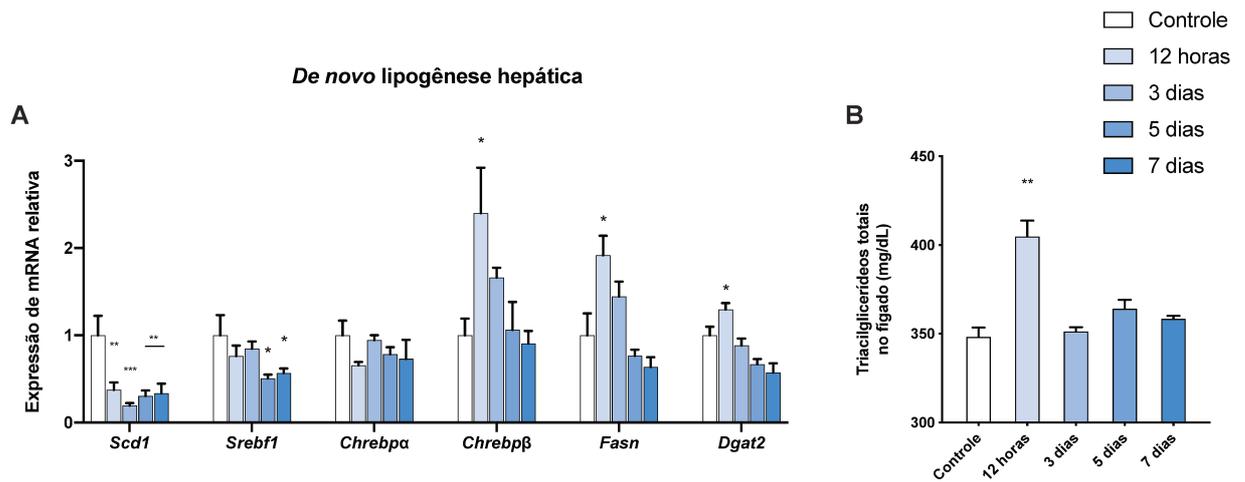


Figura 8. O aumento de DHA no fígado pode estar relacionado com a diminuição da expressão de genes da DNL e com o menor acúmulo de TAGs nesse órgão

A) Expressão de mRNA relativa (normalizados por 36b4) de genes da DNL

B) Triacilglicerídeos totais no fígado

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, baseado no teste One-Way ANOVA e post hoc Tukey.

5.5. O frio induz o aumento de expressão gênica de *Fads2* no tecido adiposo perigonadal

Como observamos uma diminuição de ALA no tecido adiposo e aumento de DHA no fígado, nos perguntamos se poderia haver maior síntese de DHA no pgWAT dos animais expostos ao frio. Por isso, medimos a expressão gênica de *Fads2* tanto no fígado quanto no pgWAT. A intenção era verificar se haveria um aumento de expressão no pgWAT e descartar uma possível conversão no próprio fígado.

Assim, comparando a expressão nos dois tecidos analisados, pudemos observar que a expressão de *Fads2* apresentou aumento apenas no pgWAT. O aumento de expressão se tornou significativo ($p < 0.01$) a partir do terceiro dia de exposição, que se tornou ainda maior no quinto e sétimo dia de exposição ($p < 0.001$). Com isso, houve correlação temporal com os aumentos de DHA observados no fígado. A partir desses resultados, pudemos adquirir maior embasamento para a hipótese dessa conversão de ALA em DHA no pgWAT.

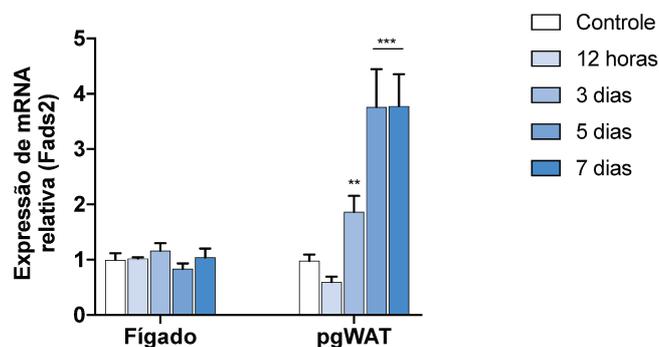


Figura 9. O frio induz a expressão gênica de *Fads2* no tecido adiposo perigonadal (pgWAT)

Expressão de *Fads2* no fígado e pgWAT dos camundongos do experimento time course.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$, baseado no teste One-Way ANOVA e post hoc Tukey.

5.6. Conclusão parcial do experimento *time course*

O experimento em *time course* não só confirmou nossos dados preliminares de aumento de DHA no fígado, como ainda mostrou uma interconectividade consistente entre os níveis de DHA no fígado e ALA no pgWAT. Os resultados mostraram que o transporte de DHA para o fígado acontece a partir do terceiro dia de exposição ao frio, mesmo período em que ocorre a diminuição de ALA no pgWAT. Isso sugere uma conversão prévia de ALA em DHA no tecido adiposo para futura exportação ao fígado. Essa hipótese foi reforçada devido ao aumento da expressão de *Fads2* no pgWAT. Adicionalmente, o aumento de DHA no fígado parece ser a causa da diminuição da DNL hepática, tendo como consequência a diminuição da concentração de TAGs nesse órgão.

Curiosamente, nossos experimentos também mostraram que a exposição ao frio não apenas diminui a DNL e o acúmulo de TAGs no fígado, como também aumenta a DNL e o acúmulo de TAGs em períodos curtos de exposição, já que foi observado um aumento da expressão de genes da DNL e maiores concentrações de TAGs no fígado de animais expostos ao frio por 12 horas. Com isso, a partir dos experimentos realizados até então, podemos concluir que o frio estimula uma resposta lipogênica bifásica no fígado dependente da concentração de DHA nesse órgão.

Em períodos agudos de exposição, há aumento de DNL e acúmulo de TAGs, mediado principalmente por ChREBP β (**Figura 10A**). Enquanto na exposição crônica ocorre um retorno da DNL e da concentração de TAGs aos níveis do controle (**Figura 10B**), processo que parece ser mediado pela inibição de ChREBP β e SREBP1c através dos aumentos dos níveis hepáticos de DHA.

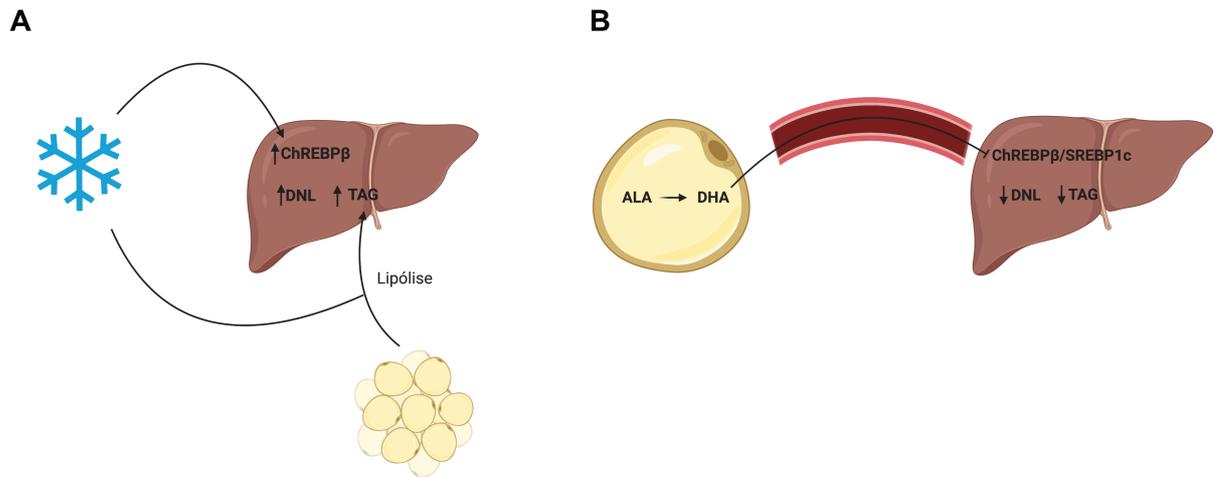


Figura 10. Conclusão parcial do experimento *time course*

A) Em até 12 horas de exposição ao frio a DNL hepática é estimulada por ação do fator de transcrição ChREBP β . Esse processo, em conjunto com a lipólise do WAT, resulta em um maior acúmulo de TAGs no fígado.

B) Após as 12 horas de exposição, ocorre diminuição da transcrição de ChREBP β e SREBP1c, que resulta em diminuição do acúmulo de TAGs no fígado. Acreditamos que essa diminuição das atividades desses fatores de transcrição seja mediada pelo aumento de DHA. Esse DHA é previamente sintetizado no pgWAT pela ação da FADS2 sob o ALA.

Figuras criadas no BioRender.com

5.7. O transporte de DHA, induzido pelo frio, parece estimular a atividade mitocondrial hepática

Como nossos dados até agora sugeriram uma diminuição da DNL pelo aumento dos níveis de DHA no fígado, nossa nova hipótese foi que essa diminuição da DNL diminuiria a concentração de Malonil-CoA nos hepatócitos, o que aumentaria a β -oxidação mitocondrial através do aumento de atividade de CPT1a.

Para testarmos essa hipótese, medimos o consumo de O_2 em biopsias de fígado de animais expostos ao frio nos dois períodos de grandes diferenças no perfil de expressão de genes da DNL: 12 horas e 3 dias. A intenção era observar se haveria diminuição do consumo de O_2 em 12 horas, devido a maior DNL nesse período, e aumento desse consumo em 3 dias de exposição, tempo em que houve aumento da concentração de DHA no fígado e menor DNL.

A partir dos resultados, foi possível observar que o consumo de O_2 pelos complexos I (pico ADP + GMP), II (succinato) e IV (Asc + TMPD) se mostrou diretamente proporcional ao tempo de exposição ao frio (**Figura 11A**). Primeiramente, o consumo de O_2 basal já mostrou alguma tendência, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos nessa situação. Em seguida, o complexo I, estimulado por ADP e glutamato, malato e piruvato (GMP), indicou, como afirmado anteriormente, que o consumo de O_2 é diretamente proporcional ao tempo de exposição. Porém, não observamos um menor consumo de oxigênio em 12 horas de exposição, o que se correlacionaria com maior expressão de genes da DNL nesse tempo (**Figura 8A**) e, teoricamente, a maior concentração de Malonil-CoA. Já em 3 dias de exposição, houve aumento do consumo de O_2 , como esperado (**Figura 7A**).

A tendência de aumento do consumo de O_2 com maior tempo de exposição é seguida pelo demais complexos. O complexo II, estimulado com succinato, mostra diferença estatística no consumo de oxigênio apenas em 3 dias de exposição, enquanto o complexo IV, estimulado com ascorbato (Asc) e TMPD, mostra a mesma tendência, porém sem diferença estatística entre os grupos.

Para dar força a nossa hipótese de maior atividade mitocondrial, medimos a expressão de genes da β -oxidação (*Cpt1a*, *AcadVL*, *AcadL*) e OXPHOS (*Cox5b*). Com isso, encontramos a mesma tendência observada no consumo de oxigênio: expressão gênica diretamente proporcional ao tempo de exposição ao frio (**Figura 11B**). A partir desses resultados, não foi possível considerar que a maior transcrição de genes da DNL esteja ligada a diminuição da atividade mitocondrial, já que não observamos queda no consumo de O_2 , nem da expressão de genes da β -oxidação no período de 12 horas.

A partir desse resultado, consideramos também a possibilidade de que a maior atividade mitocondrial esteja associada a ativação dos receptores nucleares PPAR α e não somente aos menores níveis de Malonil-CoA na célula. Isso porque o maior consumo de O_2 foi observado apenas no período de 3 dias, o mesmo período que houve aumento de DHA hepático, sugerindo que o DHA possa estar por trás da ativação desse receptor nuclear (Jump et al., 2013). A maior ativação de PPAR α leva ao aumento da transcrição de genes da β -oxidação, o que poderia explicar o aumento de transcrição de *Cpt1a*, *AcadL*, *AcadVL* e do consumo de O_2 mitocondrial em 3 dias de exposição ao frio. Como em 12 horas de exposição ao frio ainda não há aumento DHA no fígado, não haveria ativação de PPAR α .

Além disso, o aumento do consumo de oxigênio pode estar associado à maior biogênese de mitocôndrias no fígado ou mesmo a maior atividade da β -oxidação e OXPHOS nas mitocôndrias já existentes, o que devemos confirmar através de ensaios futuros. Esses resultados indicam que o DHA transportado ao fígado pode estar correlacionado com o aumento das vias oxidativas mitocondriais durante a exposição ao frio pela ativação de PPAR α . No entanto, devido a número de amostras serem baixos ($n = 3 - 4$) no experimento com o Oroboros, devemos realizar mais experimentos para confirmar esse dado.

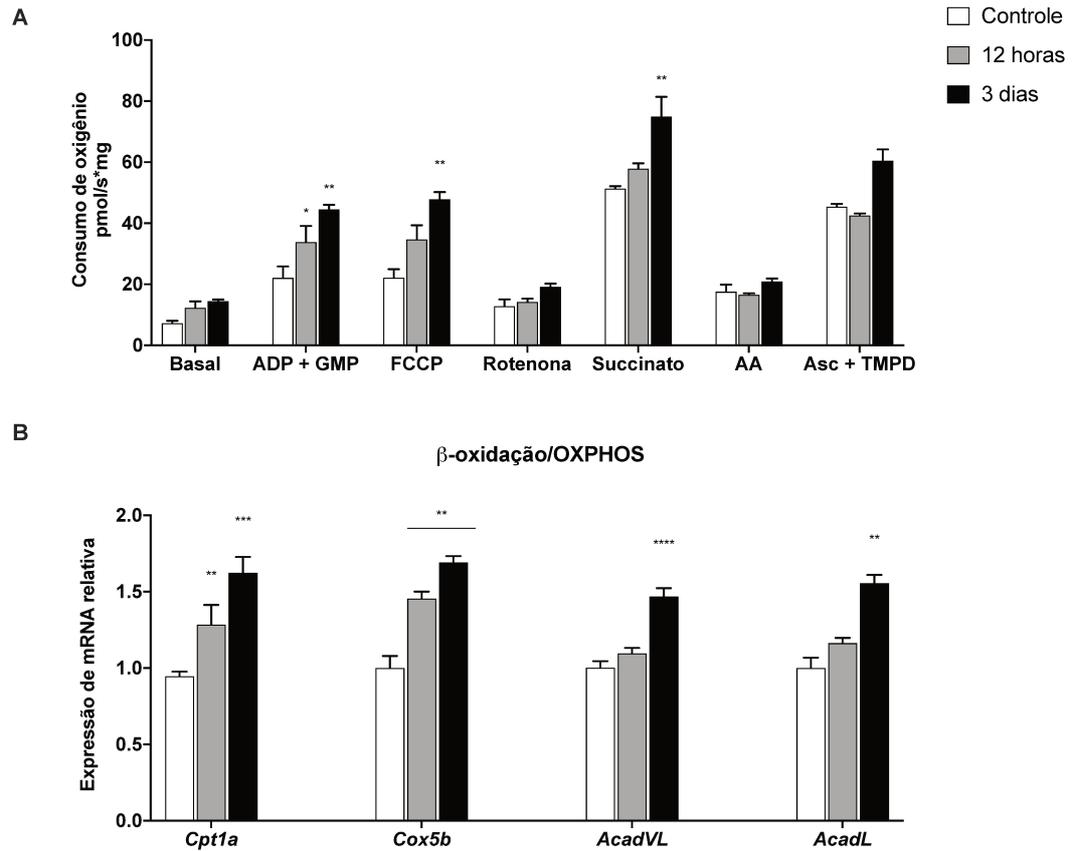


Figura 11. Os maiores níveis de DHA hepático levam a um aumento do consumo de oxigênio mitocondrial

A) Consumo de oxigênio em biopsia de fígado de camundongos expostos ao frio por 12 horas ou 3 dias. Dados obtidos através da técnica de respirometria (Oroboros).

B) Expressão de genes relativos à β -oxidação e fosforilação oxidativa.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, baseado no teste One-Way ANOVA e post hoc Tukey.

5.8. Camundongos obesos são resistentes ao transporte DHA para fígado

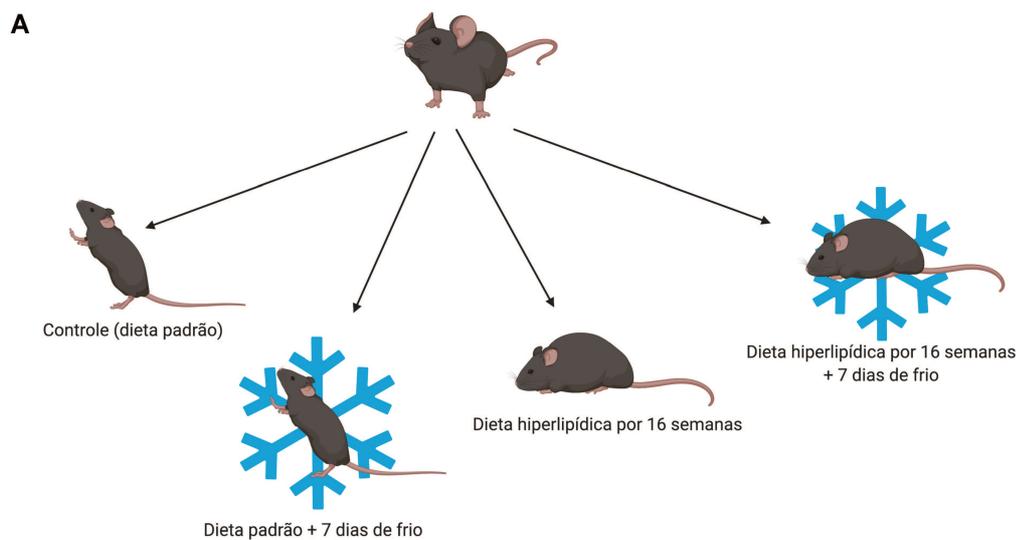
Como a DNL contribui de maneira significativa para o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos em pacientes e em camundongos obesos (Softic et al., 2016), investigamos a possibilidade do frio poder reverter esse acúmulo pela regulação negativa dessa via através dos aumentos dos níveis de DHA no fígado. Para isso, uma nova coorte de camundongos foi induzida a obesidade através do consumo de uma dieta hiperlipídica contendo 60% de gordura (*high-fat diet*, HFD), onde parte dessa coorte foi exposta a 4° C por 7 dias. Assim, ao início do experimento, possuíamos 4 grupos: controle com dieta padrão, controle com HFD, controle com dieta padrão + 7 dias de frio e dieta hiperlipídica + 7 dias de frio (**Figura 12A**). A dieta hiperlipídica foi administrada por 16 semanas. Como anteriormente, realizamos as análises de expressão gênica e perfil lipídico dos tecidos adiposos e do fígado desses animais.

Nossos experimentos mostraram que os animais obesos parecem não sofrer o remodelamento lipídico capaz de aumentar os níveis de DHA hepático. Camundongos e humanos obesos possuem menores níveis de PUFAs em seu fígado (Puri et al., 2009), o que confirmamos através da GC-MS, o qual mostrou que a quantidade de ALA e DHA é menor tanto no fígado (**Figura 12B**), quanto no pgWAT e BAT (**Figuras 12H e 12K**) dos camundongos obesos. O frio não foi capaz de causar alteração no nível desses PUFAs ômega-3. Além disso, a quantidade de oleato na dieta causou forte alteração do perfil de ácidos graxos, fazendo com que a quantidade desse MUFA fosse maior em todos os tecidos analisados (**Figuras 12C, 12I e 12L**), o que resultou em aumento de MUFA/SFA (**Figura 12D**) e TAG totais (**Figura 12F**) no fígado desses animais. Não houve diferença na quantidade de TAG entre os grupos (**Figura 12G**) independente da dieta ou exposição ao frio.

O RT-qPCR também mostrou que o frio pode diminuir apenas a expressão de *Scd1* no fígado (**Figura 12E**). Porém, isso não se traduziu em diminuição de oleato nesse órgão. Isso mostra que o oleato obtido através da dieta pode compensar a menor produção hepática desse ácido graxo. Animais e humanos

obesos também possuem um aumento da DNL hepática (Softic et al., 2016), o que pudemos confirmar nos nossos experimentos. Os resultados mostraram maiores expressão de *Chrebpβ* e *Srebf1* e infelizmente, o frio também não foi capaz de diminuir a expressão deles (**Figura 12E**).

Com isso, os dados sugerem que camundongos obesos são incapazes de transportar o DHA até o fígado para supressão da lipogênese. Isso pode ser devido ao lipidoma desses animais já ser bastante alterado, o que causa uma maior resistência a alterações metabólicas causadas pelo frio.



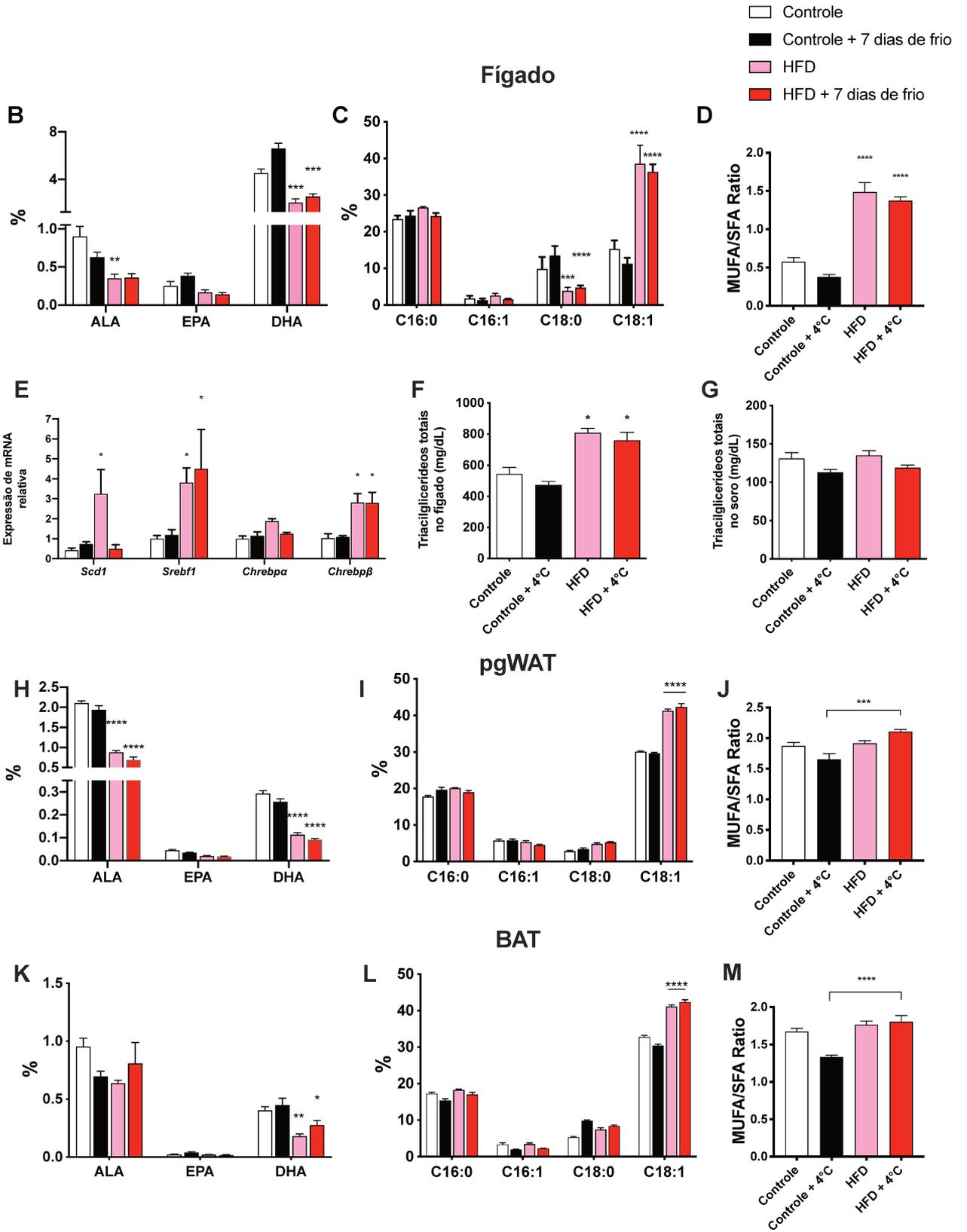


Figura 12. Camundongos submetidos a dieta hiperlipídica não transportam o DHA para o fígado

Análises moleculares de fígado de camundongos C57BL6/J quando submetidos a uma dieta rica em gordura (por 16 semanas) e/ou são expostos a 4° C por 7 dias. (n = 5 – 7)

A) Metodologia de tratamento dos camundongos. Figura criada no BioRender.com

B, H e K) Composição relativa de ácidos graxos ômega 3 B) Fígado H) Tecido adiposo branco perigonadal (pgWAT). K) Tecido adiposo marrom (BAT).

C, I e L) Composição relativa de ácidos graxos saturados (Palmitato C16:0 e Estearato C18:0) e monoinsaturados (Palmitoleato C16:1 e Oleato C18:1) C) Fígado I) pgWAT L) BAT.

D, J e M) MUFA/SFA ratio. Razão entre a quantidade relativa de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos saturados D) Fígado J) pgWAT M) BAT.

E) Análise da expressão de genes associados a DNL hepática através de RT-qPCR. A expressão de cada gene foi normalizada por 36b4.

F) Triglicerídeos totais no fígado.

G) Triglicerídeos totais no soro.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 baseado no teste Two-Way ANOVA.

5.9. Determinação da temperatura do grupo controle: termoneutralidade (30° C) versus temperatura ambiente (22° C)

Os experimentos realizados até o momento utilizaram a termoneutralidade (~ 30° C) ou a temperatura ambiente do biotério (~ 22° C) nos camundongos do grupo controle. Inicialmente, pretendíamos utilizar sempre os animais desse grupo em termoneutralidade, já que os experimentos preliminares foram conduzidos com os controles nessa temperatura. No entanto, isso dependia da disponibilidade de uma câmara climática, o que não tivemos acesso nos experimentos em *time course*. Devido a isso, esses experimentos foram conduzidos em animais em temperatura ambiente do biotério como grupo controle.

Quando foi possível o acesso a câmara climática, comparamos as duas temperaturas utilizadas como controle (30 e 22° C) com o grupo exposto a 4° C (**Figura 13A**). A intenção era verificar se haveria diferença significativa entre a indução da expressão de genes da DNL e da OXPHOS entre as duas temperaturas, e selecionar qual delas seria mais adequada para os próximos experimentos. O tempo de exposição foi escolhido foi de 3 dias, o menor tempo necessário para que houvesse aumento significativo de DHA hepático.

Os dados obtidos mostram que a exposição a 22° C já é responsável por causar parte da diminuição da expressão de genes da DNL (**Figura 13B**). A expressão relativa de *Sreb1* caiu 33% em 22° C em relação ao controle em termoneutralidade, já *Scd1* mostrou uma diminuição de 52%. Apesar de não haver diferença estatística, *Fasn* mostrou uma diminuição de 36% em 22° C, seguindo as tendências observadas nas expressões de *Sreb1* e *Scd1*. Em 4° C, como esperado, todos esses genes mostraram diminuição, mostrando mais uma vez que o frio inibe a transcrição de genes da DNL hepática. Já os genes envolvidos na OXPHOS (*Cox7a2*, *Cox8b*, *Uqcrc1* e *Cox5b*) não mostraram alteração significativa de sua expressão em 22° C em relação a 30° C (**Figura 13B**), o que sugeriu que qualquer uma dessas temperaturas pode ser utilizada no grupo controle para as medidas de expressão de OXPHOS e possivelmente de consumo de O₂.

Já nos tecidos adiposos (subWAT, pgWAT e BAT) a tendência não se mostrou tão clara quanto no fígado. No subWAT (**Figura 13C**), as expressões dos genes utilizados, UCP1, *Fasn*, *Scd1* e *Chrebpβ*, mostraram aumento significativo ($p < 0.001$) apenas em 4° C. No pgWAT, o qual substitui-se apenas *Ucp1* por *Pnpla2* (ATGL, lipólise), houve um aumento significativo ($p < 0.5$) já em 22° C para a maioria desses genes. Essa tendência também foi observada no BAT (**Figura 13E**). No entanto, tanto no subWAT como no BAT, as diferenças se tornam bem mais significativas em 4° C, sugerindo que a diferença entre a termoneutralidade e a temperatura ambiente do biotério pode ser negligenciada para esses tecidos.

Um aspecto curioso dos resultados é o aumento da expressão de genes da DNL (*Fasn*, *Scd1* e *Chrebpβ*) nos tecidos adiposos, principalmente subWAT e pgWAT, após os 3 dias de exposição ao frio em 4° C. Isso pode parecer paradoxal a princípio, já que a exposição ao frio estimula processos catabólicos, o que não caberia a DNL nesse processo, que é uma via anabólica e antagônica as vias catabólicas. Porém, vários trabalhos na literatura mostram esse aumento da DNL e síntese de TAG no WAT e BAT de animais expostos ao frio (Flachs et al., 2017; Sanchez-Gurmaches et al., 2018) ou tratados com agonistas de receptores $\beta 3$ (Mottillo et al., 2014). No entanto, a explicação para esse fenômeno não foi um consenso entre os artigos, visto que ainda não há um mecanismo provado de como esses tecidos possam regular positivamente a DNL e a β -oxidação ao mesmo tempo e qual a função da DNL nesse contexto.

Com isso, esses resultados nos sugerem que, idealmente, devemos utilizar o grupo controle em termoneutralidade, já que em 22° C ocorre parte da inibição da expressão de genes da DNL hepática em relação a 30° C. No entanto, essa diferença parece ser negligenciável para o caso da OXPHOS, em que não houve diferença significativa em nenhum gene dessa via em 22° C em relação a termoneutralidade. Já o caso do tecido adiposo, uma conclusão pode ser controversa, visto que na temperatura ambiente do biotério já ocorrem alterações significativas da DNL desse tecido, no entanto, essas diferenças são muito maiores em 4°.

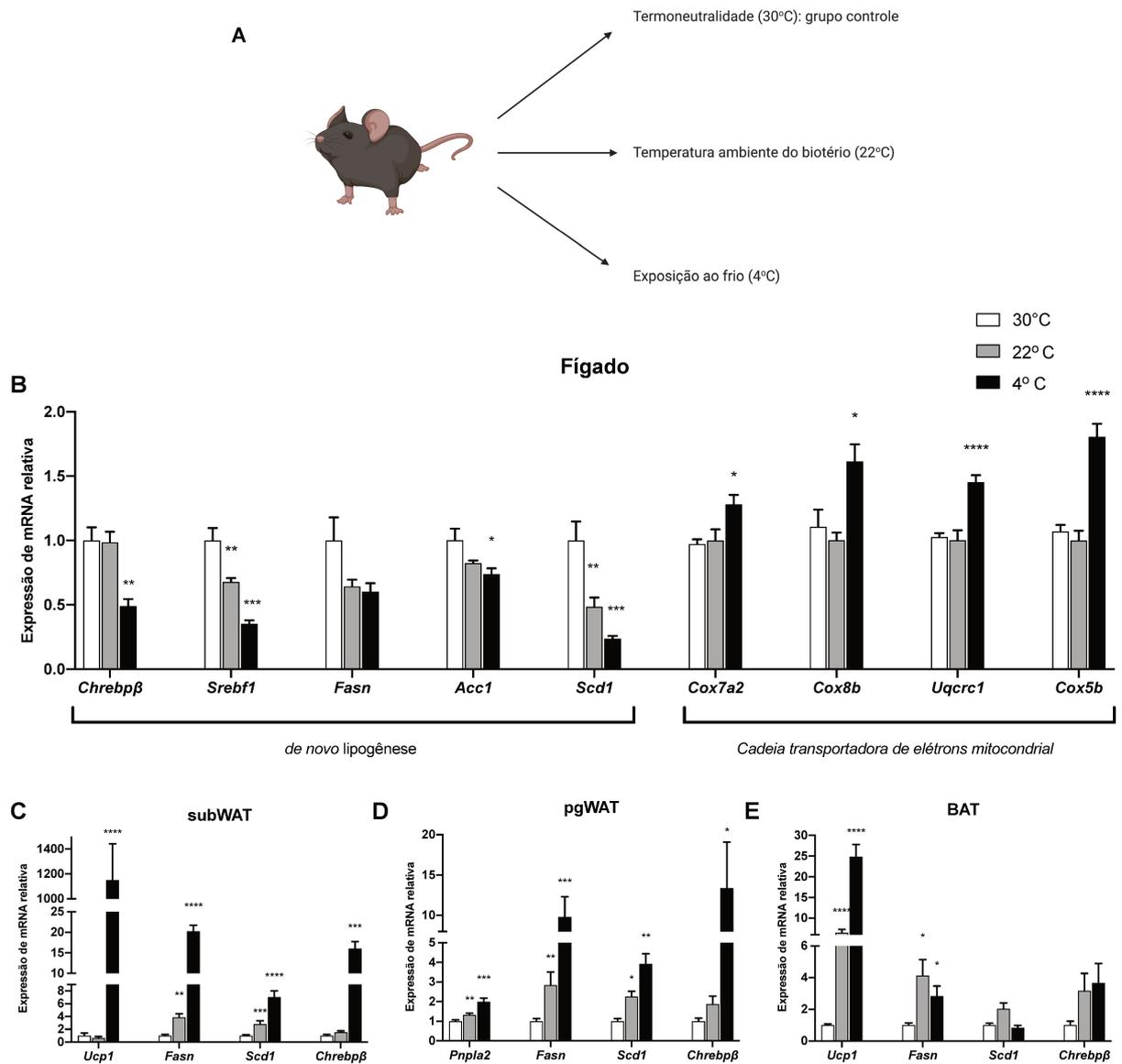


Figura 13. Determinação de temperatura do grupo controle

Análises de expressão gênica (RT-qPCR) de camundongos C57BL6/J quando submetidos a termoneutralidade ou frio por 3 dias. (n = 8) A) Metodologia utilizada, criada no BioRender.com B) Fígado C) tecido adiposo perigonadal (pgWAT) D) tecido adiposo marrom (BAT) E) tecido adiposo branco subcutâneo (subWAT).

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 baseado no teste One-Way ANOVA e post hoc Tukey.

6. Discussão

O aumento da *de novo* lipogênese (DNL) hepática é uma das principais causas para o maior acúmulo de espécies lipídicas no fígado (Lim et al., 2010; Paglialunga & Dehn, 2016). Esse maior acúmulo de lipídeos causa um tipo de toxicidade celular denominada de lipotoxicidade, o qual pode desencadear disfunções celulares, como o estresse retículo, produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e resistência a insulina (Marra & Svegliati-Baroni, 2018). Esses processos, quando ocorrem de maneira desenfreada na célula, causam a morte celular (Arab et al., 2018; Cai et al., 2019; Tilg et al., 2017), o que resulta na liberação de componentes intracelular, como ATP, e mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, ativando a infiltração leucocitária e desencadeando a inflamação no fígado (Marra & Svegliati-Baroni, 2018; Wree et al., 2013). Portanto, diminuir DNL hepática é uma forma de controlar a inflamação no fígado.

A lipotoxicidade é uma das características da *Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), doença que inicialmente é caracterizada por altos níveis de lipídeos nos hepatócitos (maior que 5% do volume dos hepatócitos) e que pode progredir para a esteatohepatite (NASH) e até mesmo para cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (Arab et al., 2018). Na NAFLD, a contribuição da DNL para o acúmulo de lipídeos no fígado salta de 5% para 23% (Softic et al., 2016). Devido a NAFLD estar bastante associada com a síndrome metabólica e, por consequência, resistência a insulina no WAT (de Alwis, 2018; Gastaldelli & Cusi, 2019; Tilg et al., 2017), a lipólise do WAT contribui com a maior fração desse acúmulo, ficando em torno de 60% dos lipídeos acumulados nos hepatócitos (Softic et al., 2016). Além disso, a própria disfunção hepática também regula positivamente a DNL, criando um ciclo vicioso entre a DNL e o acúmulo de lipídeos no fígado (Baiceanu et al., 2016). Isso ocorre por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. No entanto, já sabemos que o estresse de retículo e resistência a insulina estão envolvidos nesse processo (Baiceanu et al., 2016). Esses processos podem estimular a ação do fator de transcrição SREBP1c, aumentando a transcrição de genes da DNL, como *Scd1*, *Fasn* e *Acc*, estimulando a DNL ainda mais (Lee & Ye, 2004). Devido a isso, faz-se

a necessidade de buscar meios de controlar a DNL hepática. Com isso em mente, esse trabalho visou descobrir se a DNL hepática pode ser inibida através da exposição ao frio. A inibição da DNL se daria pelo aumento dos níveis do ácido docosahexaenoico (DHA) no fígado de camundongos expostos ao frio. Esse DHA seria sintetizado no pgWAT para exportação ao fígado.

O DHA é um ácido graxo poli-insaturado (PUFA) ômega-3 que possui capacidade reconhecida na literatura de inibir a atividade de fatores de transcrição da DNL hepática, como SREBP1c e ChREBP (Jump et al., 2013). Portanto, os maiores níveis de DHA no fígado inibiriam as taxas de DNL hepática, diminuindo o acúmulo de lipídeos nesse órgão. Além disso, nossos dados mostraram que esse DHA parece ser liberado pelo pgWAT, o que o caracterizaria como um lipídio com ação sinalizatória (lipocina). As lipocinas, assim como os hormônios, tem a função *crosstalk* entre os tecidos, modulando, por exemplo, o estado energético desses tecidos para que haja uma resposta adequada e eficiente do metabolismo energético frente a diferentes situações fisiológicas e fisiopatológicas (Priest & Tontonoz, 2019).

Várias lipocinas já foram reportadas na literatura (revisado em Hern, 2019), como é o caso do 12-HEPE, um lipídio sintetizado no BAT, a partir da ação da 12-lipoxigenase (12-LOX) sob o EPA, durante a exposição ao frio em camundongos (Leiria et al., 2019). O 12-HEPE estimula a captação de glicose no próprio BAT, além de aumentar a sensibilidade a insulina em tecidos distantes, como o músculo (Leiria et al., 2019). Também já foi demonstrado a existência do 12,13-diHOME, outra lipocina sintetizada no BAT durante a exposição ao frio, o qual aumenta a captação de ácidos graxos no fígado e no músculo através da regulação positiva de transportadores lipídicos, como CD36 e FATP (Lynes et al., 2017). Tanto o 12-HEPE como 12,13-diHOME mostram a ação benéfica das lipocinas para o metabolismo lipídico do fígado. Além disso, não só o BAT pode sintetizar essas lipocinas, como também o WAT, como é caso do ácido palmitoleico (C16:1), primeira lipocina descoberta (Cao et al., 2008).

Nossos dados indicam, até o momento, que há uma correlação entre os níveis de DHA no fígado e no tecido adiposo. Por isso especulamos que o DHA

atuaria como uma lipocina liberada pelo tecido adiposo. Inicialmente mostramos um aumento da contribuição porcentual de DHA no fígado (**Figura 5A**) e diminuição dessa contribuição, ou da contribuição de ALA, no tecido adiposo de camundongos expostos ao frio por 7 dias (**Figura 5B, 5C e 5D**). Isso sugeriu o movimento do DHA do tecido adiposo ao fígado. Adicionalmente, o aumento de DHA no fígado era acompanhado da menor transcrição de *Scd1* (**Figura 7E**) e menor razão entre a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados em relação aos ácidos graxos saturados (MUFA/SFA) (**Figura 7D**). A razão MUFA/SFA reflete a atividade da SCD1, que, por sua vez, é associada lipogênese e acúmulo de TAGs no fígado (Gutiérrez-Juárez et al., 2006). Portanto, inicialmente sugerimos que o aumento de DHA no fígado poderia inibir a DNL hepática através da inibição de *Scd1*, o que mostramos, nos experimentos seguintes, não ser exatamente o caso.

Através do experimento *time course*, observamos resultados consistentes em relação ao aumento de DHA hepático nos camundongos expostos ao frio. Esse aumento se deu a partir do terceiro dia de exposição (**Figura 8A**) e se manteve no quinto e sétimos dias. Esses resultados eram acompanhados de uma diminuição consistente de ALA, além de um significativo aumento na transcrição de *Fads2* (**Figura 9A**), o que nos indicou que o frio pode estimular a biossíntese de DHA a partir de ALA no pgWAT.

Além disso, nos perguntamos se o aumento dos níveis de DHA no fígado poderia diminuir a DNL hepática, já que esse PUFA tem ação inibitória sob os fatores de transcrição lipogênicos SREBP1c e ChREBP β . Para isso, mensuramos a expressão de genes alvos desses fatores, como *Scd1*, *Fasn* e *Dgat2*, além dos próprios *Srebfl* e *Chrebp*. A partir dessa técnica, pudemos observar que a diminuição, ou pelo menos o retorno aos níveis do controle, da expressão de genes da DNL ocorrem a partir do terceiro dia de exposição, mesmo período de aumento do DHA, indicando que esse PUFA pode estar associado a inibição da DNL no fígado de animais expostos ao frio (**Figura 8A**). A afirmação que fizemos de que ocorre um “retorno aos níveis do controle” pode parecer contraditória *a priori*, visto que não se observa uma redução em relação ao controle, entretanto, neste contexto, a normalização aos níveis controle reflete uma contrapartida do organismo frente

ao grande influxo de nutrientes que se observa em camundongos expostos ao frio. Por isso, acreditamos que o aumento agudo (12 horas) da expressão de alguns genes, que são sensores ao influxo de nutrientes, como *Chrebp β* , *Fasn* e *Dgat2*, foi posteriormente contrabalanceado pela ação anti-lipogênica que ocorreu a partir do influxo tardio de DHA. Assim sendo, dizer “retorno aos níveis do controle” se reveste de grande importância neste contexto, uma vez que a diminuição foi observada em relação aos animais expostos ao frio por 12 horas e não em relação aos animais controles não exposto, como foi o caso de outros genes.

Após o terceiro dia de exposição, ocorre o aumento do DHA no fígado e a expressão de todos os genes diminuem, seja em relação ao controle, seja em relação a 12 horas de exposição. No caso de *Scd1* e *Sreb1*, que mostraram uma tendência de diminuição desde o período de 12 horas de exposição, sofreram uma diminuição bem mais acentuada quando houve aumento de DHA no fígado. Com isso, acreditamos que, em curtos períodos de tempo, a sinalização adrenérgica, hormônios tireoideanos (Sinha et al., 2018) ou mesmo a ação da Neuregulina 4 (NRG4) (G. X. Wang et al., 2014) possa inibir a ação de SREBP1c e estimular a de ChREBP. Em longos períodos de exposição, acreditamos que o DHA esteja por trás da inibição desses dois fatores de transcrição, causando diminuição da expressão de seus genes alvos.

Apesar dos resultados, ainda é cedo para afirmarmos sobre o papel do DHA como uma lipocina liberada pelo tecido adiposo. Podemos especular que esse transporte seria um mecanismo de comunicação entre a DNL hepática e a DNL do tecido adiposo. Isso porque, em longos períodos de exposição ao frio, a DNL no fígado é inibida, enquanto no mesmo período, essa via é estimulada no tecido adiposo. No entanto, essa afirmação é baseada apenas em experimentos de RT-qPCR e GC-MS, o que caracteriza essa afirmação apenas como uma especulação, sem grandes dados para seu embasamento, e, portanto, está sujeita a futuras alterações ou mesmo ser completamente desconsiderada.

Apesar do trabalho indicar a equivalência temporal no transporte de DHA do tecido adiposo para fígado, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmarmos essa hipótese. Primeiramente, a fim de se confirmar as

variações de DHA no fígado e nos tecidos adiposos, devemos medir as quantidades absolutas desse ácido graxo (em mg de DHA por mg de tecido) em cada um dos tecidos. Isso porque a quantificação relativa, realizada em todos os experimentos até agora, pode refletir apenas uma variação de outros ácidos graxos no tecido e não exatamente um aumento ou diminuição de DHA. Com isso, caso possamos confirmar o aumento de DHA no fígado, devemos, em seguida, investigar de que forma esse DHA se encontra aumentado nesse tecido.

Ácidos graxos podem se apresentar em diferentes formas em uma célula: esterificados com glicerol na forma de TAG, ceramidas, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, ésteres de colessterila, cardiolipinas e até mesmo sem esterificação alguma (Han, 2016). Cada forma é associada a uma função dentro da célula. TAGs e ésteres de colessterila normalmente são encontrados como lipídeos de reserva na gota lipídica. Já fosfatidilcolinas e fosfoetanolaminas são lipídeos componentes de membranas, tanto membrana plasmática, como membrana de organelas. As cardiolipinas são encontradas principalmente nas membranas mitocondriais internas, auxiliando na função respiratória dessa organela (Han, 2016). Além disso, também consideramos a possibilidade de não ser exatamente o DHA que esteja atuando sobre a DNL no fígado, mas sim algum derivado oxidado desse PUFA, como HDHAs (derivados hidroxilados de DHA), Resolvinas da série D (RvD), Protectinas (PD) ou até maresinas (MaR). Esses lipídeos oxidados são produzidos a partir da ação das 5, 12 ou 15-Lipoxigenase sob o DHA (Fredman & Spite, 2017; Serhan, 2017; Spite et al., 2014) e apresentam efeitos bastante acentuados, mesmo em baixas concentrações (López-Vicario et al., 2016). Portanto, devido ao exposto, pretendemos executar uma lipidômica e uma oxilipidômica nas amostras de fígado e tecido adiposo desses camundongos expostos ao frio para esclarecer essas questões.

Outro ponto importante a ser testado é se o aumento de DHA tem relação com a maior captação desse PUFA no fígado. Isso porque outros processos, como o bloqueio da oxidação perioxossomal podem, em teoria, aumentar a quantidade desse PUFA no fígado. A oxidação perioxossomal é uma importante via para a diminuição da cadeia carbônica de ácidos graxos muito longos antes que eles sejam

direcionados para oxidação nas mitocôndrias (Bond et al., 2016). Para mostrarmos nosso ponto de transporte do pgWAT ao fígado, devemos medir a quantidade de DHA no plasma dos animais expostos ao frio do experimento *time course*. Esperamos que a quantidade de DHA no plasma dos animais siga as tendências observadas no fígado e no tecido adiposo. Dessa forma, esperamos que ocorra um aumento de DHA na circulação anterior ao aumento no fígado e posterior a diminuição no tecido adiposo.

Em relação ao tecido adiposo, para confirmarmos o aumento da produção de DHA a partir de ALA, devemos fazer ensaios que mostrem o aumento de expressão e atividade da proteína FADS2. Para isso, utilizaremos a técnica de Western Blot (WB) para mostrar se há o aumento da expressão da proteína prevista após o terceiro dia de exposição. Além disso, o aumento de atividade será mostrado através de kits de atividade de FADS2. Assim, esperamos que esses dois experimentos possam correlacionar o aumento da expressão gênica de *Fads2* no pgWAT e os maiores níveis de DHA no fígado. No futuro, também pretendemos realizar experimento de ganho e perda de função. Para isso, vamos adquirir camundongos que não expressem FADS2 (*Fads2* KO), o que nos permitirá confirmar se há menores níveis de DHA no fígado nos animais que não sejam capazes de converter ALA em DHA no tecido adiposo. Outros experimentos *in vitro* também nos ajudarão a nos esclarecer outros pontos. O tratamento de adipócitos com agonistas adrenérgicos, como o CL316,243, deve, em princípio, induzir um aumento da expressão de FADS2 e ocasionar uma maior liberação de DHA para o meio extracelular. Se as nossas hipóteses se confirmarem, também é interessante superexpressar a enzima FADS2 em adipócitos e observar se ocorre maior liberação de DHA para o meio extracelular.

Um ponto importante de ressaltarmos é que entendemos a limitação imposta pelo PCR, técnica que foi utilizada indiscriminadamente em todos os experimentos. Seu principal objetivo é observar mudanças na expressão de um RNA mensageiro (mRNA) de um gene. Todavia, sabemos que a regulação pós-transcricional e pós-traducional podem causar mudanças nas quantidades e atividades de uma proteína, o que pode não permitir a correlação entre as variações

na expressão do mRNA e atividade da proteína. Por isso, pretendemos mensurar as expressões das proteínas da DNL, mensuradas no PCR (*Scd1*, *Sreb1f*, *Chrebpβ*, *Fasn* e *Dgat2*), através do WB. Isso nos mostraria, em nível proteico, como é o comportamento dessas expressões após a exposição do animal ao frio. Ainda sim, os resultados com o kit de triacilglicerídeos mostraram bastante concordância com as expressões gênicas obtida através do PCR, o que mostra que essa expressão gênica está bastante associada a maior taxa da DNL. No entanto, mesmo em nível proteico, ainda não será possível afirmar, com total certeza, as variações que ocorreram na DNL. Para isso, devemos utilizar experimentos com isótopos marcados os quais permitem a quantificação da velocidade de produção do palmitato. Esse tipo de experimento é considerado padrão-ouro para indicar a taxa de DNL. Para esse ensaio, comumente é utilizado a água triciada (H_2^3O). No entanto, ainda não tivemos acesso a esse reagente, mas pretendemos realizá-lo no futuro.

Como a diminuição da DNL hepática pode provocar, em teoria, diminuição de Malonil-CoA e, por consequência, maior entrada de ácidos graxos na mitocôndria através da maior atividade de CPT1a, procuramos entender se o transporte de DHA causaria um aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndrias do fígado. Para estudar nossa hipótese, medimos o consumo de oxigênio em biopsias de animais expostos ao frio por 12 horas ou 3 dias (**Figura 11A**). Esperávamos observar um menor consumo de oxigênio em 12 horas, quando há, teoricamente, maior DNL e maior Malonil-CoA no fígado, e maior consumo de oxigênio em 3 dias de exposição, quando, teoricamente, ocorre diminuição de Malonil-CoA. Parte desses resultados foram confirmados, já que observamos maiores consumos de oxigênio em 3 dias de exposição. No entanto, não houve a diminuição esperada desse consumo em 12 horas, o que não entendemos ainda completamente do porquê isso ocorre. Porém, especulamos que esses aumentos possam ser devido a uma ativação de PPAR α , receptor nuclear que é ativado por PUFAs, como o DHA. A ativação desse receptor induz a transcrição de genes da β -oxidação, como *Cpt1a* e *AcadVL*, provocando maior consumo de oxigênio mitocondrial. Observamos que a expressão de genes da β -oxidação acompanha os

níveis de DHA no fígado (**Figura 11B**), o que sugere que o DHA esteja realmente associado a maior ativação de PPAR α .

Também consideramos outros experimentos para mostrar a correlação entre os níveis de DHA no fígado e aumento da atividade mitocondrial nesse órgão. Primeiramente, vamos aumentar o número de amostras do experimento e repetir o experimento. Isso porque o número de amostras utilizados no experimento com Oroboros foi baixo, entre 3 e 4, o que pode ter distanciado os resultados do experimento da realidade. Além disso, iremos mensurar as quantidades de Malonil-CoA no fígado desses animais expostos ao frio através de kit de ELISA. Isso confirmará ou não a relação entre o aumento do consumo de oxigênio e os níveis de Malonil-CoA no fígado. Também pretendemos tratar culturas celulares de hepatócitos AML12 (camundongos) com o DHA, no intuito de medir o consumo de oxigênio através do Seahorse. O Seahorse tem a vantagem de ser uma técnica mais automatizada e não necessitar de aplicação manual das drogas, o que poderia diminuir o erro da medida. Essa técnica pode nos confirmar se os maiores níveis de DHA nos hepatócitos podem aumentar a atividade mitocondrial. A cultura primária de hepatócitos, de camundongos expostos ao frio, também pode nos confirmar nossas hipóteses através da execução dos mesmos experimentos. Além do maior consumo de oxigênio acompanhar os aumentos de DHA hepáticos, também obtivemos maiores expressões de genes relativos à β -oxidação mitocondrial e de polipeptídios componentes dos complexos transportadores de elétrons mitocondriais, que são alvos da ação de PPAR α . Assim para confirmarmos o aumento da β -oxidação mitocondrial pretendemos realizar um ensaio para a medir a oxidação do palmitato, tanto em biopsia de fígado, como em cultura imortalizadas e primárias de hepatócitos.

7. Conclusões Parciais

Até agora nossos dados indicam que o frio estimula a liberação de DHA pelo tecido adiposo para regular negativamente a DNL no fígado. Essa liberação de DHA parece ser precedida de uma conversão de ALA em DHA, através da ação da FADS2, enzima limitante da via Sprecher.

No fígado, esse DHA age na inibição de ChREBP β e SREBP1c, diminuindo a transcrição de genes da DNL hepática. A menor atividade desses fatores de transcrição indica uma menor taxa da DNL. Além disso, o DHA também parece ser capaz de aumentar a atividade mitocondrial hepática através da maior ativação de PPAR α . A maior atividade mitocondrial parece estar associada ao aumento da oxidação de ácidos graxos nos hepatócitos, o que explicaria os menores níveis de ácidos graxos no fígado após a exposição ao frio.

No entanto, entendemos que nossos experimentos ainda são preliminares e não nos dão certeza se essa via de fato acontece. Por isso, realizaremos mais experimentos para a confirmação do modelo proposto na **Figura 14**, a seguir.

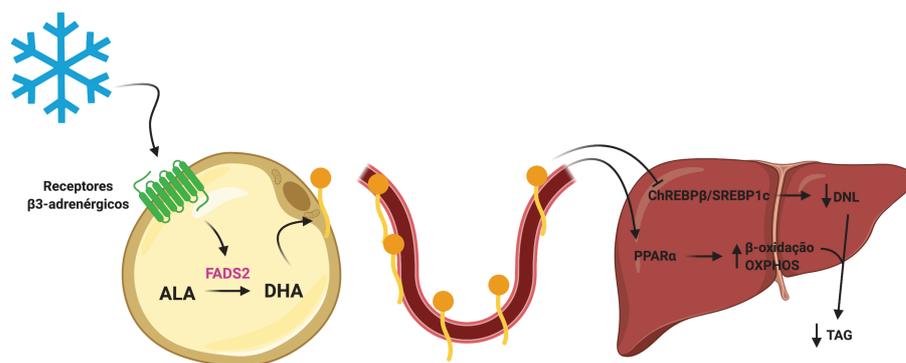


Figura 14. Modelo proposto

O frio ativa os receptores β 3-adrenérgicos nos adipócitos, o que ativa FADS2, aumentando a conversão de ALA em DHA. O DHA é transportado para o fígado através da circulação. No fígado, o DHA inibe a ação dos fatores de transcrição ChREBP β e SREBP1c, inibindo a DNL hepática e diminuindo a produção de TAGs na célula. Além disso, o DHA ativa PPAR α , aumentando a β -oxidação e OXPHOS e contribuindo para a diminuição de TAGs no fígado. Figura criada no BioRender.com

8. Referências

- ALJohani, A. M., Syed, D. N., & Ntambi, J. M. (2017). Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(12), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.003>
- Arab, J. P., Arrese, M., & Trauner, M. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6). <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1467s>
- Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M., & Foufelle, F. (2016). *Baiceanu2016*. 12(December). <https://doi.org/10.1038/nrendo..2016.124>
- 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. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, 17(2), 200–206. <https://doi.org/10.1038/nm.2297>
- Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2018). Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 77–87. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.132>
- Blondin, D. P., Labbé, S. M., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, É. E., Richard, D., Carpentier, A. C., & Haman, F. (2015). Contributions of white and brown adipose tissues and skeletal muscles to acute cold-induced metabolic responses in healthy men. *Journal of Physiology*, 593(3), 701–714. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283598>

- Bond, L. M., Miyazaki, M., O'Neill, L. M., Ding, F., & Ntambi, J. M. (2016). Fatty Acid Desaturation and Elongation in Mammals. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition* (Sixth Edit). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00006-7>
- Cai, J., Xu, M., Zhang, X., & Li, H. (2019). Innate Immune Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*(1), 153–184.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013003>
- Calderon-Dominguez, M., Mir, J. F., Fucho, R., Weber, M., Serra, D., & Herrero, L. (2016). Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*, *5*(2), 98–118.
<https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1122857>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277–359.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell*, *134*(6), 933–944.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.048>
- Carpentier, A. C., Blondin, D. P., Virtanen, K. A., Richard, D., Haman, F., & Turcotte, É. E. (2018). Brown adipose tissue energy metabolism in humans. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(AUG), 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00447>
- Castro, L. F. C., Tocher, D. R., & Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*, *62*, 25–40.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001>
- Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in

- Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metabolism*, 29(1), 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>
- Chow, J., Rahman, J., Achermann, J. C., Dattani, M. T., & Rahman, S. (2017). Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(2), 92–104. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.151>
- Cunningham, J. J., Gulino, M. A., Meara, P. A., & Bode, H. H. (1985). Enhanced hepatic insulin sensitivity and peripheral glucose uptake in cold acclimating rats. *Endocrinology*, 117(4), 1585–1589. <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1585>
- de Alwis, N. M. W. (2018). Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Practical Guide to Obesity Medicine*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-48559-3.00009-9>
- De Jesus, L. A., Carvalho, S. D., Ribeiro, M. O., Schneider, M., Kim, S. W., Harney, J. W., Larsen, P. R., & Bianco, A. C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9), 1379–1385.
<https://doi.org/10.1172/JCI200113803>
- Dentin, R., Benhamed, F., Pégrier, J. P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., & Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2843–2854.
<https://doi.org/10.1172/JCI25256>
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Fougelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., & Ferré, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *Journal of Hepatology*, 56(1), 199–209.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.019>
- Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D. G.,

- Friedman, J. M., & Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(17), 6409–6414.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401627101>
- Ertunc, M. E., & Hotamisligil, G. S. (2016). Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: Indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *Journal of Lipid Research*, *57*(12), 2099–2114.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R066514>
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, *151*(2), 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>
- Flachs, P., Adamcova, K., Zouhar, P., Marques, C., Janovska, P., Viegas, I., Jones, J. G., Bardova, K., Svobodova, M., Hansikova, J., Kuda, O., Rossmeisl, M., Liisberg, U., Borkowska, A. G., Kristiansen, K., Madsen, L., & Kopecky, J. (2017). Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: Link to lean phenotype. *International Journal of Obesity*, *41*(3), 372–380.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2016.228>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. . (1987). *a Simple*. *55*(5), 999–1033.
- Fredman, G., & Spite, M. (2017). Specialized pro-resolving mediators in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, *58*, 65–71.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.02.003>
- Gastaldelli, A., & Cusi, K. (2019). From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Reports*, *1*(4), 312–328.
<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.07.002>
- Ghandour, R. A., Colson, C., Giroud, M., Maurer, S., Rekima, S., Ailhaud, G., Klingenspor, M., Amri, E. Z., & Pisani, D. F. (2018). Impact of dietary $\omega 3$ polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and brite adipocyte

- function. *Journal of Lipid Research*, *59*(3), 452–461.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M081091>
- Gibbons, G. F., Wiggins, D., Brown, A. M., & Hebbachi, A. M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions*, *32*(1), 59–64. <https://doi.org/10.1042/BST0320059>
- Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B., & Bauchart, D. (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reproduction Nutrition Development*, *36*(4), 375–389. <https://doi.org/10.1051/rnd:19960404>
- Gutiérrez-Juárez, R., Pocai, A., Mulas, C., Ono, H., Bhanot, S., Monia, B. P., & Rossetti, L. (2006). Critical role of stearoyl-CoA desaturase - 1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(6), 1686–1695. <https://doi.org/10.1172/JCI26991>
- Han, X. (2016). Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(11), 668–679. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.98>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Hashimoto, K., Ishida, E., Matsumoto, S., Okada, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T., & Mori, M. (2009). Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, *150*(7), 3417–3424. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0059>
- Hashimoto, K., Yamada, M., Matsumoto, S., Monden, T., Satoh, T., & Mori, M. (2006). Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, *147*(9), 4292–4302. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0116>
- Hauck, A. K., & Bernlohr, D. A. (2016). Thematic review series: Lipotoxicity: Many roads to cell dysfunction and cell death: Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, *57*(11), 1976–1986.

<https://doi.org/10.1194/jlr.R066597>

- Heine, M., Fischer, A. W., Schlein, C., Jung, C., Straub, L. G., Gottschling, K., Mangels, N., Yuan, Y., Nilsson, S. K., Liebscher, G., Chen, O., Schreiber, R., Zechner, R., Scheja, L., & Heeren, J. (2018). Lipolysis Triggers a Systemic Insulin Response Essential for Efficient Energy Replenishment of Activated Brown Adipose Tissue in Mice. *Cell Metabolism*, 28(4), 644-655.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.020>
- Hellerstein, M. K., Schwarz, J.-M., & Neese, R. A. (1996). Regulation of Hepatic De Novo Lipogenesis in Humans. *Annual Review of Nutrition*, 16(1), 523–557. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.002515>
- Hern, D. (2019). *The Regulation of Lipokines by Environmental Factors*. 1–21.
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M., & Berridge, M. V. (2017). Functional mitochondria in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296>
- Hodson, L., & Gunn, P. J. (2019). The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(12), 689–700. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0256-9>
- Hoeke, G., Kooijman, S., Boon, M. R., Rensen, P. C. N., & Berbeé, J. F. P. (2016). Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(1), 173–182. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306647>
- Houten, S. M., Violante, S., Ventura, F. V., & Wanders, R. J. A. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 23–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Jeyakumar, S. M., Lopamudra, P., Padmini, S., Balakrishna, N., Giridharan, N. V., & Vajreswari, A. (2009). Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat

- strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. *Nutrition and Metabolism*, *6*, 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-27>
- Jump, D. B., Tripathy, S., & Depner, C. M. (2013). Fatty Acid–Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annual Review of Nutrition*, *33*(1), 249–269. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161139>
- Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., Takahashi, N., & Kawada, T. (2015). Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Scientific Reports*, *5*(November), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep18013>
- Kitade, H., Chen, G., Ni, Y., & Ota, T. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments. *Nutrients*, *9*(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu9040387>
- Lee, J. N., & Ye, J. (2004). Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 45257–45265.
- Leiria, L. O., Wang, C.-H., Lynes, M. D., Yang, K., Shamsi, F., Sato, M., Sugimoto, S., Chen, E. Y., Bussberg, V., & Narain, N. R. (2019). 12-Lipoxygenase regulates cold adaptation and glucose metabolism by producing the omega-3 lipid 12-HEPE from brown fat. *Cell Metabolism*, *30*(4), 768–783.
- Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., & Lustig, R. H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *7*(5), 251–264. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.41>
- Lin, D. S., & Connor, W. E. (1990). Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue? *American Journal of Clinical Nutrition*, *51*(4), 535–539. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.4.535>
- Linden, A. G., Li, S., Choi, H. Y., Fang, F., Fukasawa, M., Uyeda, K., Hammer, R.

- E., Horton, J. D., Engelking, L. J., & Liang, G. (2018). Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *Journal of Lipid Research*, *59*(3), 475–487.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M081836>
- López-Vicario, C., Rius, B., Alcaraz-Quiles, J., García-Alonso, V., Lopategi, A., Titos, E., & Clària, J. (2016). Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *European Journal of Pharmacology*, *785*, 133–143.
- Lynes, M. D., Leiria, L. O., Lundh, M., Bartelt, A., Shamsi, F., Huang, T. L., Takahashi, H., Hirshman, M. F., Schlein, C., Lee, A., Baer, L. A., May, F. J., Gao, F., Narain, N. R., Chen, E. Y., Kiebish, M. A., Cypess, A. M., Blüher, M., Goodyear, L. J., ... Tseng, Y. H. (2017). The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nature Medicine*, *23*(5), 631–637. <https://doi.org/10.1038/nm.4297>
- Marra, F., & Svegliati-Baroni, G. (2018a). Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology*, *68*(2), 280–295.
- Marra, F., & Svegliati-Baroni, G. (2018b). Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology*, *68*(2), 280–295.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>
- Mauvoisin, D., & Mounier, C. (2011). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, *93*(1), 78–86.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.001>
- Metherel, A. H., & Bazinet, R. P. (2019). Updates to the n-3 polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway: DHA synthesis rates, tetracosahexaenoic acid and (minimal) retroconversion. *Progress in Lipid Research*, *76*(October), 101008. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101008>
- Miyazaki, M., Flowers, M. T., Sampath, H., Chu, K., Otzelberger, C., Liu, X., &

- Ntambi, J. M. (2007). Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. *Cell Metabolism*, 6(6), 484–496. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.014>
- Mottillo, E. P., Balasubramanian, P., Lee, Y. H., Weng, C., Kershaw, E. E., & Granneman, J. G. (2014). Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *Journal of Lipid Research*, 55(11), 2276–2286. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050005>
- Oboh, A., Kabeya, N., Carmona-Antoñanzas, G., Castro, L. F. C., Dick, J. R., Tocher, D. R., & Monroig, O. (2017). Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04288-2>
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Lane, J. T., & Thompson, M. P. (1991). Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 87(1), 125–132. <https://doi.org/10.1172/JCI114961>
- Paglialunga, S., & Dehn, C. A. (2016). Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0321-5>
- Pawar, A., & Jump, D. B. (2003). Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor α activity in rat primary hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35931–35939. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306238200>
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., & Girard, J. (2007). ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 179–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093618>

- Priest, C., & Tontonoz, P. (2019). Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nature Metabolism*, *1*(12), 1177–1188. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>
- Puri, P., Wiest, M. M., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, H. K., Contos, M. J., Sterling, R. K., Fuchs, M., Zhou, H., Watkins, S. M., & Sanyal, A. J. (2009). The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *50*(6), 1827–1838. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>
- Ramseyer, V. D., & Granneman, J. G. (2016). Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. *Adipocyte*, *5*(2), 119–129. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1145846>
- Rapoport, S. I., Igarashi, M., & Gao, F. (2010). Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *82*(4–6), 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.015>
- Ridgway, N. D., & McLeod, R. S. (2015). Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-18457-7>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, *203*(January), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Sanchez-Gurmaches, J., Tang, Y., Jespersen, N. Z., Wallace, M., Martinez Calejman, C., Gujja, S., Li, H., Edwards, Y. J. K., Wolfrum, C., Metallo, C. M., Nielsen, S., Scheele, C., & Guertin, D. A. (2018). Brown Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Storage and Thermogenesis. *Cell Metabolism*, *27*(1), 195-209.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.008>
- Scheja, L., & Heeren, J. (2016). Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. *Journal of Hepatology*, *64*(5), 1176–1186.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.025>

- Schooneman, M. G., Vaz, F. M., Houten, S. M., & Soeters, M. R. (2013). Acylcarnitines: Reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes*, *62*(1), 1–8. <https://doi.org/10.2337/db12-0466>
- Scorletti, E., & Byrne, C. D. (2013). Omega-3 Fatty Acids, Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Nutrition*, *33*(1), 231–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161230>
- Sepa-Kishi, D. M., Katsnelson, G., Bikopoulos, G., Iqbal, A., & Ceddia, R. B. (2018). Cold acclimation reduces hepatic protein Kinase B and AMP-activated protein kinase phosphorylation and increases gluconeogenesis in rats. *Physiological Reports*, *6*(5), 1–12. <https://doi.org/10.14814/phy2.13592>
- Serhan, C. N. (2017). Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB Journal*, *31*(4), 1273–1288. <https://doi.org/10.1096/fj.201601222R>
- Shirai, N., Suzuki, H., & Wada, S. (2005). Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Analytical Biochemistry*, *343*(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.037>
- Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J. A., Bensard, C. L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E. E., Donato, A. J., Apte, U., Longo, N., Rutter, J., Schreiber, R., Zechner, R., Cox, J., & Villanueva, C. J. (2017). Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis. *Cell Metabolism*, *26*(3), 509–522.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.006>
- Sinha, R. A., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2018). Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(5), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.10>
- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of Dietary Fructose and

- Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
- Spite, M., Clària, J., & Serhan, C. N. (2014). Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metabolism*, 19(1), 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.006>
- Sustarsic, E. G., Ma, T., Lynes, M. D., Larsen, M., Karavaeva, I., Havelund, J. F., Nielsen, C. H., Jedrychowski, M. P., Moreno-Torres, M., Lundh, M., Plucinska, K., Jespersen, N. Z., Grevengoed, T. J., Kramar, B., Peics, J., Hansen, J. B., Shamsi, F., Forss, I., Neess, D., ... Gerhart-Hines, Z. (2018). Cardiolipin Synthesis in Brown and Beige Fat Mitochondria Is Essential for Systemic Energy Homeostasis. *Cell Metabolism*, 28(1), 159-174.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.003>
- Takeuchi, Y., Yahagi, N., Izumida, Y., Nishi, M., Kubota, M., Teraoka, Y., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Sekiya, M., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J. I., Gotoda, T., Ishibashi, S., Itaka, K., Kataoka, K., Nagai, R., Yamada, N., ... Shimano, H. (2010). Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11681–11691. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096107>
- Tilg, H., Moschen, A. R., & Roden, M. (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(1), 32–42. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.147>
- Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: Crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1784–1803. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5121-4>
- Townsend, K. L., & Tseng, Y. H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(4), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.004>

- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., & Sprechers, H. (1991). Acid in Rat Liver Is Independent of a 4-Desaturase". *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(November 1991), 19995–20000.
- Wallis, J. G., Watts, J. L., & Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(9), 467–473. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02168-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02168-0)
- Wang, G. X., Zhao, X. Y., Meng, Z. X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., Cozacov, Z., Zhou, D., Okunade, A. L., Su, X., Li, S., Blüher, M., & Lin, J. D. (2014). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nature Medicine*, *20*(12), 1436–1443. <https://doi.org/10.1038/nm.3713>
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(11), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- Wree, A., Broderick, L., Canbay, A., Hoffman, H. M., & Feldstein, A. E. (2013). From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *10*(11), 627–636. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.149>
- Wu, X., & Huang, T. (2020). Recent development in acetyl-CoA carboxylase inhibitors and their potential as novel drugs. *Future Medicinal Chemistry*, *12*(6), 533–561. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0312>
- Xu, J., Nakamura, M. T., Cho, H. P., & Clarke, S. D. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(33), 23577–23583. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23577>
- Yilmaz, M., & Claiborn, K. C. (2016). *De Novo Lipogenesis Products and Endogenous Lipokines*. *65*(July), 1800–1807. <https://doi.org/10.2337/db16->

0251

Zhang, J. Y., Kothapalli, K. S. D., & Brenna, J. T. (2016). Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *19*(2), 103–110. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000254>

9. Anexos

9.1. Termo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação temporal da de novo lipogênese hepática em resposta ao balanço energético negativo**, registrada com o nº **5176-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori** e **Luiz Osório Silveira Leiria**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **14 de março de 2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2019 - 31/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	08/04/2019 - 31/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL6/J
No. de animais:	70
Idade/Peso:	12 semanas / 25 g
Sexo:	Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGE/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 08 de abril de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávares
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

9.2. Declaração de que a dissertação não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **O PAPEL DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) COMO UMA LIPOCINA ANTI-LIPOGÊNICA NECESSÁRIA PARA A ADAPTAÇÃO DO FÍGADO À EXPOSIÇÃO AO FRIO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14/10/2020

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Raphael Campos Guimarães**

RG n.º 416670465-5

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Luiz Osório Silveira Leiria**

RG n.º 1066737766