



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

JÚLIA ZAGO CASTELLI

IMPACTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE
TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTER (CETP) NO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CONDIÇÃO DE
EXPOSIÇÃO AO FRIO E TERMONEUTRALIDADE

CAMPINAS

2021

JÚLIA ZAGO CASTELLI

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE
TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTER (CETP) NO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO
AO FRIO E TERMONEUTRALIDADE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

*Orientadora: PROF(A) DR(A) HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA
Coorientadora: DR(A) HELENA FONSECA RAPOSO*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JÚLIA ZAGO CASTELLI
ORIENTADA PELO PROF(A) DR(A) JÚLIA ZAGO
CASTELLI.

CAMPINAS

2021

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

C276i Castelli, Júlia Zago, 1996-
Impacto da expressão da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) no metabolismo energético em condição de exposição ao frio e termoneutralidade / Júlia Zago Castelli. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira.

Coorientador: Helena Fonseca Raposo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas de transferência de ésteres de colesterol. 2. Adiposidade. 3. Tecido adiposo marrom. 4. Termogênese. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. II. Raposo, Helena Fonseca, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The impact of cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression on energetic metabolism at both thermoneutrality and cold exposure

Palavras-chave em inglês:

Cholesterol ester transfer proteins

Adiposity

Adipose tissue, Brown

Thermogenesis

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador]

Carlos Henrique Grossi Sponton

Sabrina Grassioli

Data de defesa: 10-02-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5614-2479>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4921264000753689>

Campinas, 10 de Fevereiro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Prof. Dra. Sabrina Grassioli

Dr. Carlos Henrique Grossi Sponton

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 Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

À Dra. Maria Cristina, mãe querida,
que sempre me apoiou e incentivou
a percorrer todos os caminhos que
sonhei.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio das agências brasileiras de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processo nº 131959/2019-0) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**, processo nº 2019/02340-0).

Gostaria de agradecer à equipe de pesquisa do Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC), professores, alunos e funcionários, por estarem sempre alegremente dispostos a trocar conhecimentos e dividir um bom café. Aos professores Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero, Helena C. B. Sampaio, Leonardo R. Silveira, Marcelo Mori, André Vieira, César Sartori e Carlos Sponton que sempre se colocaram à disposição para compartilhar ciência e experiências.

Agradeço imensamente à minha orientadora Helena Coutinho Franco de Oliveira, que me acompanhou desde a iniciação científica, me orientando brilhantemente. Exemplificou a pesquisa de qualidade intelectual e ética inquestionável e deu-me a oportunidade de me apaixonar pelo universo científico. Foi honestamente uma honra ter a oportunidade desta convivência.

Gostaria de agradecer às colaboradoras Cláudia Navarro e Marina Sartori, que contribuíram com o experimento de respiração mitocondrial, e também, à Gláucia Pastore pela gentileza e disponibilidade para auxiliar no processo de liofilização de minhas amostras em plena pandemia. Gostaria também de registrar minha imensa gratidão e respeito à todos os animais que foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente aos pesquisadores e amigos Gabriel Dorighello, Thiago Rentz, Juliana Rovani, Leonardo Moi, Leandro Assis, Pedro Nogueira, Carolina Lazaro e, especialmente à minha co-orientadora Helena Raposo, pela ajuda e companheirismo durante todo o percurso, desde a iniciação científica, até este incrível presente momento. Aos demais amigos da universidade: Thiago Reis, Henver Brunetta, Bruna Lourençoni, Letícia Barssotti, Lohanna Barreto, Israel Lopes, Sandra Ferreira, Davi Sidarta, Rodrigo Gaspar,

Dimitrius Santiago, Cristiane Santos, Alvaro Bernardino, André Oliveira e Raphael Hunger: não teria sido possível sem vocês.

Não poderia deixar de mencionar as incríveis amigas que tive a sorte em ter em minha vida, que sempre me apoiaram e alegraram esta jornada: Eveline Menezes, Amanda Kaye, Rafaela Araújo, Andressa Sanday, Juliete Leal e Letícia Teodoro.

Gostaria de agradecer aos meus pais que me apoiaram durante todo o percurso científico. Minha doutora favorita: minha mãe Cristina, e minhas mestras que me enchem de orgulho, Camila e Mariana Castelli. Ao meu amor, Guilherme Abreu, obrigada pelo inesgotável apoio e carinho.

E por fim, ao meu outro amor, Fubá: meu amado cãozinho. Ensinou-me um amor que motivou minha graduação e esteve ao meu lado durante o mestrado – e espero que esteja ao meu lado por muitos outros anos a me iluminar. Deu-me de presente sua doce companhia durante a leitura dos artigos, conclusão de resultados e me consolou quando os experimentos não se concluíam como o esperado. Sem suas lambidas e latidos, esta jornada não teria sido a mesma.

Resumo

A atividade da proteína de transferência colesteril éster (CETP) reduz os níveis plasmáticos de HDL-colesterol e, portanto, pode aumentar o risco de aterosclerose. Recentemente, identificamos a redução da adiposidade corporal como uma nova função promovida pela expressão da CETP. Em condições padrão (22 °C), os camundongos transgênicos que expressam a CETP, em comparação aos animais controle não transgênicos (NTg), apresentam redução da massa adiposa dos depósitos adiposos perigonadal, perirenal e subcutâneo, aumento da lipólise nos tecidos adiposos perigonadal e subcutâneo, aumento da atividade do tecido adiposo marrom (BAT) e gasto energético corporal. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar como camundongos que expressam a CETP modulam seu metabolismo e adiposidade em condições de exposição ao frio (4 °C) e termoneutralidade (30 °C). Observamos que os animais que expressam a CETP, apesar de apresentarem fenótipo mais magro, foram capazes de manter a temperatura corpórea durante exposição aguda e crônica ao frio em função da maior capacidade de elevar a taxa metabólica corporal (VO₂) especialmente relacionada à atividade do BAT (após estímulo adrenérgico) em relação ao grupo controle NTg. Em termoneutralidade, situação em que o BAT está com sua atividade inibida, os camundongos que expressam a CETP exibiram maior temperatura corpórea, ingestão alimentar, gasto energético corporal no período claro e redução da glicemia no estado alimentado. Estes achados sugerem que outros tecidos como por exemplo, o músculo, podem contribuir para o aumento da taxa metabólica em animais que expressam a CETP em condição de termoneutralidade. Concluímos que a expressão da CETP confere maior capacidade de elevar a taxa metabólica corpórea tanto no frio quanto na termoneutralidade, o que explica o fenótipo mais magro.

Palavras-chave: CETP, adiposidade, tecido adiposo marrom, termoneutralidade, termogênese

Abstract

The plasma activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) reduces HDL-cholesterol levels and thus may enhance the atherosclerosis risk. We have recently identified that CETP expression has a novel function of reducing body adiposity. Under standard conditions (22 °C), CETP expressing mice are leaner and show increased lipolysis, brown adipose tissue (BAT) activity and whole-body energy expenditure compared to non-transgenic (NTg) littermates. The aim of this study was to evaluate how CETP mice modulate their body metabolism and composition during cold exposure (4°C) and thermoneutrality (30°C). Leaner CETP mice were able to maintain their body temperature during acute and chronic cold exposure due to their higher capacity to increase whole body, specially BAT-related, metabolic rates (VO_2) compared with NTg mice. In addition, under thermoneutrality (when BAT activity is reduced), CETP mice exhibited higher body temperature, food ingestion, body energy expenditure (light period) and reduced fed glycemia. These findings suggest that other tissues such as muscle, may account for the higher metabolic rates in CETP mice during thermoneutrality. Thus, we may conclude that CETP expression confers a greater capacity of elevating body metabolic rates during cold and thermoneutrality, what explains the leaner phenotype.

Key-words: CETP, adiposity, brown adipose tissue, thermoneutrality, thermogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: adenosina monofosfato

a-MSH: hormônio estimulante de melanócitos alfa

AG: ácido graxo

ATGL: lipase de triglicérides do tecido adiposo - *adipose triglyceride lipase*

ATP: adenosina trifosfato

BAT: *brown adipose tissue* – tecido adiposo marrom

iBAT: *interscapular brown adipose tissue* – tecido adiposo marrom
interscapular

CART: transcrito regulado por cocaína e anfetaminas

CACT: *carnitine acylcarnitine translocase*

CE: colesterol éster

CETP: *colesterol ester transfer protein* - proteína de transferência de colesterol
éster

CPT: *carnitine palmitoyl transferase*

DAG: diacilglicerol

FABP: *fatty acid binding protein*

FADH: flavina adenina dinucleotídeo

FAT/CD36: *fatty acid translocase*

FATP: proteína de transporte de ácidos graxos - *fatty acid transport protein*

FCCP: *carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxy-phenylhydrazine*

G3P: glicerol-3-fosfato

HDL: *high density lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade

HSL: *hormone sensitive lipase* – hormônio lipase sensível

IDL: *intermediate density lipoprotein*

IMC: índice de massa corpórea

LDL: *low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade

LXR: *liver X receptor*

MAG: monoacilglicerol

MGL: monoacilglicerol lipase

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NPY: neuropeptídeo Y

AgRP: peptídeo relacionado com a proteína agouti

NTg: não transgênico

OMS: organização mundial da saúde

PGC1 α : coativador-1 α do PPAR γ

PKA: proteína kinase A

POMC: pro-opiomelanocortina

PPARs: *peroxissome proliferator activated receptors*

PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo

SERCA: *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* - bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

SLN: sarcolipina

SNS: sistema nervoso simpático

TG: triglicérides, triglicerídeos ou triacilgliceróis

TRH: hormônio liberador de tireotrofina

TRP: *transient receptor potential*

TRVP1: receptor vanilóide 1

TRPM8: *Transient receptor potential, cation channel subfamily M (melastatin) member 8*

UCP: *uncoupling protein* – proteína desacopladora

VLDL: *very low density lipoprotein* - lipoproteína de densidade muito baixa

VO₂: volume de oxigênio consumido

WAT: *white adipose tissue* – tecido adiposo branco

SUMÁRIO

Introdução.....	13
Obesidade.....	13
Balanço Energético.....	15
Adiposidade.....	19
Lipogênese e Lipólise.....	21
Termogênese.....	24
Efeitos da Temperatura Ambiente.....	27
Proteína de Transferência de Colesteril Éster (CETP).....	28
O modelo transgênico que expressa o gene da CETP.....	31
CETP e adiposidade.....	34
Justificativa.....	35
Hipótese e objetivo.....	37
Material e métodos.....	38
Resultados.....	44
Discussão.....	49
Tabelas	55
Figuras	56
Figuras Suplementares	70
Referências.....	74
Anexo I.....	86
Anexo II.....	87
Anexo III.....	90

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade pode ser definida como uma doença em que existe um excesso de gordura corporal, especialmente visceral, que pode comprometer a saúde do indivíduo; uma vez que este excesso de gordura está associado à mudanças fisiopatológicas do organismo (Kopelman, 2000). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) um indivíduo pode ser considerado obeso quando apresenta o índice de massa corporal (IMC, $[\text{Peso (Kg)}/\text{Altura (m)}^2]$) igual ou superior a 30, no entanto, valores entre 25 a 29,9 já classificam a condição de sobrepeso e merecem atenção.

Estas condições, sobrepeso e a obesidade, levam à uma taxa anual de aproximadamente 2,8 milhões de mortes de indivíduos adultos (OMS, 2016). Estes números alarmantes são relacionados ao atual contexto de estilo de vida, onde é possível realizar todas as demandas de sobrevivência com o mínimo esforço físico aliado ao excessivo consumo alimentar. Além disso, a existência dos chamados “ambientes obesogênicos”, ou seja, espaços que ofertam alimento mesmo quando não é a função do estabelecimento (farmácias, parques, cinemas, shoppings, etc.), contribui para indução do comportamento de ingestão alimentar desvinculado da fome. No Brasil, em 2016, os dados referentes ao excesso de peso e obesidade foram de respectivamente 53,8% e 18,9% da população – demonstrando um aumento de 25% e 60% se comparado ao ano de 2006 (Vigitel, 2018).

A preocupação com o aumento da prevalência do excesso de peso deve-se principalmente às suas consequências para a saúde. O excesso de adiposidade está relacionado a vários distúrbios cardio-metabólicos, tais como, dislipidemias (hipertrigliceridemia e redução de HDL-colesterol), hipertensão, resistência à insulina, entre outras. Além da maior quantidade e tamanho de células adiposas, o tecido adiposo dos indivíduos obesos é disfuncional e apresenta secreção excessiva de adipocinas pró-inflamatórias, tais como, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, podendo constituir um quadro inflamatório latente (Grant e Dixit, 2015 ; Heymsfield e Wadden, 2017).

Em adição ao acúmulo de lípidos nos depósitos adiposos, a condição de obesidade promove o acúmulo anormal de lipídeos em outros tecidos, fenômeno conhecido como deposição ectópica de gordura, o que promove o prejuízo da função desses tecidos. Por exemplo, o aumento do tecido adiposo perirrenal pode contribuir para o quadro de hipertensão, o aumento de gordura muscular pode contribuir para resistência à insulina, o aumento dos lipídeos no fígado pode ocasionar esteatose hepática e cirrose (Hall et al., 2010; Heymsfield e Wadden, 2017).

Existem indivíduos obesos que são classificados como “obesos metabolicamente saudáveis” quando não apresentam alteração de resistência/sensibilidade à insulina (Engin, 2017). No entanto, isso parece ser uma questão temporal, uma vez que o acúmulo de gordura, a longo prazo, induz uma condição pró-inflamatória crônica e produz consequências danosas ao organismo como a diabetes, eventos cardiovasculares, afecções musculoesqueléticas, transtornos respiratórios, desenvolvimento de alguns tipos de câncer, e aumento da mortalidade (OMS, 2018).

Uma proporção considerável da população permanece com o IMC adequado, apesar de viverem em ambientes obesogênicos, sugerindo que o ganho de peso pode também ser determinado por fatores genéticos intrínsecos de cada indivíduo. Ou seja, os genes e o ambiente interagem em um sistema complexo que regula o balanço energético e a composição corporal (Bray et al., 2016). Estudos de associação genômica ampla ou *Genome Wide Association Studies* (GWAS) - identificaram cerca de 150 variantes genéticas que foram significativamente associadas ao risco de obesidade (Bray et al., 2016). Os principais achados são variações genéticas relacionadas as vias de regulação neural do consumo alimentar (*bdnf*, *mc4r*, *negr1*), sinalização do glutamato, secreção e ação da insulina, metabolismo energético e adipogênese (*fto*, *tcf7l2*, *irs1*, *foxo3*, *rptor*, *ptbp2*, *map2k5*, *mapk3*) (Locke et al., 2015).

A discussão da literatura mais recente contribui para o entendimento de que a luta contra a obesidade está longe de ser vencida (Hall et al., 2013). Portanto, por ser considerada uma epidemia, se faz cada vez mais necessário compreender a obesidade e combatê-la de modo mais satisfatório. Desta forma,

busca-se o desenvolvimento de novas abordagens de intervenção e, para isso, o entendimento dos mecanismos básicos fisiológicos e moleculares para desvendar possíveis alvos terapêuticos permanece relevante.

Balanço Energético

O conceito de balanço energético pode ser definido como o resultado da diferença entre a ingestão energética, obtida pela alimentação, e o gasto energético para sustentar a taxa metabólica basal, a termogênese (adaptativa e pós-prandial) e as atividades físicas. O desequilíbrio do balanço energético pode levar tanto ao emagrecimento, como a estocagem do excesso de energia em forma de triglicerídeos no tecido adiposo, ocasionando o acúmulo de gordura corporal e consequentemente, a obesidade (Speakman, 2004).

A taxa metabólica basal pode ser definida como o gasto energético mínimo para funcionamento dos tecidos do corpo, considerando um organismo adulto, alimentado, em repouso e em ambiente termoneutro. Esta taxa pode ser mensurada indiretamente através do consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e diretamente pela produção de calor. Por ser extremamente variável em diferentes condições ambientais e biológicas, a determinação da taxa metabólica basal em condições padrão possibilita um referencial importante para observação dos efeitos e respostas do organismo em diferentes condições (Hulbert e Else, 2004).

A taxa metabólica basal representa cerca de 60-70% do gasto energético total diário do organismo e decai 1 a 2% por década, após a segunda/terceira década de vida em humanos, em função da predominância de catabolismo em relação ao anabolismo e consequente perda de massa magra que ocorre ao longo do envelhecimento (McMurray et al., 2014). Este gasto metabólico compreende a energia gasta para execução das funções vitais celulares, equilíbrio osmótico e atividades autônomas dos órgãos e sistemas como respiração, batimento cardíaco, etc.. Em uma temperatura ambiente padrão (22°C), de forma global, a massa magra é a maior contribuinte para a taxa metabólica, mas por unidade de massa, outros órgãos como fígado e cérebro são metabolicamente mais ativos (Durnin, 1981; Blondin e Haman, 2018).

A atividade física tem um impacto variável sobre a taxa metabólica basal, de acordo com o tipo, intensidade e frequência realizada. Exercícios aeróbios, apesar de extremamente eficazes para a diminuição da gordura corpórea, não contribuem significativamente para o aumento da taxa metabólica basal (De Feo et al., 2003). O exercício anaeróbio, do tipo de repetição com uso de pesos, além de diminuir a gordura corpórea, é capaz de elevar a taxa metabólica basal por aumentar o volume de massa magra (Pratley et al., 1994, Schwingshackl et al., 2013). A atividade física aumenta o gasto energético via oxidação de substratos energéticos, especialmente de ácidos graxos, com maior ou menor velocidade dependendo da intensidade e duração. Durante a atividade física, particularmente intensa, há a liberação de catecolaminas e diminuição do fluxo sanguíneo visceral. Uma vez que o fígado é o principal local de degradação da adrenalina, durante o exercício, essa degradação é diminuída (Warren et al 1984). Este hormônio promove a lipólise no tecido adiposo durante a atividade física, e mesmo após o seu término, a taxa de lipólise se mantém aumentada por um período de cerca de 24 horas (Tsiloulis e Watt, 2015). Outros hormônios contra-regulatórios da insulina também participam da homeostase energética durante a prática da atividade física.

A termogênese adaptativa refere-se à geração de calor pelo corpo em resposta a estímulos externos, como a exposição a baixas temperaturas, para manutenção da temperatura corporal em níveis fisiológicos. A capacidade de termogênese adaptativa foi crítica durante a evolução dos mamíferos para que conseguissem ocupar nichos ambientais mais frios, e permitisse a sobrevivência e reprodução. É dividida principalmente em termogênese dependente e não-dependente de tremor; sendo respectivamente o músculo e o tecido adiposo marrom seus órgãos efetores (Chouchani et al., 2019). Portanto, em uma condição de exposição ao frio, a contribuição dos tecidos para o gasto energético total é alterada sendo o músculo e o tecido adiposo marrom os órgãos mais relevantes (Blondin e Haman, 2018). A termogênese ocorre também no período pós-prandial pelo efeito térmico dos processos de digestão e absorção dos nutrientes, podendo representar 10% do gasto energético total neste período (McArdle e William, 1986), dependendo do tipo e quantidade de alimentos ingeridos. A ingestão de proteínas leva ao aumento da taxa metabólica,

enquanto carboidratos e gorduras possuem um efeito térmico bem modesto (Calcagno et al., 2019).

O hipotálamo é uma região fundamental determinante do balanço energético, pois participa dos controles de ingestão alimentar, da velocidade do metabolismo e da temperatura corpórea. A ingestão alimentar é regulada no hipotálamo, na região do núcleo arqueado. Nesta região existem receptores específicos para insulina e leptina, hormônios classicamente descritos como reguladores da ingestão alimentar. A administração de leptina e insulina diretamente no cérebro reduzem a ingestão alimentar, e em contrapartida, a deficiência desses hormônios leva ao efeito contrário (Schwartz et al., 2000). Em 1994, Zhang e colaboradores identificaram um gene envolvido na regulação da quantidade de gordura corporal, chamado gene *ob*, elucidando uma mutação que causava obesidade em camundongos. Os camundongos que eram homozigotos para a mutação (*ob/ob*) se tornavam obesos devido à hiperfagia e apresentavam diminuição de metabolismo e de termogênese via tecido adiposo marrom. Em seguida foi identificado que o gene *ob* codifica o hormônio peptídico denominado leptina. A leptina regula a ingestão alimentar de forma a reduzir o apetite pela inibição hipotalâmica da formação do neuropeptídeo Y (que estimula o comportamento de ingestão alimentar), e pelo aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos. Apesar de a leptina ser expressa em células do trato gastrointestinal, músculo e no cérebro, ela é majoritariamente expressa e secretada pelo tecido adiposo – se tornando um excelente biomarcador do teor de gordura corporal (Zhang e Chua, 2017).

Em 1953, o estudo de Mayer e Barnett sugeriu que animais que não produziam o “fator de saciedade” (hoje definido ser a leptina) possuíam uma deficiência na termogênese por serem severamente intolerantes ao frio. Este estudo contribuiu para o entendimento de que estes animais teriam menor atividade metabólica e, portanto, seriam mais susceptíveis ao desenvolvimento de obesidade, consequentemente atribuindo à leptina a função termogênica. No entanto, nestes animais *ob/ob*, não há diferença nos níveis da proteína desacopladora 1 (UCP1) – classicamente descrita como responsável pela termogênese do tecido adiposo marrom – e também não foi observado aumento do consumo de oxigênio quando animais *wild type* foram estimulados com

leptina. Portanto, não foi possível ainda constatar que a intolerância ao frio estava associada com ação termogênica da leptina (Fischer et al., 2020). Apesar da ausência da função termogênica, estudos sugerem que a leptina pode promover um aumento da temperatura corpórea por reduzir a perda de calor através de vasoconstrição na região da cauda (Fischer et al., 2016).

No hipotálamo, na região do núcleo arqueado, existem populações neuronais distintas que integram e coordenam sinais periféricos sobre o estado nutricional do organismo. A população neuronal que promove efeitos anorexigênicos (inibidores do apetite) é caracterizada pela co-expressão de pro-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína e anfetaminas (CART). A população neuronal anorexigênica é ativada durante o período pós-prandial, em que existe aumento dos níveis plasmáticos de leptina e insulina. A leptina inibe neurônios orexigênicos, NPY e AgRP (peptídeo relacionado com a proteína agouti), enquanto ativa os neurônios que expressam POMC. A ativação destes neurônios pela leptina cliva a pró-opiomelanocortina (POMC) em neuropeptídeos como o hormônio estimulante de melanócitos alfa (α -MSH), que é fundamental na regulação da transcrição do hormônio TRH - que ocorre no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) (Campos et al., 2020). O TRH promove a ativação de neurônios que inervam o BAT, aumentando o tônus simpático deste órgão, além de aumentar a transcrição de UCP1 via hormônios tireoideanos (Iwen et al., 2018).

Camundongos nocaute para a expressão de receptores de leptina nos neurônios POMC, apresentam aumento do peso corpóreo correspondente ao aumento de massa adiposa, demonstrando que a ausência da sinalização de leptina em POMC prejudica o balanço energético, aumentando a massa adiposa (Balthasar et al., 2004). A administração de uma dose de 500 ng de leptina diretamente no núcleo arqueado é capaz de induzir a ativação simpática no rim e aumento da pressão arterial (Rahmouni, 2010). A ablação do receptor de leptina no núcleo arqueado revoga a ativação simpática induzida pela leptina (Harlan et al., 2011). O efeito de ativação simpática causado pela leptina se mostra dose-dependente, porém ausente em ratos obesos, sugerindo que este efeito só acontece se os receptores de leptina estiverem preservados (Haynes et al., 1997).

Adiposidade

O tecido adiposo é um tecido com múltiplas funções, sendo a mais conhecida, o armazenamento de lipídeos e a produção de diversas moléculas regulatórias, tais como hormônios e adipocinas, que atuam local e sistemicamente promovendo um *cross-talk* entre diversos órgãos (Fonseca-Alaniz et al., 2006; Oliveira, 2005). Classicamente, o tecido adiposo é dividido em dois tipos: tecido adiposo branco (*White Adipose Tissue*: WAT) e marrom (*Brown Adipose Tissue*: BAT). Morfologicamente, o WAT é composto por uma grande gotícula lipídica, constituída predominantemente de triacilglicerol (TG). O BAT, por sua vez, é essencialmente composto por múltiplas gotículas lipídicas e inúmeras mitocôndrias, além de possuir maior vascularização em relação ao WAT (Cypess et al., 2009).

Existem vários fatores relacionados a determinação da origem embrionária destes tecidos. Estudos de "*lineage-tracing*" revelaram que adipócitos marrons possuem progenitor comum às células de músculo-esquelético e ambas expressam o marcador fator 5 miogênico (*myogenic factor 5:MYF5*) (Cristancho e Lazar, 2011). A identificação do gene PRDM16 também foi de grande importância para o entendimento do tecido adiposo marrom por sua função essencial na indução do fenótipo deste tecido. Estudos demonstram que o PRDM16 regula a expressão de genes específicos do tecido adiposo marrom, enquanto seu silenciamento pode reverter a diferenciação induzindo miogênese (Seale et al., 2008). O PRDM16 também é encontrado no tecido adiposo branco subcutâneo durante a indução do processo de amarronzamento ou "*browning*" deste tecido, o que será descrito a seguir. Em contrapartida, o WAT se desenvolve a partir de células progenitoras MYF5 negativas. A expressão dos fatores de transcrição C/EBP e PPAR γ , entre outros, é determinante da conversão de pré-adipócitos em adipócitos brancos maduros (Cristancho e Lazar, 2011).

Além da morfologia e origem distintas, há inúmeras diferenças funcionais entre WAT e BAT. O WAT é responsável pela maior parte dos processos de síntese, captação, esterificação, armazenamento, e também liberação de ácidos

graxos (Eberlé et al., 2004). Nesse sentido, o WAT está diretamente relacionado com a obesidade, devido a sua enorme capacidade de acomodar excesso de TG provenientes do balanço energético positivo prolongado. O BAT é um tecido que apresenta alta capacidade oxidativa, podendo aumentar a taxa metabólica corporal, consumindo substratos e dissipando energia e, portanto, contribuindo para redução de adiposidade e regulação da temperatura corporal (Kajimura et al., 2008, Lowell e Spiegelman, 2000). O BAT é encontrado principalmente na região supra clavicular (iBAT) em humanos e camundongos e considerado tecido especializado na produção de calor através da oxidação de substratos energéticos, como ácidos graxos e glicose. Esse tecido expressa grandes quantidades da proteína desacopladora 1 (UCP1) que é adicionalmente super-expressa e ativada em condições de frio. A UCP1 tem como função desacoplar a respiração celular (consumo de oxigênio pela atividade da cadeia transportadora de elétrons) da síntese de ATP (fosforilação oxidativa) nas mitocôndrias, promovendo a dissipação do potencial eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. Desta forma, a dissipação do potencial de prótons gera calor e reduz a produção de ATP às custas do consumo de grandes quantidades dos substratos energéticos – sendo esta a via canônica da termogênese adaptativa em mamíferos.

Certas regiões do tecido adiposo branco (subcutâneo e perivascular) podem ganhar características de tecido adiposo marrom quando o organismo é exposto a um ambiente com baixa temperatura sendo este um mecanismo adaptativo em que a via canônica é dependente de receptores beta-adrenérgicos e a via não-canônica independente destes receptores – originando o chamado tecido adiposo bege glicolítico (*g-beige*) (Chen et al., 2019). Portanto, o tecido adiposo bege (ou também chamado *brite*) é tecido adiposo branco induzível a se tornar marrom, processo denominado de *browning* ou amarronzamento. Este tem grande potencial como alvo de tratamento para a obesidade em humanos (Wu J, et al., 2013). Em condições de *browning*, parte do tecido adiposo branco passa a expressar quantidades significativas de UCP1 e produzir calor (Oliver et al., 2020). Além da exposição ao frio, o *browning* também pode ser estimulado por componentes específicos da dieta, exercício físico, irisina e agonistas beta-adrenérgicos (via receptor beta-3 em roedores e beta-2 em humanos) (Blondin

et al.,2020). A estimulação noradrenérgica promove também a proliferação de pré-adipócitos, a diferenciação em adipócitos bege e regula diretamente a expressão gênica da UCP1 (Cohen e Kajimura, 2021; Cannon e Nedergaard, 2004).

Lipogênese e Lipólise

O adipócito branco é especializado na síntese e esterificação de ácidos graxos para estocar energia na forma de triglicerídeos (TG), bem como na hidrólise de TG conforme a demanda energética, processos denominados lipogênese e lipólise respectivamente. A síntese de TG é um processo que ocorre essencialmente no tecido adiposo e fígado, mas também em menor quantidade em outros órgãos, como os músculos (Saponaro et al., 2015). Nos seres humanos, o fígado é o principal sítio de síntese *de novo* de TG, que ocorre a partir do excesso de qualquer macronutriente disponível. Os TG provenientes da absorção intestinal da dieta e transportados pelos quilomícrons são fontes de ácidos graxos para a lipogênese (esterificação) no tecido adiposo. O TG proveniente dos quilomícrons ou das VLDL (fígado) sofrem ação da enzima lipoproteína lipase que interage com a apolipoproteína CII no compartimento vascular, liberando os ácidos graxos que são captados por todos os tecidos do corpo, incluindo o adiposo. No adipócito, ocorre a esterificação dos ácidos graxos a partir da ativação do ácido graxo a acil-coenzima-A, sendo então transferido ao glicerol-3-fosfato (G3P) que é formado a partir do catabolismo da glicose na via glicolítica. Por esta razão, os adipócitos necessitam metabolizar a glicose para sintetizar os TG (Saponaro et al., 2015). Assim, na condição pós-prandial, existe a regulação positiva da via glicolítica pela ação da insulina, estimulando a lipogênese.

A lipólise é a hidrólise dos TG dos tecidos adiposos para liberar ácidos graxos em situações de privação alimentar ou elevada demanda energética. Estes ácidos graxos podem sofrer o processo de beta-oxidação na maior parte dos tecidos do corpo, sendo a principal fonte de energia para tecidos como fígado, coração e músculos esqueléticos (Bartlett e Eaton, 2004). As catecolaminas exercem a ação mais potente catabólica, estimulando a lipólise.

O glucagon e o cortisol também atuam como hormônios lipolíticos que estimulam a degradação dos TG das gotículas lipídicas. A insulina exerce ação oposta, inibindo a lipólise e estimulando a lipogênese (Saponaro et al., 2015).

A hidrólise dos TG compreende diferentes etapas sequenciais por meio da ação de diferentes lipases. Na primeira etapa, a hidrólise do TG em diacilglicerídeos (DAG) e ácido graxo (AG), é obtida pela ação da trigliceridase do tecido adiposo (ATGL). Esta etapa é chamada de lipólise basal. Os DAG são então hidrolisados pela lipase hormônio-sensível (HSL) à monoacilgliceróis (MAG) com a liberação do segundo AG. Esta é a etapa limitante e regulada pela insulina (inibição) e catecolaminas (estimulação). Finalmente, os MAG são completamente hidrolisados com a liberação do último AG e um glicerol pela ação da enzima monoacilglicerol lipase (MGL) (Saponaro et al., 2015). A ATGL está presente também, além dos tecidos adiposos (tecido adiposo branco e marrom), em tecidos como fígado, músculo e coração e está localizada na superfície das gotículas de lipídios e no citosol. Esta enzima é ativada no período de jejum, por ação de glicocorticoides e agonistas do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) (Shaw et al., 2013). O exercício físico aumenta a expressão de ATGL no músculo, promovendo maior utilização e oxidação de ácidos graxos (Huijsman et al., 2009). A enzima HSL é ativada principalmente por estímulo β -adrenérgico e inativada pela insulina. Os primeiros estudos na década de 1960 concluíram que HSL era a enzima limitante da taxa de hidrólise de TG, mas estudos subsequentes em camundongos HSL knockout contribuíram para elucidar o papel dessa enzima. Camundongos com deficiência de HSL foram capazes de hidrolisar parcialmente TG e não mostraram aumento de TG no tecido adiposo ou no fígado, mas tiveram um aumento de intracelular de DAG. O aumento de DAG no tecido adiposo está associado com diminuição da capacidade de liberação de ácidos graxos e glicerol do tecido adiposo. No tecido adiposo marrom, o aumento do DAG promove alterações morfológicas e funcionais como aumento do conteúdo lipídico e hipertrofia do tecido (Haemmerle et al., 2002).

Uma vez liberados dos depósitos adiposos, os AG da circulação sanguínea podem entrar nos diversos tecidos do corpo via proteínas transportadoras de ácidos graxos, tais como CD36 e as FATP (*fatty acid*

transport proteins) para em seguida sofrerem o processo de beta-oxidação que ocorre dentro das mitocôndrias. Primeiramente, os ácidos graxos são ativados a acil-CoA pela acil-CoA sintetase. A molécula de acil-CoA pode então ser transferida para a mitocôndria por um sistema composto de três proteínas: CPT1 (Carnitine palmitoyltransferase 1), CACT (carnitine acylcarnitine translocase) e CPT2 (Carnitine palmitoyltransferase 2). No interior da mitocôndria, o acil-CoA entra no processo catabólico de beta-oxidação, no qual sofre remoções sucessivas de unidades de dois átomos de carbono, promovendo a formação de acetil-CoA, os quais entrarão no ciclo do ácido cítrico. As reações deste ciclo resultam na formação de carreadores de elétrons reduzidos (FADH₂ e NADH), que são então oxidados por complexos da cadeia respiratória. A passagem dos elétrons doados pelas coenzimas FAD e NAD⁺ na cadeia respiratória gera um gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria, e a maior parte deste gradiente é usado pela enzima ATP sintetase para fosforilar ADP formando ATP.

Quando há um estímulo ambiental como por exemplo baixas temperaturas, há um aumento do tônus simpático e consequente liberação de catecolaminas pela inervação simpática sobre o tecido adiposo marrom, ativando-o. Este estímulo do tecido promove a hidrólise dos TG armazenados nas gotículas lipídicas. Os ácidos graxos liberados ativam a UCP1, superando sua inibição pelo ATP no estado de repouso. O substrato inicial para que ocorra a ativação da UCP1 é o ácido graxo liberado da lipólise da gotícula lipídica do tecido, no entanto, após o início da atividade da UCP1, outros substratos provenientes da circulação são utilizados (ácidos graxos e glicose circulantes). A norepinefrina induz a ativação da lipoproteína lipase (LPL) localmente, que irá degradar os quilomícrons e as VLDL presentes na circulação. Os ácidos graxos liberados neste processo serão captados e utilizados pelo tecido adiposo marrom tanto como fonte de energia como ativando a UCP1 (Nedergaard e Cannon, 2010).

Termogênese

A termogênese é um processo catabólico que consome energia especificamente para produção de calor principalmente em resposta à mudanças de temperatura do ambiente. O centro termorregulatório no hipotálamo é quem coordena a termorregulação corpórea. O hipotálamo recebe sinais dos receptores sensíveis a temperatura do tipo TRP (*transient receptor potential*), altamente expressos em terminações nervosas presentes na pele, no estômago, tecido adiposo marrom e branco (Rossato et al., 2014). Em seres humanos, o receptor TRPM8 é descrito como o sensor de frio (Bautista et al., 2007) enquanto o receptor TRPV1 é o sensor de calor (Gavva, 2008). A ablação combinada dos receptores TRPV1 e TRPM8 abole as respostas comportamentais da exposição ao frio e calor, indicando que esses dois subconjuntos juntos definem o conjunto necessário de termorreceptores (Pogorzala et al., 2013). Termorreceptores na pele, juntamente com neurônios termosensíveis na medula espinhal e no hipotálamo, promovem um feedback do estado da temperatura corpórea do organismo, coordenando ações fisiológicas para manutenção da temperatura. Os efetores fisiológicos são involuntários, principalmente respostas autonômicas que geram ou dissipam calor. Em resposta ao calor, a região anterior do hipotálamo induz a atividade simpática das fibras colinérgicas que inervam glândulas sudoríparas, estimulando a transpiração e consequente perda de calor; inibe estímulos de termogênese e diminui a atividade simpática sobre os vasos sanguíneos, promovendo vasodilatação. Os efeitos da vasodilatação são aumentados em espécies que possuem órgãos termorreguladores especializados, como cauda de ratos e camundongos, ou orelhas de coelho, que podem dissipar calor rapidamente devido à sua grande área de superfície (Tan et al., 2018). As respostas fisiológicas primárias à exposição ao frio são desencadeadas pela região posterior do hipotálamo, onde há a indução da produção dos hormônios tireoidianos e catecolaminas para ativar a termogênese. As catecolaminas ativam a termogênese sem tremor no tecido adiposo marrom via receptores beta adrenérgicos; promove vasoconstrição para diminuir a perda de calor nos vasos sanguíneos via receptor alfa 1 e promove a termogênese dependente de tremor nos músculos esqueléticos (Tan e Knight, 2018).

A termogênese dependente de tremor consiste na produção de calor pelo contração muscular, garantindo a manutenção da temperatura corpórea em condição aguda de exposição ao frio. O resfriamento da pele estimula os termorreceptores cutâneos sensíveis ao frio, localizados na epiderme. Esse sinal sensorial ascende ao hipotálamo estimulando os neurônios promotores de tremores. Estes neurônios inervam as fibras musculares e, estas, quando excitadas, promovem a contração de regiões específicas dos músculos que se propagam ao longo do sarcolema e das fibras musculares (Blondin e Haman, 2018). O substrato para termogênese no músculo é preferencialmente a glicose derivada do glicogênio muscular. Apesar da termogênese muscular a partir do tremor ser bastante efetiva, existem prejuízos decorrentes do alto consumo de substrato ou da possibilidade de interferir nos movimentos voluntários (Meigal, 2002), além de não se sustentar por longo tempo devido a fadiga muscular.

Existem outros mecanismos mais específicos para produção de calor, denominado *nonshivering thermogenesis* ou termogênese independente de tremor. Esta termogênese é mediada pela ativação do BAT, formação do tecido adiposo bege e utilização de ciclos fúteis de produção e degradação de ATP, como SERCA/sarcoplina e creatina-quinases nos músculos (Yoneshiro et al., 2020).

A termogênese no BAT é controlada via sistema nervoso simpático (Cannon and Nedergaard, 2004). Um aumento do tônus simpático libera noradrenalina, que age nos receptores beta adrenérgicos no BAT. Os receptores beta adrenérgicos, são acoplados a proteína G, e uma vez ativados, aumentam o AMP cíclico intracelular, ativando a proteína quinase A (PKA). A PKA ativa a enzima lipase hormônio sensível (HSL), promovendo lipólise e liberando ácidos graxos que ativam as UCPs nas mitocôndrias. A capacidade oxidativa dos tecidos adiposos marrom e bege se deve a alta expressão de UCP1 na membrana interna da mitocôndria, proteínas estas que dissipam o gradiente de prótons gerado pela passagem de elétrons pela cadeia respiratória (Gimeno et al., 1997). A formação de ATP é então reduzida por competição entre ATP sintetase e UCP1. Pode-se dizer, assim, que a respiração (transferência de elétrons através da cadeia respiratória para o oxigênio) foi desacoplada da produção de ATP. A primeira UCP descrita foi inicialmente chamada de

termogenina, e posteriormente denominada UCP1. Ela é abundantemente expressa em tecido adiposo marrom conferindo-lhe alta capacidade termogênica (Gimeno et al., 1997). Outras proteínas estruturalmente homólogas a UCP1 foram identificadas, estando presente em vários tecidos (Fleury et al., 1997) e também em plantas e micro-organismos (Vercesi et al., 2006). Embora, as UCP2 e UCP3 pareçam promover algum grau de vazamento de prótons, suas funções fisiológicas parecem estar mais ligadas ao controle do balanço redox celular do que à produção de calor (Laskowski e Russell, 2008; Kowaltowski et al., 2009). O termo clássico *nonshivering thermogenesis* se refere à adaptação dos mamíferos ao frio crônico (semanas) (Cannon e Nedergaard, 2010), o qual é dependente da atividade da UCP1 do tecido adiposo marrom.

Como mencionado anteriormente, existem também outros mecanismos de termogênese independentes da UCP-1, como o ciclo fútil de cálcio dependente da bomba de cálcio transmembrana dependente de ATP do retículo sarcoplasmático (SERCA) no músculo. Apesar deste mecanismo ser encontrado principalmente em miócitos no tecido muscular esquelético, adipócitos bege expressam uma isoforma da SERCA, a SERCA2B, sendo uma evidência de termogênese independente de UCP-1 também neste tecido (Ikeda et al., 2017).

Os níveis de cálcio muscular são finamente regulados pela *captação* do cálcio pelo retículo sarcoplasmático SERCA e sua *liberação* através dos receptores de rianodina e inositol trifosfato (IP3R). Durante as contrações musculares, o peptídeo sarcolipina (SLN) se liga na SERCA permitindo – com gasto de energia – a captação de cálcio do citosol pelo retículo sarcoplasmático, promovendo o relaxamento muscular antes da próxima contração. Quando o cálcio citosólico está em altas concentrações, a interação SLN/SERCA desacopla a função de bombeamento de cálcio para o retículo, resultando em um constante consumo de ATP e dissipação de energia - promovendo um ciclo fútil e geração de calor (Cohen e Kajimura, 2021). Esta via parece ser estimulada pela exposição ao frio pelos receptores adrenérgicos alfa-1 e, classicamente, beta-3. Este mecanismo de termogênese, associado a termogênese dependente de UCP-1, parecem ser os mecanismos fundamentais da endotermia, uma vez que animais duplamente nocautes – tanto para UCP1 como para SLN – são incapazes de sobreviver à exposição prolongada ao frio, (Rowland et al., 2015).

Efeitos da Temperatura Ambiente

A temperatura do ambiente é determinante na taxa metabólica corporal e da termogênese adaptativa em mamíferos. Os biotérios de pesquisa usualmente alojam os animais a uma temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, que é considerada o limite de conforto para humanos, porém não representa o ideal para roedores (Keijer e Speakman, 2019). A termoneutralidade é relevante para o entendimento do desenvolvimento da obesidade tanto em humanos como em camundongos (Feldmann, 2009). O alojamento de camundongos em biotérios a 22°C pode causar estresse crônico exemplificado pelo aumento da frequência cardíaca (Swoap, 2008) e aumento do consumo alimentar em 50-60% para manter a temperatura corpórea (Golozubova et al., 2004).

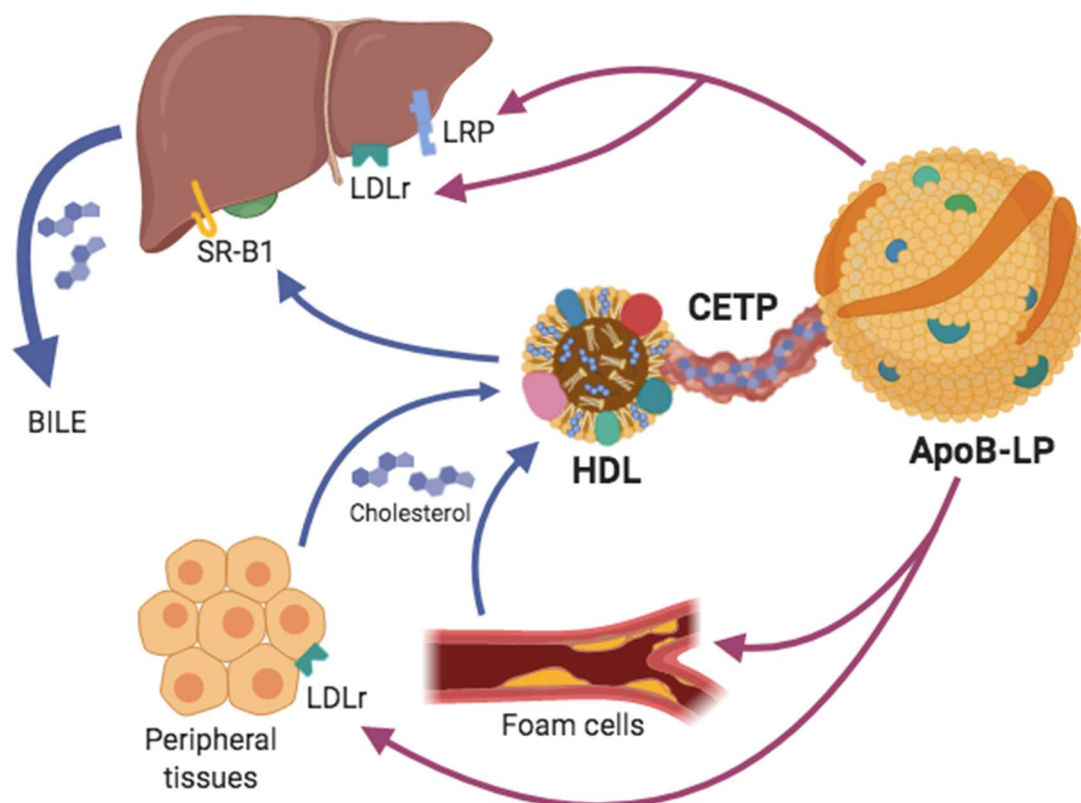
Como mencionamos acima, a termogênese na maioria dos mamíferos ocorre de duas formas principais: contração muscular (tremor) e independente de tremor, promovida principalmente pelo tecido adiposo marrom (Cannon e Nedergaard, 2011). O tremor muscular ativado na exposição aguda ao frio pode aumentar o consumo de oxigênio em até 5 vezes em humanos (Eyolfson et al., 2001) e a fadiga muscular ocorre após período prolongado de exposição ao frio (Wijers et al., 2009). Desta forma, a termogênese sem tremor é especialmente importante na aclimação ao frio. Nesta termogênese, a UCP-1 desempenha papel fundamental na ativação do tecido adiposo marrom e geração de calor (Cannon and Nedergaard, 2017) como descrito acima. Por outro lado, em termoneutralidade ($28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ para camundongos), a atividade da UCP1 no tecido adiposo marrom é inibida em razão de uma redução da atividade simpática direcionada a atividade do BAT. Este fenômeno foi demonstrado por respostas similares de consumo de oxigênio em resposta a norepinefrina, em camundongos nocaute para UCP1 e controles, em termoneutralidade. No entanto, quando expostos a 4°C , os animais nocaute para UCP1 apresentaram consumo de oxigênio similar aos níveis dos animais alojados a 30°C , enquanto os animais controle apresentaram aumento do consumo de oxigênio. Este resultado sugere que, em termoneutralidade, todo o calor produzido é de fontes diferentes do tecido adiposo marrom, porém quando há exposição ao frio, a contribuição do BAT é cerca de 10-20% (Cannon and Nedergaard, 2011).

A exposição ao frio aumenta o volume e a atividade do BAT em adultos (Saito et al., 2009; Blondin et al., 2014), aumenta o consumo de oxigênio e reduz a obesidade em camundongos *wild type* (Kajimura et al., 2008, Lowell e Spiegelman, 2000). Além disso, como mencionado anteriormente, exposição prolongada ao frio induz características do tecido adiposo marrom em depósitos de tecido adiposo branco (Okamatsu-Ogura et al., 2018). Em função da glicose e dos ácidos graxos serem os principais substratos para a atividade metabólica do BAT, sua ativação melhora a tolerância à glicose, a sensibilidade à insulina (Stanford et al. 2013) e os níveis de triglicerídeos plasmático em humanos e camundongos (Iwen et al. 2017). A termoneutralidade inativa a função termogênica do BAT, diminuindo a taxa metabólica corporal e aumentando a adiposidade (Shi et al., 2017; Cui et al., 2016).

Proteína de transferência de colesterol éster (CETP)

A proteína de transferência de colesterol éster (CETP) é uma glicoproteína plasmática com uma sequência de 476 aminoácidos e peso molecular aparente de 74 KDa (Hesler et al, 1987). Sua expressão natural já foi descrita em várias espécies: peixes, répteis, e mamíferos, incluindo coelho, hamster, primatas e humanos, mas não em ratos e camundongos (Ha e Barter, 1982) e cães (Tsutsumi et al., 2001). Nos seres humanos esta glicoproteína é secretada predominantemente pelo fígado, e os órgãos que mais expressam o RNAm da CETP são o fígado, baço e tecido adiposo, enquanto níveis mais baixos de expressão são encontrados no intestino delgado, adrenal, rim e coração (Drayna et al., 1987).

A função mais conhecida e estudada da CETP é promover a troca de TG das lipoproteínas ricas em TG (quilomicrons, VLDL e IDL) por colesterol éster das HDL (Tall, 1995), modificando o transporte reverso de colesterol para o fígado direto (via HDL) e indireto (via LDL) (ver esquema abaixo). Como resultante, a CETP reduz a concentração plasmática de HDL-colesterol, podendo aumentar a de LDL-colesterol, o que tem sido associado com aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose.



Esquema simplificado do transporte reverso de colesterol. As HDL removem excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos e os transportam para o fígado via receptor SRB1, de onde este pode ser excretado do corpo na bile. Este é o chamado transporte reverso de colesterol direto. A CETP transfere colesterol das HDL para as lipoproteínas que contêm apoproteína B (VLDL, IDL e LDL), as quais o levam para os tecidos em proliferação, gônadas e fígado. Este último representa o chamado transporte reverso de colesterol indireto. Em caso de redução dos receptores de LDL, a ação da CETP resulta em acúmulo de LDL e aumento de risco de aterosclerose (Oliveira e Raposo, 2020).

Conhecendo-se o papel protetor das HDL contra o desenvolvimento de aterosclerose, tornou-se atraente a busca de inibidores farmacológicos da CETP com o propósito de aumentar HDL e promover uma intervenção anti-aterogênica. Embora os estudos clínicos com primeiro inibidor, torcetrapib, tenham sido interrompidos por seus efeitos adversos, tais como aumento de eventos cardiovasculares e aumento de mortes (Clark, 2006; Pearson, 2006; Tall, 2007), e dois outros inibidores (dalcetrapib e evacetrapib) tenham falhado em demonstrar redução de risco de morte por doença cardiovascular, um quarto

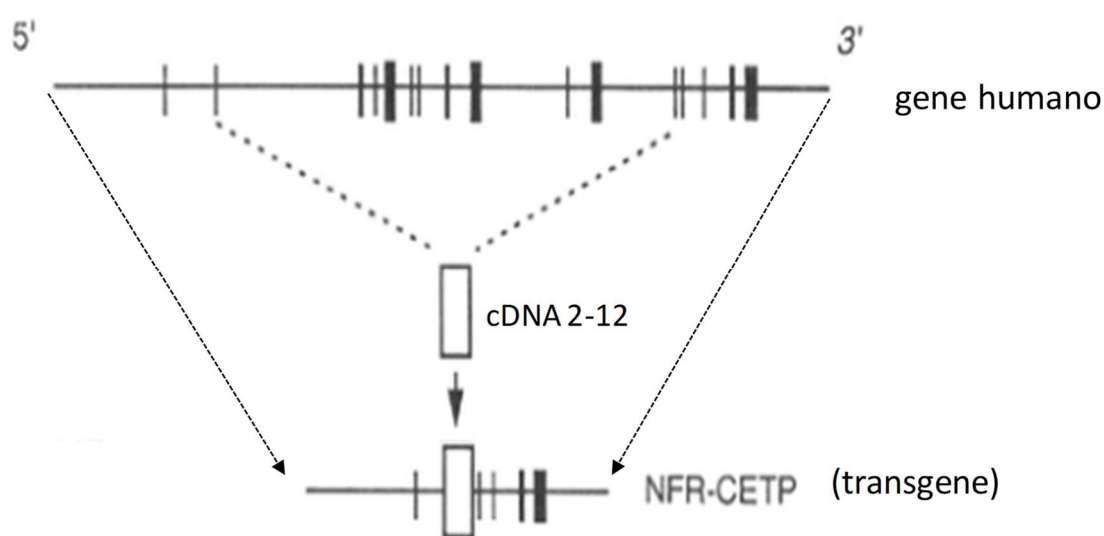
composto inibidor (anacetrapib) apresentou redução modesta, mas significativa, nos eventos cardiovasculares (Bowman et al., 2017).

A expressão gênica da CETP pode ser regulada por estímulos nutricionais, hormonais e inflamatórios (Tall et al., 1995; Oliveira e de Faria, 2011; Oliveira e Raposo, 2020). Foi descrito anteriormente que o hormônio tireoidiano aumenta sua atividade (Berti et al., 2001), enquanto os corticosteroides a reduzem (Tall, 1995; Buning, 2017). Em aspectos nutricionais, ácidos graxos ômega 3 regulam positivamente a expressão da CETP, assim como os fibratos, o que sugere uma regulação mediada por PPAR-alfa (Raposo et al., 2014). Em espécies como coelhos (Quinet et al., 1990), macacos (Quinet et al., 1991), hamsters (Jiang et al., 1991), camundongos transgênicos (Jiang et al., 1992) e seres humanos, observou-se aumento do RNAm da CETP em resposta à dieta rica em colesterol. A hipercolesterolemia endógena (genética) também induz aumento da expressão do gene da CETP por um mecanismo similar ao observado com dieta rica em colesterol. Oliveira et al. (1996) localizaram na região do promotor do gene da CETP sequências responsivas ao colesterol, e Lou & Tall (2000) mostraram que o transativador LXR (*liver X receptor*) era o responsável pela ativação do gene da CETP na vigência de dieta rica em colesterol.

Por meio de sua ação na troca de lipídeos neutros, ou outras ações desconhecidas, a CETP parece desempenhar outras funções além de seu papel no transporte reverso de colesterol. Ainda de maneira controversa, estudos tem relacionado a atividade da CETP com o retardamento do aparecimento dos sintomas de Alzheimer (Rodríguez et al, 2006; Sanders et al, 2010) e com longevidade (Barzilai et al, 2003; Hirano et al, 1997; Cellini et al, 2005; Capri et al, 2006). Além disso, evidências da literatura mostram que a CETP pode ter ação anti-oxidante, anti-inflamatória e redutora da massa adiposa (Oliveira e de Faria, 2011; Oliveira e Raposo, 2020).

O modelo transgênico que expressa o gene da CETP

Há cerca de 30 anos foi desenvolvido um camundongo que expressa uma versão do gene humano da CETP (Jiang et al. 1992). O transgene é constituído de parte do cDNA contendo os exons 2 ao 12, e o restante das sequências genômicas naturais, isto é, exon e intron 1, exons e introns 13, 14, 15 e 16. Além disso, na construção do transgene preservou-se o promotor e regiões regulatórias *upstream* e *downstream* do gene, conforme esquematizado abaixo e denominado *natural flanking regions CETP mini-gene* ou NFR-CETP.



Esquema do transgene humano da CETP inserido no genoma de camundongos. No topo é mostrada a organização do gene humano. O mini-gene derivado foi construído combinando os fragmentos genômicos 5' e 3' com a porção de cDNA que compreende os exons 2-12, preservando o promotor natural e as regiões regulatórias (*natural flanking sequences*, NFR) intactas *upstream* (5' 3.5 Kb) e *downstream* (3' 2.5 Kb), modificado de Jiang et al. (1992).

Este modelo animal foi e ainda é muito útil para o estudo da fisiologia da CETP e seu impacto fenotípico em variadas condições experimentais porque mostrou completa conservação da função da proteína, do padrão de expressão tecidual e da regulação da expressão gênica comparados aos dados conhecidos em humanos e primatas não-humanos (Jiang et al., 1992). O fenótipo principal é a redução das concentrações do colesterol total circulante às custas da redução de HDL-colesterol, principal lipoproteína plasmática em camundongos. Isso foi

verificado também em outros modelos de transgênicos para CETP e em diversas situações experimentais, conforme resumido na tabela abaixo.

Efeitos da expressão da CETP na redução das concentrações plasmáticas do colesterol total e de HDL-colesterol (% controle).

Linhagens transgênicas para CETP	colesterol total	HDL-colesterol	Referências
sCETP (line UCTP20, MT-sCETP)			Marotti et al, 1993 (Tab. 1)
dieta chow*	-36%	-52%	
dieta aterogênica	-2%	-38%	
MT-hCETP (+Zn)			Agellon et al, 1991 (Tab. II and III)
macho	-11%	-12%	
fêmea	-11%	-17%	
hCETP (NFR-CETP)			Zhou et al, 2006 (Tab. 1)
hCETP	-12%	-14%	
hCETP/PDZK10	-35%	-36%	
hCETP (NFR, line 5203)			Jiang et al, 1993 (Fig 1, Tab. III)
homozigoto	-18%	-49%	
heterozigoto*	-10%	-25%	
hCETP (NFR, line 5203)			Casquero et al, 2006 (Tab.1, fig 3B)
hCETP, dieta chow	-38%	-45%	
hCETP/LDLr ^{+/-} , dieta HFHC	-12.5%	-21%	
hCETP (NFR, line 5203), ♀ ovx			Cazita et al, 2003 (Tab.1, Tab.2)
Dieta chow	~	-32%	
Dieta HFHC	-15%	-18%	

* estas linhagens são fundadores de nossas colônias sCETP e hCETP usados neste trabalho. Abreviações: MT: promotor da metalotioneína, NFR: *natural flanking region*, PDZK10: deficiência hepática de SRB-1, LDLr^{+/-}: um alelo nulo do receptor de LDL, HFHC: dieta rica em gordura e colesterol, ovx: ovariectomizadas.

Harada et al (2007) demonstraram que a expressão da CETP reduz as concentrações de HDL-colesterol por aumentar a velocidade de sua remoção plasmática (135-185%) e captação por diversos tecidos (42-50%), incluindo fígado, adrenal, adiposo e baço, tanto em machos quanto em fêmeas hCETP.

Interessante que o estudo da regulação gênica da CETP não pôde ser realizado em cultura de células por muitos anos, como seria mais prático, rápido e convencional, provavelmente pela dificuldade de preservar a expressão de elementos regulatórios presentes *in vivo* e ausentes nos sistemas *in vitro* (Oliveira HCF, comunicação oral). Por exemplo, foi observado que a expressão da CETP em cultura primária de hepatócitos e em linhagem HepG2

transfectadas com o gene da CETP é baixa e constitutiva, o que foi atribuído ao rápido desaparecimento da expressão da C/EBP (*CCAAT enhancer binding protein*), dentro de algumas horas (Agellon et al., 1992). Assim, a identificação de elementos (cis) regulatórios responsivos ao colesterol presentes no promotor do gene da CETP teve que ser determinado *in vivo* através da criação de inúmeras linhagens de transgênicos com deleções seriadas da região promotora do gene (Oliveira et al., 1996).

É frequente atribuir a este modelo do camundongo transgênico o termo super-expressão da CETP, o que leva a falsa ideia de uma quantidade exagerada da proteína nos compartimentos corpóreos do camundongo. Na verdade, neste modelo, a concentração da CETP na circulação sanguínea é equivalente as concentrações encontradas nos seres humanos normolipidêmicos, que variam entre 1,8 a 4,2 ug/mL (Guyard-Dangremont et al. 1994). O termo super-expressão não está de todo equivocado, se lembrarmos que esta espécie animal não tem esta proteína detectável em seu plasma ou tecidos. Uma atividade de transferência de colesterol éster baixa e inespecífica pode ser detectável em camundongos *wild type*, mas esta é 5 vezes menor que a atividade observada no plasma humano (Cheung et al., 1996).

Diante da conservação da função e regulação da CETP neste modelo, nas 2 décadas subsequentes à sua criação vários estudos visando esclarecer o papel desta proteína no desenvolvimento e progressão da aterosclerose foram realizados com este modelo e em outros transgênicos para CETP, com variações na procedência do gene e nos promotores (por vezes heterólogos) e em diversas condições experimentais (hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes, deficiência de outros genes etc.). Os resultados encontrados divergem consideravelmente, como mostra o quadro abaixo. Observa-se que a expressão da CETP é francamente aterogênica quando existe um defeito de receptor de LDL ou de reconhecimento das lipoproteínas remanescentes (nocaute de apoE), situação em que a CETP favorece o acúmulo de LDL na circulação. Por outro lado, a CETP tem um papel atero-protetor em diversos contextos metabólicos quando as vias de remoção plasmática de LDL estão preservadas (Oliveira e Raposo, 2020). De certo modo, estes resultados experimentais corroboram a complexidade e variabilidade de resultados observados em estudos em

humanos, seja nos fenótipos e eventos cardiovasculares de indivíduos mutantes ou com polimorfismos genéticos da CETP, seja pelos desfechos de estudos com inibidores da CETP.

Expressão da CETP e aterosclerose em modelos transgênicos	
↑ Tamanho lesão	↓ Tamanho da lesão
simian CETP ¹ (Marotti et al Nature 1993)	hum CETP ² /apoCIII (Hayek et al JCI 1995)
hum CETP ² /LDLr ^{-/-} and humCETP ² /apoE ^{-/-} (Plump et al ATVB 1999)	simian CETP ¹ /LCAT (Folger et al JBC 1999)
hum CETP ³ /hypertensive rats (Herrera et al Nat. Med. 1999)	hum CETP ³ /apoB/LPL ^{-/-} diabetic (Kako et al JLR 2002)
Mφ hCETP ² /LDLr ^{-/-} (Van Eck et al, 2007)	hum CETP ² /dbdb (MacLean et al, ATVB, 2003)
	hum CETP ² /LCAT (Berti et al BJBM 2005)
	hum CETP ² /LDLr ^{+/-} (Berti et al APMIS 2005)
	hum CETP ² /LDLr ^{+/-} castrated ♀ (Cazita et al JRL 2003)
	hum CETP ² /LDLr ^{+/-} castrated ♂ (Casquero JLR 2006)
	hum CETP ⁴ /SRBI ^{-/-} (Harder et al ATVB 2007)
	hum CETP ² /SRBI ^{-/-} (El Bouhassani et al, JBC 2011)

1 simian CETP (MT promoter – CETP cDNA); 2 hum CETP (natural promoter – CETP minigene, line 5203); 3 hum CETP (MT promoter – CETP minigene); 4 hum CETP (apo A1 promoter – CETP cDNA). MT: metalotioneína; apo: apolipoproteína; LDLr: receptor de LDL; Mφ: macrófagos; LCAT: lecitina colesterol acil transferase; LPL: lipoproteína lipase; db/db: deficiência do receptor de leptina; SRBI: receptor scavenger B tipo I.

Finalmente, como a CETP é uma proteína de transferência de lípidos, e apesar de ser secretada, é possível que a CETP também desempenhe uma função local intracelular, como tem sido sugerido em estudos de cultura de células com manipulação da expressão da CETP e verificação de alteração do *trafficking* de colesterol em membranas e síntese e acúmulo de colesterol éster e triglicérides (Izem e Morton, 2007; Izem et al., 2015).

CETP e adiposidade

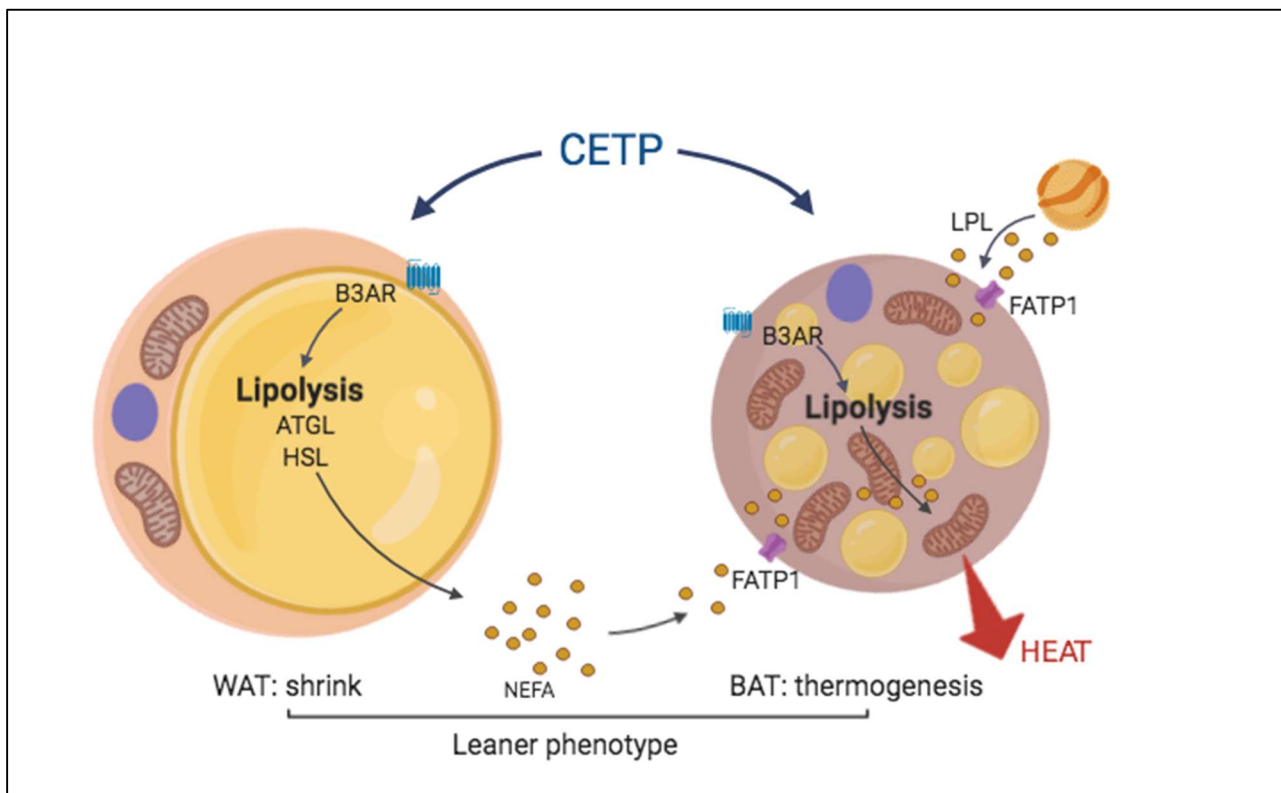
Em 2007, Salerno e colaboradores demonstraram que a expressão da CETP é capaz de reduzir a obesidade induzida por dieta em camundongos hipertrigliceridêmicos. Desde então, buscamos entender como a CETP teria uma possível função determinante da adiposidade. Em condição de dieta padrão (pobre em gordura) e temperatura ambiente de 22°C, duas linhagens independentes de camundongos transgênicos para CETP apresentaram menor

massa adiposa (~30%) e leptinemia (~40%) que seus respectivos controles irmãos não-transgênicos. Esse novo papel da CETP na adiposidade foi ainda confirmado em hamsters, espécie que expressa naturalmente a CETP. Verificou-se que, quando a CETP foi inibida por anticorpo monoclonal, os hamsters tiveram aumento do ganho de peso corporal, da massa do tecido adiposo e do tamanho dos adipócitos (Raposo et al., 2021). Estes resultados mostram que a expressão da CETP nos modelos transgênicos promove maior lipólise e aumento do gasto energético corporal e que tal aumento da taxa metabólica pode ser explicado pelo menos em parte pela maior atividade termogênica do tecido adiposo marrom (Raposo et al., 2021). Dados da literatura reforçam a associação entre CETP e redução da adiposidade, tanto em estudos em cultura de células adiposas (Izem et al., 2015), como em animais (Zhou et al. 2006) e em humanos (Terán-García et al. 2008; Oliveira e de Faria, 2011, Johansson et al. 2012). No entanto, outros estudos clínicos sugerem que a massa de tecido adiposo branco não está correlacionada ao pool plasmático de CETP (Blauw et al., 2016; Talbot et al., 2018).

JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa identificou um novo papel para a CETP, proteína amplamente estudada pela sua ação no transporte reverso de colesterol para o fígado e excreção corpórea. Embora a CETP seja expressa em diversas espécies, incluindo primatas, camundongos e ratos não a expressam, tornando a utilização de camundongos transgênicos uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos dessa proteína. Em 2007, demonstramos que expressão da CETP é capaz de reduzir a obesidade induzida por dieta em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos (Salerno et al., 2007). Recentemente, nosso grupo mostrou que a expressão da CETP humana em camundongos normolipidêmicos também reduz a adiposidade (30%) e leptinemia (40%) quando tratados com dieta padrão e mantidos a 22°C. Investigamos também quais os mecanismos envolvidos nesse processo, analisando principalmente os aspectos funcionais dos tecidos adiposos branco (perigonadal e subcutâneo) e marrom (interescapular). Verificamos aumento da lipólise (50%) e do consumo de oxigênio corporal e do BAT nos camundongos que expressam a CETP.

Demonstramos também que nos camundongos que expressam a CETP humana há aumento da expressão de genes e proteínas relacionados à lipólise. No entanto, não observamos aumento de expressão proteica e atividade de UCP1 por unidade mitocondrial no tecido adiposo marrom, e ausência de *browning* no adiposo inguinal, indicando que fatores locais, como teor de ácidos graxos aumentam a atividade do BAT nestes animais. Estes achados estão resumidos no modelo abaixo. Além disso, a respiração de outros tecidos não avaliados também pode estar contribuindo com o maior gasto energético observado nos animais que expressam a CETP.



Modelo para explicar os mecanismos pelos quais a CETP diminui a adiposidade (Rasposo et al., 2021). Os achados evidenciam o efeito da expressão da CETP ativando a lipólise e a termogênese contribuindo para o fenótipo mais magro dos animais transgênicos mantidos em condições padrão (dieta chow e 22°C). ATGL: lipase de triglicérides do tecido adiposo, B3AR: receptor adrenérgico beta3, BAT: tecido adiposo marrom, FATP1: proteína de transporte de ácidos graxos, HSL: lipase hormônio sensível, LPL: lipoproteína lipase, WAT: tecido adiposo branco.

HIPÓTESE E OBJETIVOS

Evidências recentes da literatura demonstram um papel da CETP em reduzir a adiposidade em modelos animais mantidos em condições padrão de temperatura ambiente de 22 °C. Este efeito está associado com maior metabolismo corporal, particularmente com a maior atividade do tecido adiposo marrom. Nossa hipótese é de que os animais que expressam CETP apresentam maior atividade metabólica mantendo menor adiposidade e/ou maior massa magra tanto em condições de frio quanto na termoneutralidade (30 °C), ou seja, esta seria uma característica constitutiva dos organismos que expressam CETP. Alternativamente, se os animais que expressam CETP tem maior metabolismo apenas em resposta ao frio moderado (22 °C) ou intenso (4 °C), na termoneutralidade (inibição do BAT), estes animais desenvolveriam maior adiposidade nesta condição.

Assim, os **objetivos gerais** deste trabalho são avaliar os efeitos da expressão da CETP sobre o metabolismo, adiposidade e composição corporal em condições de exposição ao frio e na termoneutralidade.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir os objetivos gerais, avaliaremos em condições de frio (4 °C) agudo (6 hs e 24 hs) ou crônico (7 dias) e em condições de termoneutralidade (1 e 7 semanas), os seguintes indicadores:

- indicadores de velocidade/capacidade metabólica corporal, tais como temperatura em diversas regiões do corpo e consumo de oxigênio global e órgão-específico;
- a adiposidade, por gravimetria dos depósitos de gordura visíveis, além dos principais órgãos metabolicamente ativos (fígado e músculo);
- a composição corporal da carcaça (massa magra e massa gorda);
- ingestão alimentar;

- indicadores metabólicos sistêmicos (lípidos, glicose, glicerol, leptina, insulina, adiponectina);
- expressão de genes relacionados a lipólise e termogênese no tecido adiposo marrom e branco subcutâneo;
- expressão de genes de neuropeptídeos anorexigênicos, orexigênicos e Bdnf no hipotálamo.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo animal e protocolo experimental

Os animais usados nestes estudos foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Área de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Foram utilizados camundongos transgênicos (background C57BL6/JUnib) para o gene da CETP humana. Os animais fundadores foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Alan Tall da Divisão de Medicina Molecular da Columbia University, NY, E.U.A., em 1996. Camundongos transgênicos para CETP de macaco (C57BL/6-Tg(CETP)UCTP20Pnu/J) foram adquiridos em 2013 do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Ambas linhagens foram mantidas em cruzamentos com os animais *wild type* (background C57BL6/JUnib) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratórios, CEMIB/Unicamp. Os animais foram genotipados de acordo com protocolo sugerido pelo Jackson Laboratory (<https://www.jaxlab.org>). Os camundongos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (ciclos de claro e escuro de 12 horas), recebendo água e ração *ad libitum* até o início dos experimentos. A dieta normolipídica (*chow*) (Nuvital CR1, Colombo, Brasil) é composta por 23% de proteína, 4,5% de gordura total, 33% carboidratos e 21% de fibra (g%), no total de 263 Kcal/100 g ração. Grupos independentes de animais (fêmeas, 4-5 meses de idade) foram expostos ao frio (4°C) aguda ou cronicamente, ou ainda a termoneutralidade (30°C), conforme descrito detalhadamente abaixo. Para a coleta de tecidos em experimentos terminais, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e

o sangue total foi coletado pelo plexo retro-orbital (exsanguinação). Os protocolos experimentais estão cadastrados na Comissão Interna de Biossegurança (# 2008/02) do Instituto de Biologia da Unicamp (CQB 0069/1998) e na Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp (# 3870-1 e # 5122-1/2019).

Exposição ao frio

Para o teste de tolerância ao frio (exposição aguda ao frio), os camundongos foram colocados em câmara fria à 4 °C por 6h, em gaiolas individuais, sem ração e sem maravalha e tiveram a temperatura retal avaliada a cada 2 horas (Dempersmier et al., 2015). Para exposição crônica ao frio, camundongos foram expostos a 4 °C por 7 dias, em gaiolas individuais, sem maravalha, em ciclo claro / escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração alimentar. A temperatura corporal (temperatura retal) foi medida uma vez por dia. A ingestão alimentar e o peso corporal foram avaliados 3 vezes durante o período experimental de 7 dias.

Adaptação à termoneutralidade

Camundongos (fêmeas, 4 meses de idade) foram mantidos a 30°C (câmara hpp 750 life, Memmert, Alemanha) por 7 semanas em um ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso a água e dieta alimentar em gaiolas coletivas (2-3/ gaiola). A ingestão alimentar, o peso corporal e a temperatura retal foram medidos uma vez por semana. Na terceira semana em termoneutralidade foi feito uma exposição aguda ao frio (teste de resistência ao frio) e na quinta semana foi realizada a respirometria para determinação do gasto energético global. Na sexta semana foi realizado o teste de ativação do BAT (respirometria após estímulo de isoproterenol). Um grupo adicional de animais foi exposto a um período mais curto de termoneutralidade (7 dias) em sala com climatização controlada e em gaiolas individuais. Os protocolos de termoneutralidade estão representados nos diagramas abaixo.

Diagrama do protocolo de termoneutralidade - 7 semanas

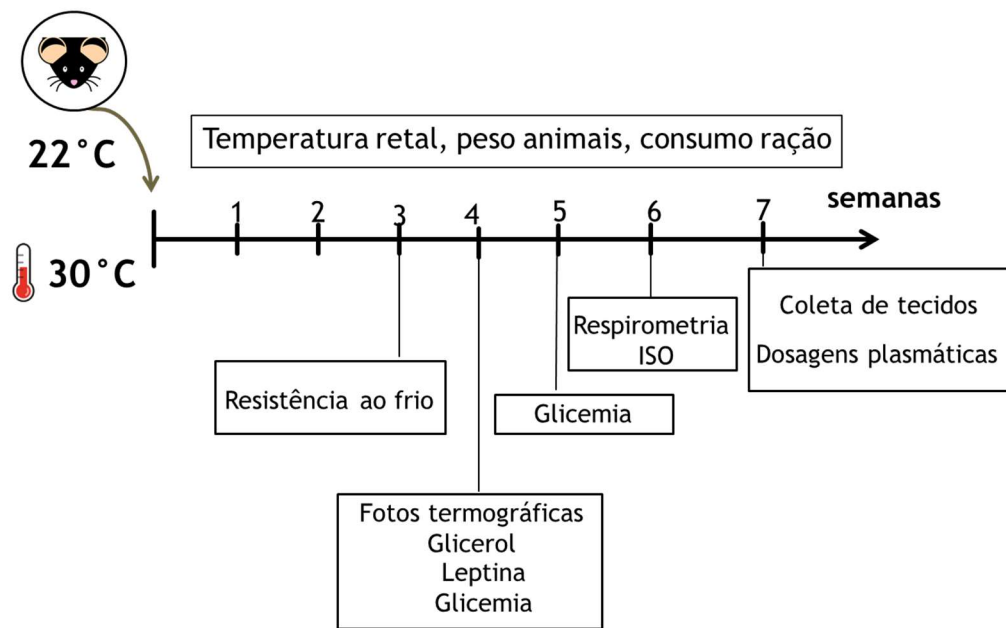
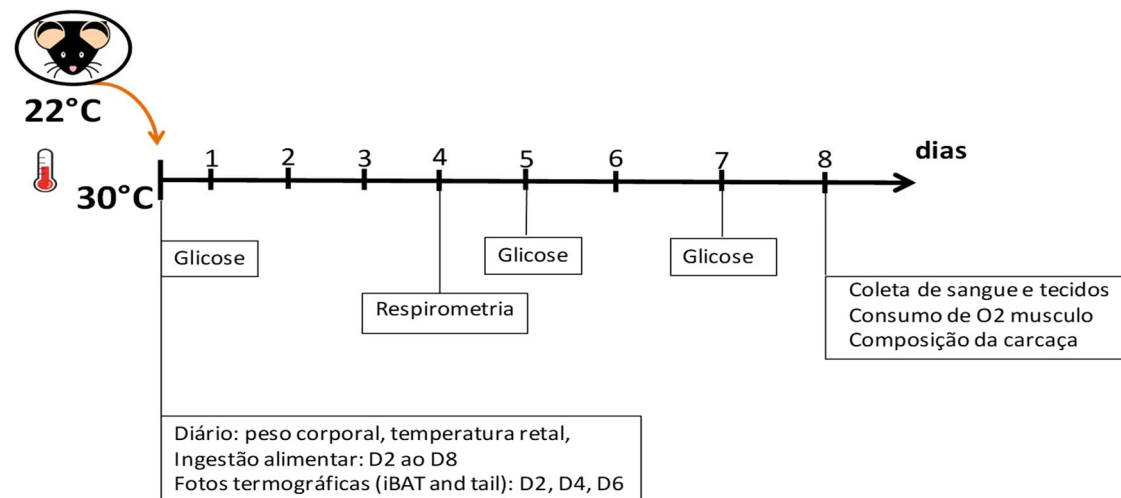


Diagrama do protocolo de termoneutralidade - 7 dias



Respirometria

A calorimetria indireta ou respirometria foi feita em equipamento Oxylet System (PamLab e Harvard Apparatus). Os camundongos foram adaptados à câmara durante 1 dia e a análise dos gases foi feita nas 24 horas seguintes. O software metabolism v2.2.01 fornece os valores de consumo de oxigênio (VO_2), dióxido de carbono produzido (VCO_2), quociente respiratório (QR) e gasto energético total (GET). Protocolo específico para avaliar o consumo de oxigênio relacionado a atividade do tecido adiposo marrom foi realizado em animais anestesiados e após injeção intraperitoneal de isoproterenol, agonista beta-3 adrenérgico, na dose de 10 mg/Kg massa corporal.

Avaliação da temperatura corporal

Para aferição da temperatura corporal dos animais foi utilizado termômetro específico para camundongos, RET-3 da Physitemp. Foram também realizadas imagens térmicas com a câmera termográfica FLIR T620 & T640 das regiões do BAT e da cauda dos animais, onde se obteve a temperatura máxima superficial daquela região.

Adiposidade

A massa dos depósitos adiposos visíveis foi determinada por gravimetria. Os depósitos de tecido adiposo pesados foram: tecido adiposo branco (WAT) perigonadal (pWAT), e subcutâneo inguinal (iWAT), além do tecido adiposo marrom interescapular (iBAT).

Composição corporal da carcaça (massa magra e massa gorda)

As carcaças dos animais foram congeladas individualmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidos a liofilização (equipamento liofilizador LIOBRAS Liotop P820) na temperatura de $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os animais foram pesados antes e após a liofilização para obtenção do teor de água corporal. Em seguida, as carcaças foram trituradas em liquidificador e uma parte submetida à extração lipídica pelo

método de Folch e outra parte submetida a análise de proteínas pelo método Dumas. O peso antes e após extração lipídica fornece a massa de gordura da carcaça, e a massa magra é calculada como a diferença de pesos entre a carcaça liofilizada e delipidada.

Bioquímica do plasma

Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides (Chod-Pap; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) e glicerol (Bioclin, Quibasa; Belo Horizonte, Brazil) foram realizadas com kits enzimáticos comerciais de acordo com as instruções do fabricante. Insulina, leptina e adiponectina determinados por kits de ELISA (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). A glicemia foi medida diretamente no sangue usando um glicosímetro portátil da marca Accu-Check, modelo *guide* (Roche, Brasil).

Oximetria de alta resolução (Oroboros)

O consumo de oxigênio por biópsias de músculo esquelético (gastrocnêmio) ou fígado permeabilizadas com saponina foi determinado em oxígrafo de alta precisão Oroboros (Bioblast, Áustria). As amostras foram permeabilizadas de acordo com protocolo previamente descrito Busanello et al (2017). Depois de permeabilizadas, as amostras foram incubadas em meio de reação padrão (MiR05) a 30 °C na presença dos substratos para complexo I: malato (5 mM) e glutamato (10 mM). Foram adicionados adenosina difosfato (ADP, 400 µM) para estimular a fosforilação oxidativa, oligomicina (1 µg/mL) para inibição da ATP sintase e FCCP (carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxy-phenylhydrazone, 0,9 µM) para determinação da velocidade máxima de consumo de oxigênio.

Expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído das amostras de tecido adiposo e hipotálamo utilizando-se RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Germany) e o reagente TRIzol (Invitrogen), respectivamente, conforme orientações do fabricante. Foi obtido o

cDNA a partir de 2 µg de RNA total por transcrição reversa, usando-se kit da Applied Biosystems (High-Capacity cDNA reverse transcription kit), de acordo com a bula. A expressão gênica nos tecidos foi determinada por Real time PCR. Foi utilizado o sistema de detecção 7500 *fast Real-time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A quantificação foi feita utilizando os valores de delta-delta cycle threshold ($\Delta\Delta Ct$) e normalizado pelos valores dos controles internos RPLP0 (*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0* ou *60S acidic ribosomal protein P0*) e GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), e expressa em relação aos controles não-transgênicos. Os primers utilizados foram: Ucp1 (Mm01244861_m1), DIO2 (Mm00515664_m1), B3AR (Mm02601819_g1), TH (Mm00447557_m1), HSL (Mm00495359_m1), FATP1 (Mm00449511_m1), ATGL (Mm00503040_m1), PRDM16 (Mm00712556_m1), EPSTI-1 (Mm01313921_m1), ANGPTL4 (Mm00480431_m1), CIDEA (Mm00432554_m1), Cd36 (Mm01135198_m1), LPL (Mm00434764_m1), RPLP0 (Mm00725448_s1), Pomc (Mm00435874_m1), Cart (Mm04336402_m1), AgRP (Mm00475829_g1), NYP (Mm00650798_g1), TRH (Mm0118245_g1), BDNF (Mm04230607_s1), GAPDH (Mm05724508_g1).

Histologia

O tecido adiposo marrom foi submetido à análise histológica convencional. O tecido coletado foi imediatamente fixado com paraformaldeído 4% durante 24h a 4° C, lavado com PBS e conservado em etanol 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol e, em seguida, transferidas para solução de xileno para inclusão em parafina. Seções de cinco micrômetros foram cortadas em um micrótomo Leica. As lâminas foram colocadas a 70°C para remover a parafina. Os cortes foram corados com eosina-hematoxilina e as imagens digitais foram capturadas sob lente objetiva de 40x em um microscópio óptico (Olympus BX51, câmera Olympus U-TVO.63XC). A análise da área foi feita em 5 seções diferentes por camundongo, foi medida usando o software Image J versão 1.53a. O conteúdo lipídico foi medido com o modo automatizado após transformação binária dentro de uma área/seção fixa.

Análises Estatísticas

Os resultados obtidos estão apresentados como média aritmética e erro padrão da média para o número de determinações (n) indicados em cada figura. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo *teste t* de Student, não pareado de forma bicaudal. A significância estatística foi definida como $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Exposição ao frio

Duas linhagens independentes de camundongos transgênicos, expressando o gene da CETP humano (hCETP) ou símio (sCETP), foram expostas ao frio (4 °C) aguda (6 h) e cronicamente por 7 dias e suas temperaturas corporais ao longo destes períodos são mostradas na **Figura 1**. Durante as primeiras 6 horas de exposição ao frio, os animais tiveram sua temperatura retal medida a cada duas horas, mostrando que a resistência ao frio não foi diferente em camundongos expressando CETP em comparação com os controles não-transgênico (NTg) (**Fig. 1A, 1C**), embora os CETP tivessem menor adiposidade no início do experimento (Raposo et al, 2021). A temperatura retal ao longo de 7 dias de exposição ao frio também foi semelhante entre os camundongos que expressam CETP e NTg (**Fig. 1B, 1D**). Durante a exposição ao frio, a expressão da CETP também não alterou o peso corporal e a ingestão alimentar (**Figura 2**), conforme observado anteriormente em temperatura ambiente de 22 °C (Raposo et al., 2021). Em relação a massa de tecido adiposo branco (WAT), observamos que a exposição ao frio crônico reduziu a massa do WAT quando comparado aos animais controles mantidos a 22 °C (**Figura 3**), mas não houve diferença entre os grupos genotípicos (com e sem CETP) ao final do período de exposição ao frio. Em ambas as linhagens de camundongos, a massa de iBAT foi aumentada pelo frio em comparação com 22 °C. No grupo sCETP, observamos que a massa do iBAT estava significativamente aumentada (15%) quando comparada ao NTg também exposto ao frio (**Fig. 3C**).

Em seguida, verificamos se a expressão da CETP modificaria o metabolismo corporal por ativação do BAT em resposta ao frio submetendo animais anestesiados à respirometria após administração de alta dose de isoproterenol. Este é considerado um teste cuja resposta principal está relacionada a atividade do BAT (Cannon & Nedergaard, 2011). Essas análises foram realizadas antes (22 °C) e após 7 dias de exposição ao frio (**Figura 4A e B**). Em ambas as temperaturas de alojamento (22 e 4 °C), o consumo de oxigênio em resposta ao isoproterenol foi maior no grupo CETP em comparação com NTg. Enquanto um aumento de 21% foi observado em animais aclimatados a 22 °C (**Figura 4A**), ao final dos 7 dias de exposição a 4 °C, o grupo CETP aumentou o consumo de oxigênio em 41%, indicando que a expressão de CETP aumentou ainda mais a sua taxa metabólica em resposta à adaptação ao frio em comparação com o grupo NTg (**Figura 4B**).

No sentido de buscar uma janela temporal mais adequada para a investigação sobre o maior metabolismo nos animais CETP expostos ao frio, repetimos e ampliamos as análises após exposição ao frio por 24 horas (**Figuras suplementares 1 a 4**). A temperatura corporal, do iBAT, da cauda, a ingestão alimentar, a concentração plasmática de leptina e de glicose não estavam alterados entre os grupos hCETP e NTg (**Figura suplementar 1**) após 24 hs de exposição ao frio. O peso corpóreo, do fígado e dos depósitos adiposos, a composição da carcaça e o conteúdo de lipídeos do iBAT também não variaram entre os grupos (**Figura suplementar 2**). Analisamos também a expressão de genes relacionados a lipólise e termogênese no iBAT e tecido adiposo inguinal suscetível ao processo de “*browning*”. No entanto, não houve diferenças significativas na expressão gênica entre hCETP e NTg após 24 horas de exposição ao frio (**Figura suplementar 3**). Isso sugere que o aumento de atividade do BAT verificada nos animais CETP expostos ao frio por 7 dias (Figura 4) provavelmente não está relacionado à regulação transcricional destes genes, e sim provavelmente a ação de agentes locais, como por exemplo, maior disponibilidade de ácidos graxos derivados de lipólise.

Os níveis plasmáticos de colesterol, como esperado para o fenótipo decorrente da expressão da CETP, estão reduzidos nos animais CETP expostos

ao frio, enquanto os níveis de triglicérides e de insulina são similares nos dois grupos genotípicos expostos ao frio (**Tabela 1**).

Termoneutralidade de longo prazo

Uma vez que a temperatura de alojamento de 22 °C não é considerada uma temperatura neutra para roedores (Keijer e Speakman, 2019), ficamos interessados em verificar se a expressão de CETP afetaria a composição e metabolismo corporal quando os animais estivessem aclimatados em termoneutralidade (28-30 °C). Nesta condição, a atividade do BAT é inibida (Cannon & Nedergaard, 2004). Assim, por períodos de 1 ou 7 semanas, os camundongos hCETP e irmãos NTg foram mantidos a 30 °C. No protocolo de 7 semanas, a temperatura retal dos animais hCETP foi maior do que dos NTg durante as primeiras 4 semanas a 30 °C (**Figura 5A**). Após 3 semanas a 30 °C, os animais foram expostos agudamente ao frio por 2 horas para observar a resistência ao frio e então retornaram ao ambiente de 30 °C. Verificamos que a tolerância ao frio foi melhorada pela expressão de CETP, uma vez que camundongos hCETP tiveram uma queda da temperatura corporal 30% menor que os NTg durante 2 horas a 4 °C (**Fig. 5B**). Durante 4 semanas de termoneutralidade, a temperatura superficial da cauda, mas não a da região do iBAT, foi superior nos animais hCETP (**Fig. 5C e D**).

O peso corporal, a ingestão alimentar e a massa dos depósitos adiposos, fígado e músculo gastrocnêmio após 7 semanas em termoneutralidade são apresentados na **Figura 6**. Não houve diferenças no peso corporal e na ingestão alimentar entre hCETP e NTg sob termoneutralidade (**fig. 6A, 6B**), assim como também não havia a 22 e 4 °C. Em comparação com a temperatura do alojamento de 22 °C, espera-se que camundongos mantidos a 30 °C apresentem redução na ingestão alimentar (Cui et al., 2016). De fato, a ingestão alimentar média verificada a 30 °C (~2,5 g/dia) é reduzida quando comparada a 22 °C (Raposo et al., 2021, ~4 g/dia). Como esperado, também há diferenças marcantes entre a ingestão alimentar a 4 °C (**Fig. 4**, 10-11 g/dia) e 30 °C (**Fig. 6**, ~2.5 g/dia). Em relação às massas de tecidos específicos, não observamos diferenças nos depósitos de WAT, porém a massa do BAT aumenta após a

termoneutralidade em ambos os grupos de camundongos hCETP e NTg (**Fig. 6C**). O aspecto macroscópico do BAT em ambos hCETP e NTg estava mais esbranquiçado na termoneutralidade, corroborando com a ideia de que a aclimação termoneutra reduz a atividade do BAT em comparação a 22 °C (Cui et al., 2016).

O peso do fígado e músculo esquelético (gastrocnêmio + sóleo) estão reduzidos nos NTg mantidos a 30 °C em comparação com 22 °C, porém o grupo que expressa CETP não apresenta esta redução de massa hepática, e mais importante, mostra aumento significativo de 20% na massa do músculo esquelético em relação aos NTg quando mantidos a 30 °C (**Fig. 6C**). A composição da carcaça corporal em termos de água, proteínas e lipídios não difere nos dois grupos genotípicos mantidos a 30 °C por 7 semanas (**Fig. 6D**).

Durante a termoneutralidade, verificamos que as concentrações plasmáticas de glicerol (semana 4), indicador de lipólise, glicemia de jejum (semanas 4) e leptina (semanas 4 e 7) não variaram entre os grupos hCETP e NTg (**Figura 7**). Interessante, observamos que a glicemia do estado alimentado (semana 5) estava reduzida no grupo hCETP, sugerindo aumento de captação tecidual e/ou de sensibilidade a insulina nestes animais, quando em termoneutralidade. As concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides e de insulina não variaram entre os grupos em termoneutralidade por 7 semanas (**Tabela 2**).

Como esperado, as análises de respirometria in vivo estimulada por isoproterenol após 6 semanas de termoneutralidade não mostraram diferenças significativas entre hCETP e NTg (**Figura 8**), uma vez que nesta condição a atividade do BAT está inibida.

As variáveis analisadas após 4 semanas de termoneutralidade não apresentaram diferenças entre os grupos hCETP e NTg. Estes resultados sugerem que as adaptações metabólicas resultantes da expressão da CETP desapareceram, como indicado pelas alterações de temperatura (metabolismo) corporal após 4 semanas de termoneutralidade.

Termoneutralidade de curto prazo

Uma vez que as diferenças observadas na temperatura retal entre os grupos CETP e NTg se perdem no decorrer das semanas, decidimos continuar investigando os indicadores de metabolismo em um novo coorte de animais submentendo-os à termoneutralidade por apenas uma semana. Neste novo experimento, observamos algumas mudanças significativas no comportamento metabólico dos animais que expressam CETP. Não houve alteração significativa do peso corpóreo (**Figura 9A**), porém houve aumento do consumo alimentar (**Figura 9B**). Não houve diferenças significativas entre os grupos genotípicos em termos de massa dos depósitos adiposos visíveis, fígado e gastrocnêmio (**Figura 9C**). A histologia do tecido adiposo marrom destes animais não revelou diferença no conteúdo lipídico entre os grupos (**Figura 9D**), porém o conteúdo de lipídeos da carcaça dos animais CETP estava significativamente reduzido em 27% e a massa magra significativamente aumentada (**Figura 9E**). Quanto a temperatura retal, verificamos que os animais hCETP tiveram aumento significativo após 48 horas a 30 °C, mantendo a tendência de temperatura mais elevada ao longo dos 7 dias (**Figura 10A**), sem alterações significativas das temperaturas da região do BAT (**Figura 10B**) e da cauda (**Figura 10C**). Mais importante, verificamos aumento do gasto energético diário no período claro (repouso) dos animais hCETP determinado após 4 dias em termoneutralidade (**Figura 11**). A glicemia em estado alimentado manteve-se reduzida nos animais hCETP em termoneutralidade, enquanto a insulinemia estava mais elevada nos hCETP (**Tabela 2**). Isso sugere que a termoneutralidade modifica a produção (pâncreas) e/ou remoção (fígado) da insulina da circulação nos animais CETP, favorecendo a captação tecidual de glicose.

Confirmando que na termoneutralidade a curto prazo o BAT está inativo, não verificamos nenhuma alteração na expressão de genes relacionados a termogênese entre os grupos hCETP e NTg (**Figura 12**).

No sentido de avaliar mais profundamente outros órgãos metabolicamente ativos, determinamos o consumo de oxigênio em biópsias do gastrocnêmio e de fígado dos animais aclimatados a 22 °C e submetidos à termoneutralidade por 7 dias (**Figura 13**). Não observamos diferenças

significativas entre hCETP e NTg nos músculos de machos e fêmeas mantidos a 22 °C (**Figura 13A e B**) e em músculo e fígado de fêmeas aclimatadas em termoneutralidade por 7 dias (**Figura 13C e D**).

Como na termoneutralidade de curto prazo observamos aumento de ingestão alimentar e de gasto energético nos animais hCETP, investigamos a expressão de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo dos dois grupos de animais (**Figura 14**). No entanto, não houve diferenças significativas na expressão de *pomc*, *cart*, *agrp* e *npv*, e de *trh* e *bdnf* entre os grupos de animais em termoneutralidade de curto e de longo prazo (**Figura 14**). O BDNF também foi avaliado por ser um peptídeo associado ao controle da temperatura corporal.

DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que a suscetibilidade à obesidade varia dependendo da constituição genética e das temperaturas de alojamento dos modelos experimentais. A termogênese do tecido adiposo marrom ou induzida em depósitos adiposos bege tem sido considerada uma potencial estratégia terapêutica ou de prevenção de obesidade bastante atraente. Por exemplo, em estudos prévios foi mostrado que manipulações genética ou farmacológicas que induzem a expressão da UCP1, reduzem a adiposidade (Himms-Hagen et al., 1994; Kopecky et al., 1995; Kopecky et al., 1996). Além disso, a expressão ectópica de UCP1 em tecido adiposo branco confere resistência à obesidade induzida por dieta em ratos da linhagem Lou/C (Veyrat-Durebex et al., 2011). Por outro lado, os efeitos da ablação da UCP1 são mais incertos e dependem das condições térmicas ambientais. Inesperadamente, quando aclimatados a 20°C, camundongos nocautes de UCP1 são protegidos contra obesidade induzida por dieta, mas esta proteção desaparece quando eles são mantidos a 27°C. Isso parece indicar que mecanismos alternativos, independentes de UCP1, requeridos para regular a temperatura corporal em ambiente frio (abaixo da termoneutralidade) tem um custo energético maior resultando em aumento de

gasto energético corporal (Liu et al., 2003). Por outro lado, em temperatura termoneutra (30°C), a ablação da UCP1 induz obesidade devido à ausência da termogênese induzida pela dieta (Feldmann et al., 2009). Conforme o esperado da função das UCPs, outros estudos mostram que a superexpressão da UCP3 em músculos de camundongos resultou em camundongos magros e hiperfágicos (Clapham et al., 2000), e resistentes à obesidade (Tiraby et al., 2007). A superexpressão da UCP3 preveniu o acúmulo de triglicérides tanto no tecido adiposo quanto no músculo (Costford et al., 2006). Tem sido sugerido que o papel fisiológico da UCP3 pode estar mais relacionado à eficiência do processamento mitocondrial de ácidos graxos do que com a termogênese em si, protegendo contra acúmulo de ácidos graxos e mantendo a capacidade muscular de oxidar gorduras (Hesslink et al., 2003).

Relatamos anteriormente que, em condições padrão (dieta comercial padrão e temperatura de alojamento a 22°C), a expressão de CETP aumenta a lipólise, a atividade do BAT e a taxa metabólica corporal, resultando na redução da massa do tecido adiposo em comparação com camundongos controles NTg (Raposo et al., 2021). Aqui, mostramos que esses camundongos CETP, aclimatados a 22°C, quando expostos ao frio (4°C) são capazes de manter sua temperatura corporal de maneira semelhante aos NTg, embora tivessem menor adiposidade antes da exposição ao frio, e portanto menor isolamento corporal em relação ao ambiente. A explicação para isso é um maior aumento da taxa metabólica corporal induzida pelo frio nestes animais que expressam CETP, principalmente via ativação do BAT, demonstrada pelo maior consumo de oxigênio induzido pelo isoproterenol. Esta resposta metabólica do corpo é ativada ainda mais após a aclimação ao frio (4°C por 7 dias) em camundongos CETP em comparação com NTg.

Por outro lado, quando aclimatados à termoneutralidade por até 4 semanas, camundongos que expressam a CETP exibem um aumento significativo na temperatura corporal, central (retal) e periférica (cauda), e maior tolerância ao estresse agudo de frio, sugerindo que a maior taxa metabólica de camundongos CETP é um fenômeno constitutivo neste modelo e não dependente da atividade do BAT, que está inibido na termoneutralidade. Durante a uma semana de termoneutralidade, observamos aumento de ingestão

alimentar concomitante com aumento de gasto energético diário (período claro), tendência de aumento de temperatura retal, o que resultou em redução de massa gorda (gordura subcutânea) e aumento de massa magra.

O ponto chave a ser esclarecido é identificar quais tecidos contribuem para um maior metabolismo e geração de calor em camundongos CETP nas diversas condições. Em 22°C, demonstramos maior temperatura e atividade do BAT (consumo de oxigênio) e maior lipólise do WAT nos animais CETP (Raposo et al., 2021). Em condições de frio (4°C), neste trabalho demonstramos também maior atividade do BAT determinada pelo teste de consumo de oxigênio estimulado por isoproterenol. Porém, em condições de termoneutralidade (30°C), situação em que o BAT está inibido, o tecido muscular parece ser o principal responsável pelo aumento do metabolismo, já que os animais CETP tem aumento de massa magra.

O músculo esquelético é responsável por grande parte da termogênese do tremor na exposição aguda ao frio (Wijers et al., 2009), uma vez que pode ser responsável por cerca de 40% da termogênese induzida pela epinefrina (Simonsen et al., 1992). Em pequenos mamíferos, o BAT é o principal contribuinte para a termogênese adaptativa independente de tremores que ocorre na aclimação ao frio (Cannon e Nedergaard, 2011). Embora a contribuição de outros tecidos para a termogênese adaptativa em humanos ainda seja desconhecida (Lowell e Spiegelman, 2000), descobertas recentes identificaram o fígado como um órgão crucial para a adaptação ao frio (Simcox et al., 2017), uma vez que o fígado fornece acilcarnitinas como combustível para a termogênese no BAT em camundongos expostos ao frio.

Sob termoneutralidade, existem evidências de que todo o calor produzido após a injeção de norepinefrina seja proveniente de fontes *não-BAT*, mas na pré-aclimação à temperaturas abaixo da termoneutralidade, a contribuição do BAT é de cerca de 10-20% (Cannon e Nedergaard, 2011). Considerando que na termoneutralidade a atividade do BAT é inibida, o músculo esquelético poderia ter uma grande contribuição para manter o metabolismo mais elevado em camundongos CETP. De fato, mostramos anteriormente que camundongos CETP aclimatados a 22°C apresentam aumento da massa magra e diminuição

da massa gorda (Raposo et al., 2021), portanto, quando expostos ao frio (agudamente), sua capacidade de gerar calor por tremores deve ser aumentada. Sob termoneutralidade, mostramos neste trabalho, que a massa muscular esquelética (gastrocnêmio) e massa magra da carcaça estão elevadas em camundongos CETP. Também estudamos o metabolismo (consumo de oxigênio) de músculo e fígado isolados dos animais aclimatados a 30°C, mas não verificamos diferenças significativas (por unidade de peso dos tecidos) entre os grupos CETP e NTg. No entanto, se a massa muscular (massa magra) corporal é maior nos animais CETP, isso já contribui para explicar o maior metabolismo corporal destes animais na termoneutralidade.

Algumas possíveis sugestões de mecanismo de ação da CETP em aumentar metabolismo já foram discutidas em nossa publicação prévia dos resultados obtidos em condição de temperatura ambiente de 22 °C. A primeira hipótese seria de que a CETP teria uma ação no sistema nervoso central, podendo estimular o tônus simpático no tecido adiposo branco (lipólise) e no tecido adiposo marrom (termogênese). No entanto, a dosagem de catecolaminas tanto plasmática como local nos depósitos adiposos não demonstrou aumento no grupo que expressa a CETP. Além disso, no presente trabalho analisamos a expressão de genes relevantes, neste caso principalmente *Trh*, para a regulação da homeostase energética no hipotálamo em condições de frio (24 hs) e termoneutralidade (1 e 7 semanas) e não observamos alterações significativas.

Outro possível mecanismo está relacionado com a função da CETP de modular o conteúdo de colesterol presente na membrana plasmática das células. O teor de colesterol de membrana altera a expressão gênica e ativação de proteínas relacionadas com metabolismo energético (Lay et al., 2001), incluindo lipólise e termogênese (Raposo et al, 2021). Como base para esta proposta, foi demonstrado que a expressão da CETP aumenta a captação de colesterol derivado das HDL no fígado, adrenal, adiposo e baço (Harada et al, 2007). Foi também demonstrado em cultura de células adiposas que a CETP aumenta o conteúdo de colesterol celular (Benoist et al., 1997; Oliveira e Raposo, 2020). De fato, detectamos maior conteúdo de colesterol no iBAT dos animais hCETP mantidos a 22 °C (Raposo et al., 2021).

Existe também a possibilidade de que o colesterol presente na membrana plasmática contribua para a estabilidade de receptores beta adrenérgicos, sendo estes os receptores-chave para a via de sinalização da lipólise e termogênese (Cherezov et al., 2007). Deste mesmo modo, outras proteínas de membrana relevantes para aumento de captação de substratos e do metabolismo celular poderiam ser estabilizadas ou ativadas pelo aumento de colesterol de membrana mediado pela CETP. Recentemente foi descrito um receptor acoplado a proteína G 3 (GPR3) que é constitutivamente ativado independente de ligante (Sveidahl Johansen et al, 2021). Os autores mostraram que a expressão do GPR3 é induzida pelo frio de uma maneira não canônica, pela sinalização lipolítica intracelular, que é suficiente para promover o programa termogênico de adipócitos marrons e bege de camundongos e humanos (Sveidahl Johansen et al, 2021). Seria interessante avaliar a expressão proteica e atividade deste receptor em tecidos alvo (WAT, BAT e músculos) de nossos grupos experimentais.

Outros inúmeros mecanismos poderiam ser aventados para explicar a ação da CETP em aumentar o metabolismo. Idealmente deveríamos realizar análises do transcriptoma e/ou proteoma dos tecidos alvo de nosso interesse nas diversas condições de temperatura ambiente para comparar os animais hCETP e NTg. Estas análises abrangentes podem apontar genes ou proteínas chave não previsíveis antecipadamente, intermediárias da ação da CETP.

Em conclusão, camundongos que expressam a CETP que exibem menor adiposidade a 22 °C são capazes de manter sua temperatura corporal durante a exposição aguda e crônica ao frio, devido pelo menos em parte, a sua maior capacidade de aumentar a taxa metabólica corporal (VO₂) relacionada a atividade do tecido adiposo marrom. Sob termoneutralidade (quando a atividade do BAT é reduzida ou totalmente inibida), os camundongos CETP exibem aumento de ingestão alimentar, do gasto energético corporal, da massa magra e redução da massa gorda (gordura subcutânea). Nos animais CETP, o aumento da insulinemia e redução da glicemia pós-prandial em termoneutralidade refletem uma maior captação tecidual de glicose, o que parece sustentar o aumento do metabolismo demandado por uma maior massa magra corporal. Assim, propomos que a expressão da CETP confere uma maior capacidade de

elevação das taxas metabólicas em diferentes tecidos corporais sob diferentes condições de temperatura. Nossos resultados podem ainda explicar pelo menos parcialmente a controvertida associação entre polimorfismos do gene da CETP e obesidade (Oliveira e de Faria, 2011; Oliveira e Raposo, 2020). Finalmente, podemos especular que o efeito da CETP (ou o mecanismo subjacente) teriam um potencial uso no combate a doenças metabólicas.

TABELAS

Tabela 1: Concentrações plasmáticas de lípides e insulina em camundongos hCETP e NTg submetidos ao frio.

Tratamento / grupos	Colesterol mg/dL	Triglicérides mg/dL	Insulina ng/mL
4°C – 24 hs			
hCETP	66.6 ± 3.9 ^{\$}	62.9 ± 3.3	1.2 ± 0.3
NTg	78.0 ± 3.5	71.1 ± 3.9	1.5 ± 0.6
4°C – 7 dias			
hCETP	66.8 ± 3.2	67.4 ± 5.3	
NTg	68.1 ± 4.6	62.6 ± 8.6	
sCETP	41.5 ± 2.8*	87.3 ± 9.2	
NTg	64.6 ± 7.0	67.9 ± 6.1	

Média ± EP (n=5). Plasma obtido em estado alimentado. Student t test: ^{\$} p=0.07, * p<0.05.

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de lípides, glicose, insulina e adiponectina em camundongos hCETP e NTg submetidos à termoneutralidade.

Tratamento / grupos	Colesterol mg/dL	Triglicérides mg/dL	Glicose ng/mL	Insulina ng/mL	Adiponec- tina ng/dL
30°C – uma semana					
hCETP	70.2 ± 1.4*	57.3 ± 5.1	115 ± 3.6*	1.3 ± 0.1*	19.1 ± 3.0
NTg	84.7 ± 5.1	58.5 ± 5.5	129 ± 5.3	0.9 ± 0.08	17.4 ± 1.0
30°C – sete semanas					
hCETP	69.0 ± 4.7	97.5 ± 12.0	109 ± 2.0*	0.8 ± 0.06	20.4 ± 1.9
NTg	65.5 ± 3.5	74.8 ± 12.6	130 ± 8.9	0.8 ± 0.1	16.8 ± 2.2

Média ± EP (n=5). Plasma obtido em estado alimentado. Student t test: * p<0.05.

FIGURAS

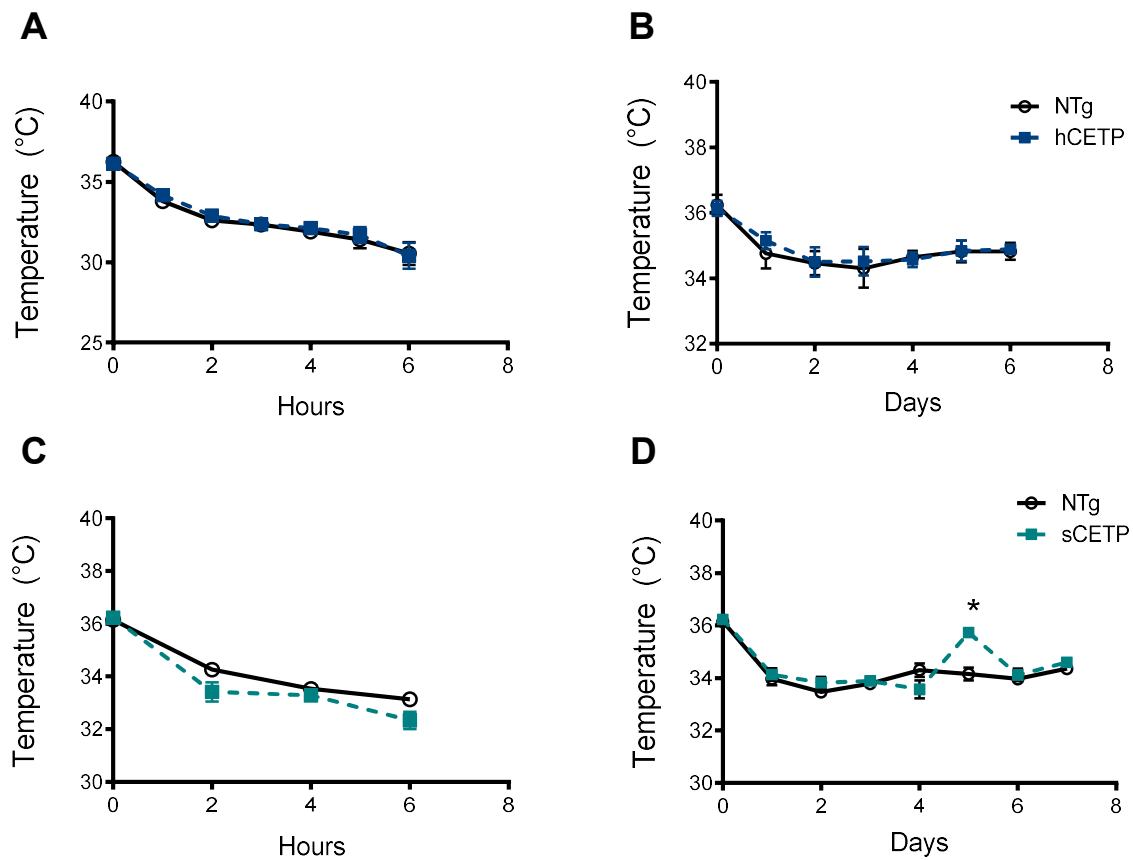


Figura 1. Temperatura retal durante exposição ao frio (4°C) aguda (**A,C**) e crônica (**B,D**). Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP) e de símios (sCETP). Média $\pm$ epm (n=5-6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

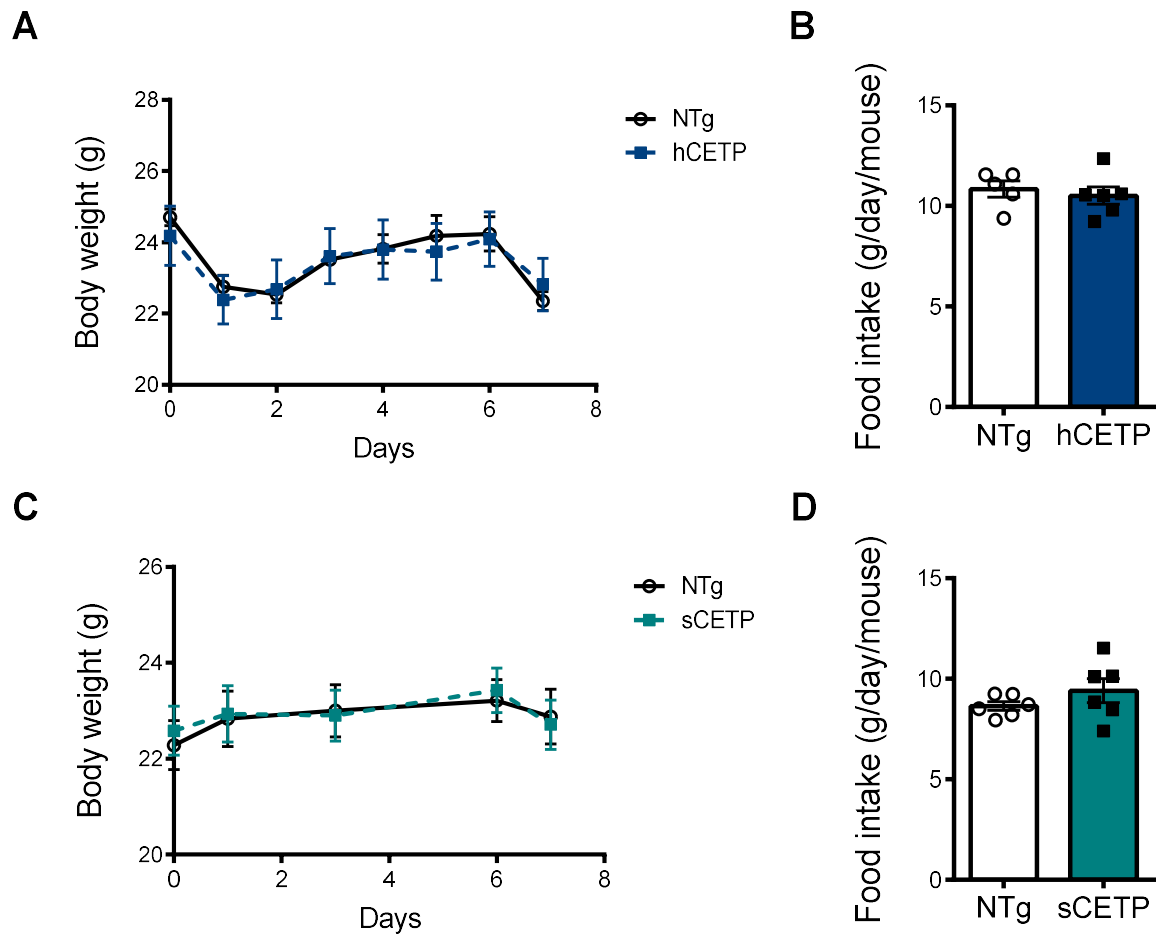


Figura 2. Peso corporal (A,C) e ingestão alimentar (B,D) durante exposição crônica ao frio (4°C) por 7 dias. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP) e de símios (sCETP). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

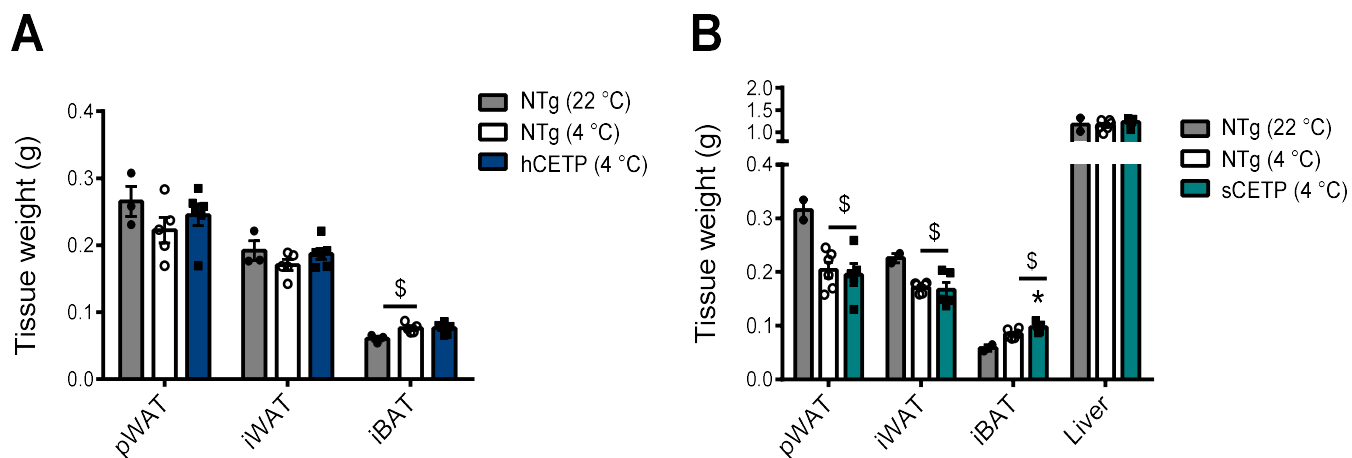


Figura 3. Peso dos tecidos após exposição crônica ao frio (4°C) por 7 dias. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP) (**A**) e de símios (sCETP) (**B**). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, $^{\$}p \leq 0.05$ vs NTg 22°C, $^*p \leq 0.05$ vs NTg (4°C).

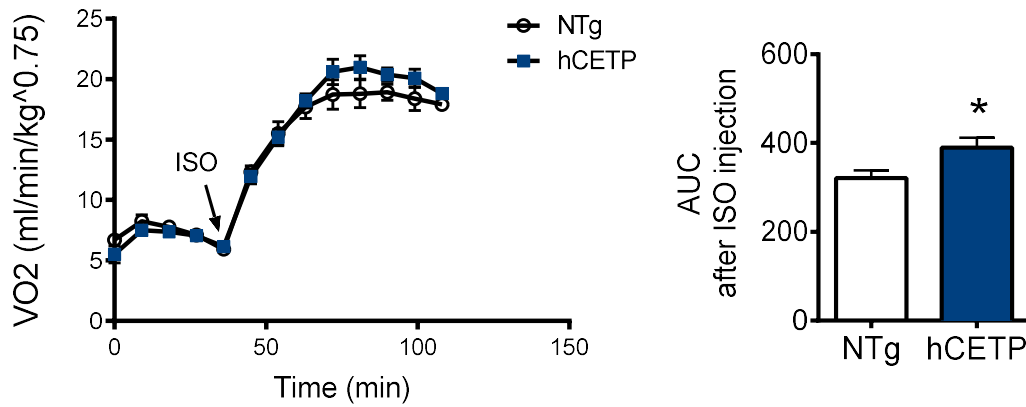
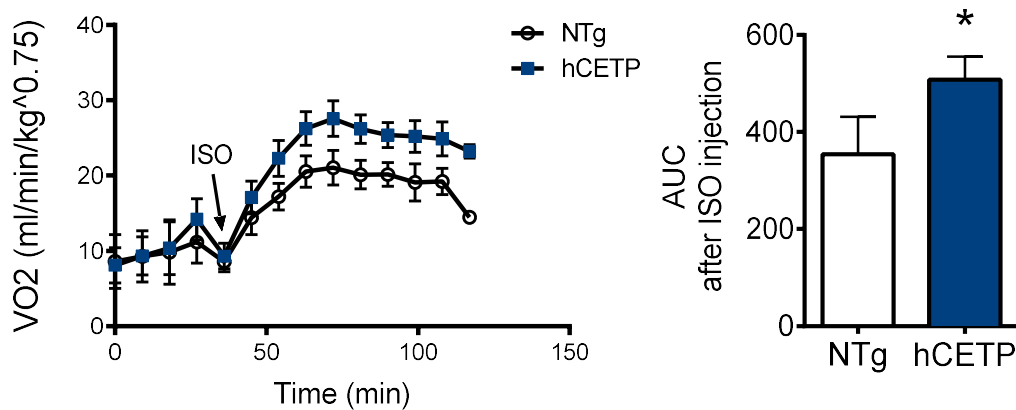
A - 22°C**B - 4°C**

Figura 4. Consumo de oxigênio (VO₂) após injeção intraperitoneal de isoproterenol (ISO: 10 mg/kg) antes (**A**, 22°C) e depois (**B**, 4°C) da exposição ao frio por 7 dias. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). AUC- área sob a curva de VO₂ após administração de ISO. Média ± epm (n=6). Teste “t” de Student, * p ≤ 0.05.

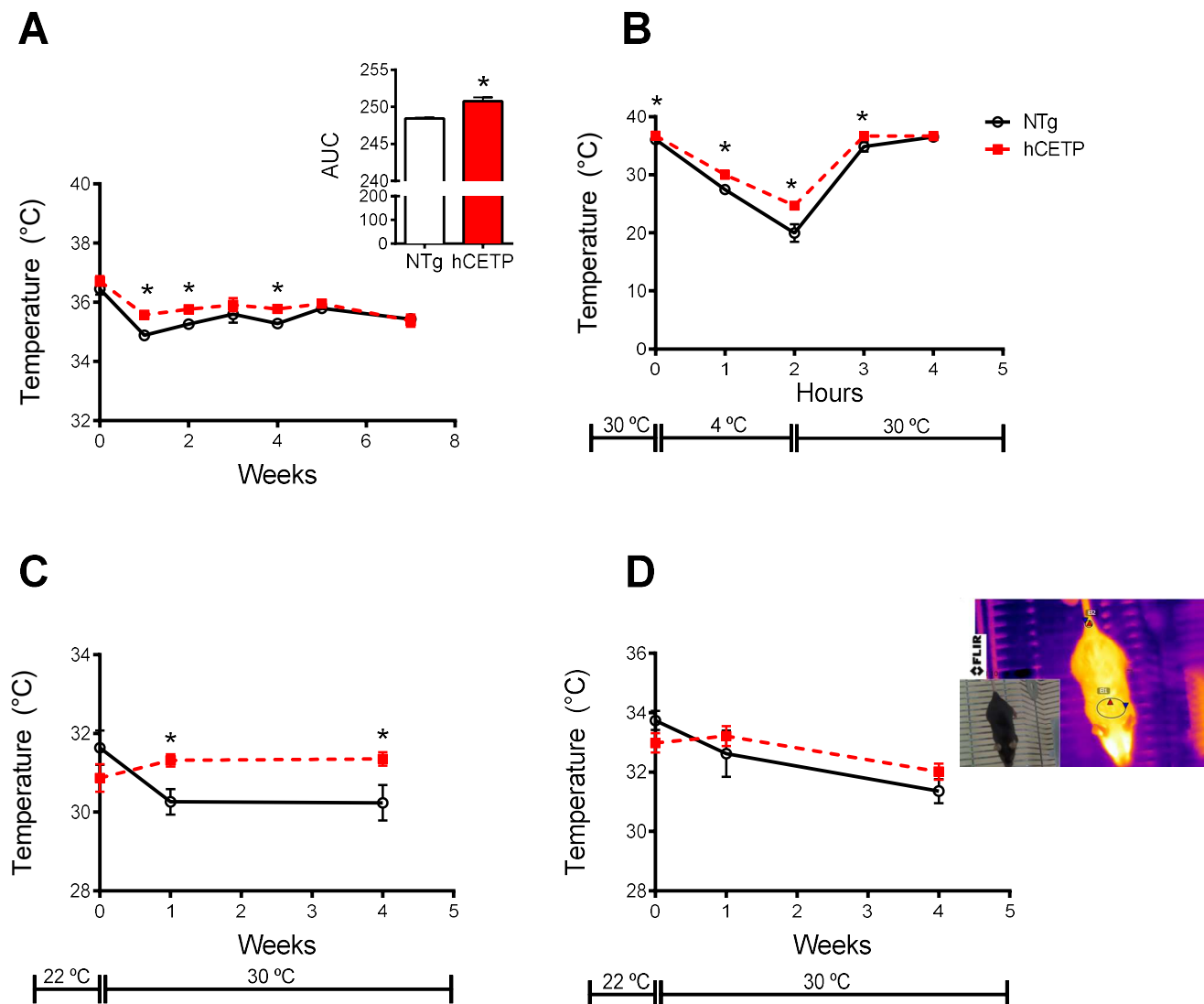


Figura 5. Temperatura corpórea (retal) durante exposição à termoneutralidade (30°C) por 7 semanas (**A**) e durante teste de exposição aguda ao frio (4°C) (**B**). O teste de exposição ao frio foi feito após 3 semanas em termoneutralidade. Temperatura máxima da região da cauda (**C**) e do tecido adiposo marrom (**D**) durante termoneutralidade. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

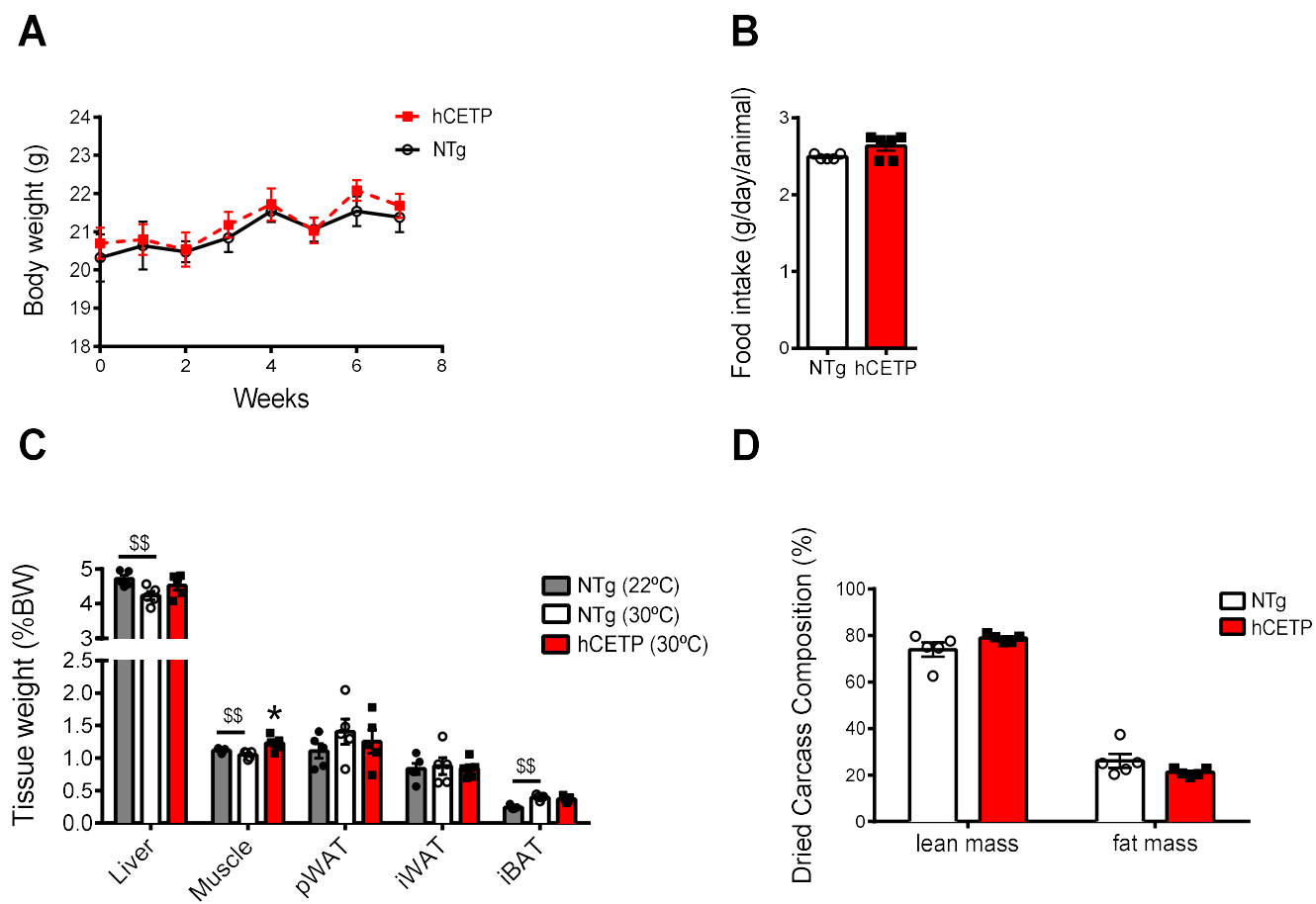


Figura 6. Peso corpóreo (**A**), ingestão alimentar (**B**), peso de tecidos (**C**) e composição da carcaça (**D**) após 7 semanas em termoneutralidade. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, \$\$ $p \leq 0.05$: NTg 22°C vs. NTg 30°C; * $p \leq 0.05$: NTg (30°C) vs hCETP (30°C).

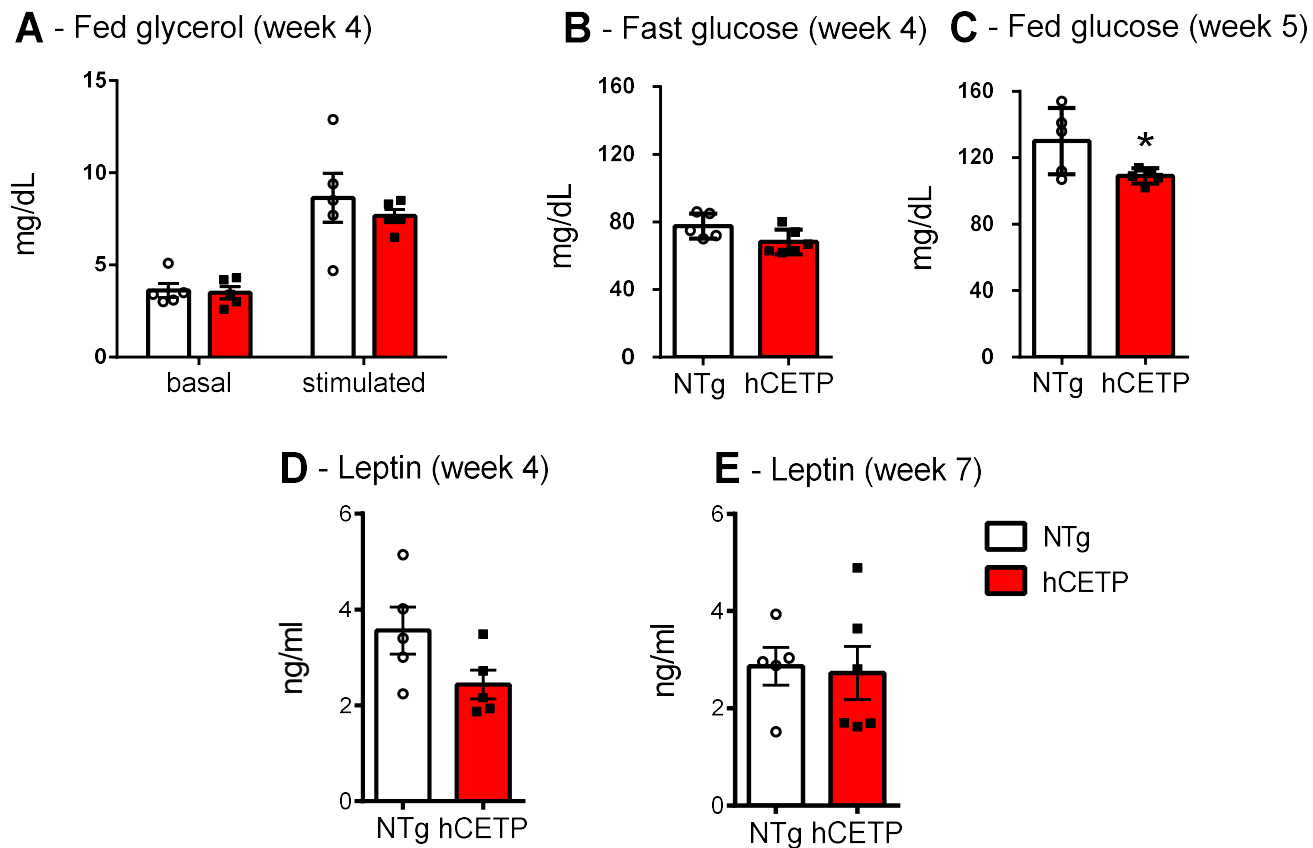


Figura 7. Níveis plasmáticos de glicerol, glicose e leptina durante termoneutralidade em camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Os níveis de glicerol foram medidos antes e após injeção intraperitoneal de isoproterenol (0,3 mg/Kg) (indicativo de lipólise) (**A**); glicemia em condição de jejum (**B**) e alimentado (**C**); leptinemia em condição alimentado na quarta (**D**) e sétima semana (**E**) em termoneutralidade. Média $\pm$ epm (n=5-6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

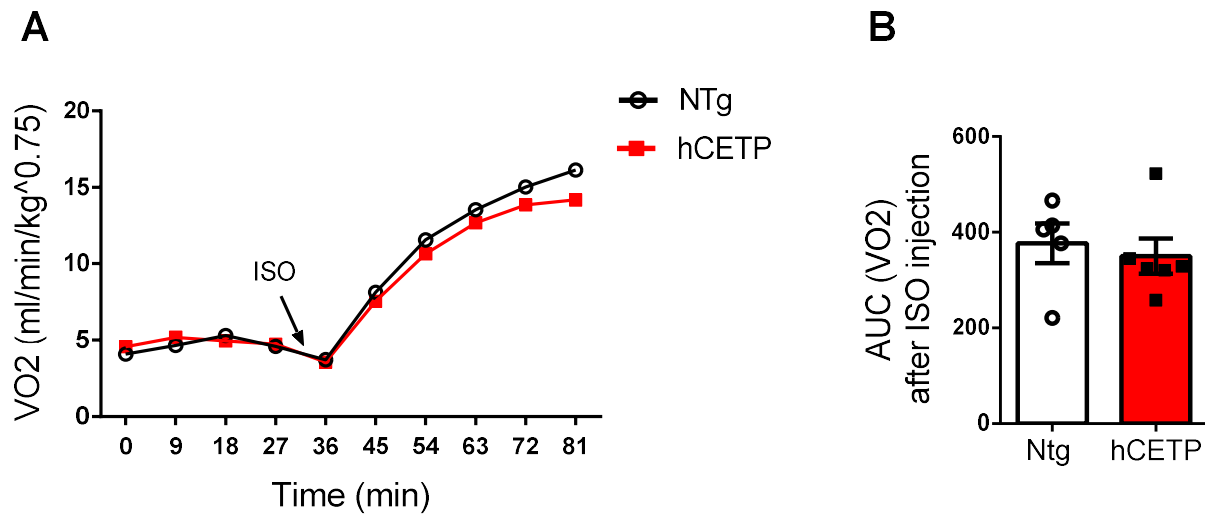


Figura 8. Taxa de consumo de oxigênio (VO₂) estimulada por isoproterenol (ISO, 10 mg/kg, *ip.*) em camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP) mantidos por 6 semanas em termoneutralidade. **(A)** consumo de oxigênio (VO₂) e **(B)** área sob a curva (AUC) de consumo de oxigênio após isoproterenol. Média ± epm (n=5).

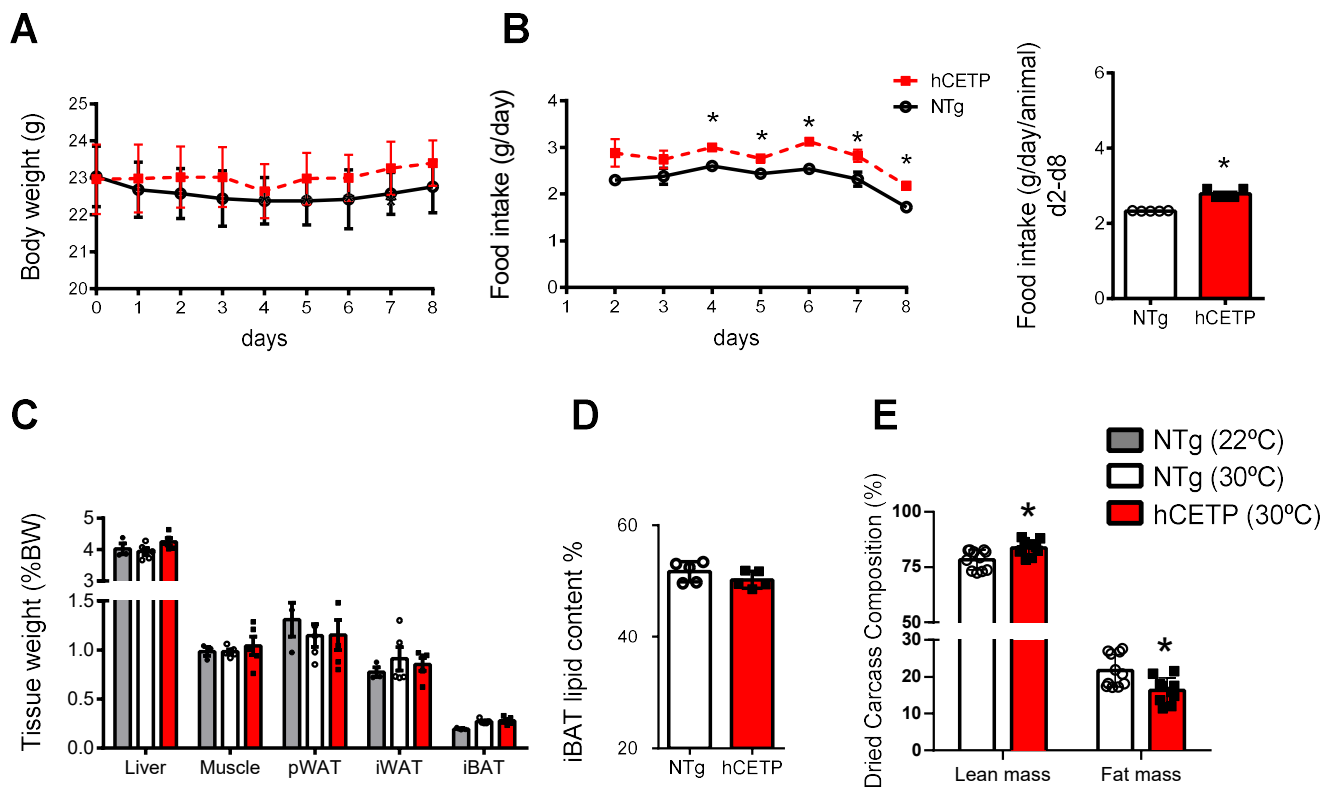


Figura 9. Peso corpóreo e dos tecidos e ingestão alimentar durante 1 semana em termoneutralidade (30°C). Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Média $\pm$ epm (n=5). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$: NTg (30°C) vs hCETP (30°C).

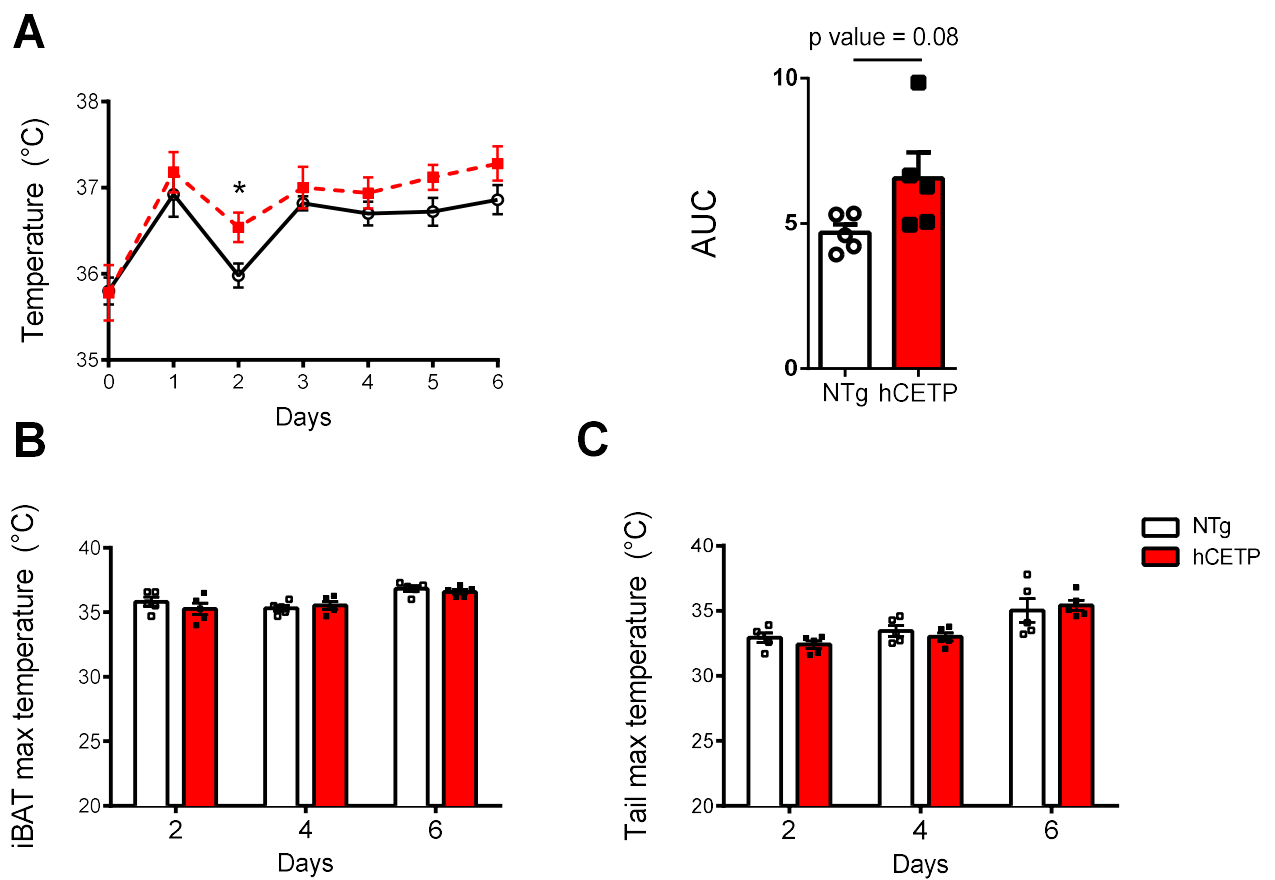


Figura 10. Temperatura retal (**A**), temperatura máxima da região do tecido adiposo marrom (**B**) e temperatura máxima da região da cauda (**C**) durante 1 semana em termoneutralidade. Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humano (hCETP). Média $\pm$ epm (n=5). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

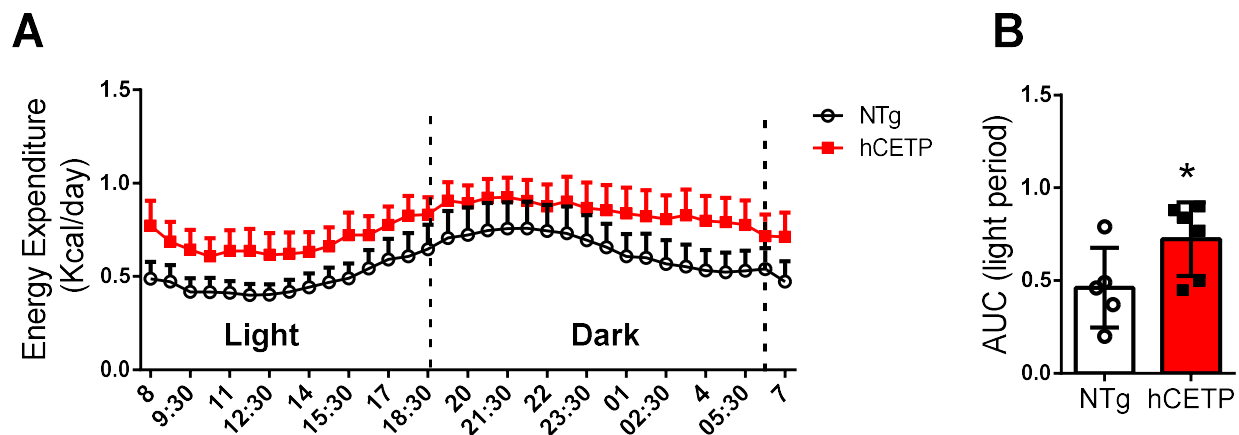


Figura 11. Taxa metabólica corporal estimada como gasto energético (EE) após 4 dias em termoneutralidade (**A**), gasto energético (EE) do período claro (**B**). Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humano (hCETP). Média $\pm$ epm (n=5). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

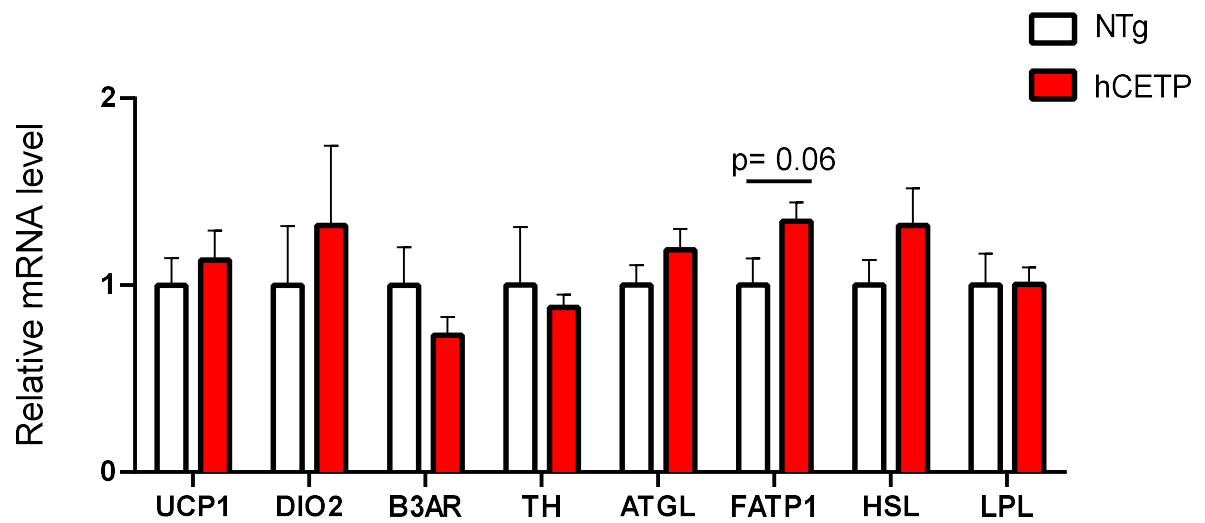


Figura 12: Expressão de genes relacionados a termogênese e lipólise em tecido adiposo marrom de animais hCETP e NTg mantidos em termoneutralidade (30°C) por 1 semana. Média $\pm$ epm (n=5). Controle interno do RT-PCR: *rplp0* (*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0* ou *60S acidic ribosomal protein P0*).

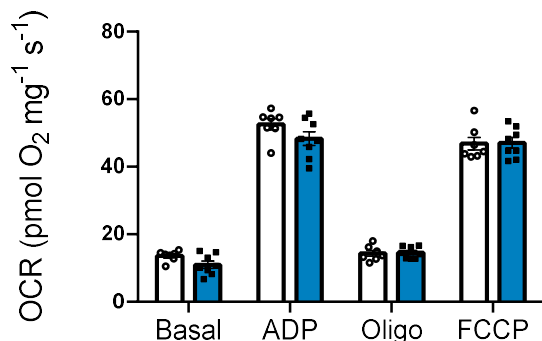
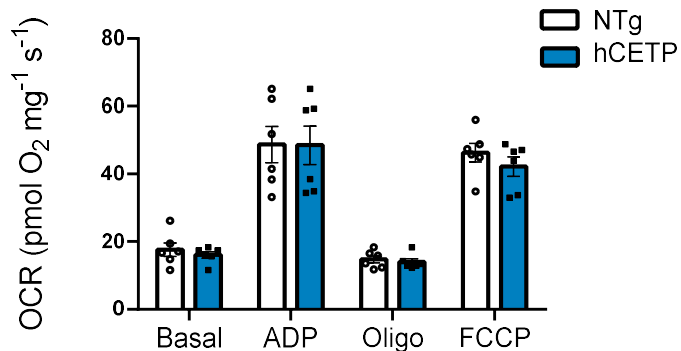
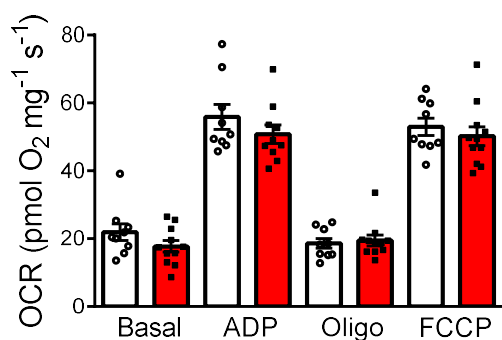
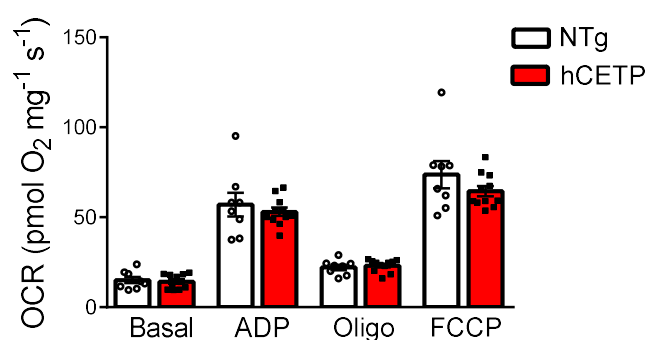
A Muscle (female) 22°C**B** Muscle (male) 22°C**C** Muscle (female) 30°C**D** Liver (female) 30°C

Figura 13. A expressão da CETP não altera a taxa de consumo de oxigênio (OCR- oxygen consumption rate) de biopsias de músculo (gastrocnêmio) de camundongos fêmeas (**A,C**) ou machos (**B**) e de fígado de fêmeas (**D**) em camundongos mantidos em temperatura de biotério padrão (22 °C) (**A,B**) ou em termoneutralidade (30 °C) (**C,D**) por 1 semana. Média $\pm$ epm (n=6).

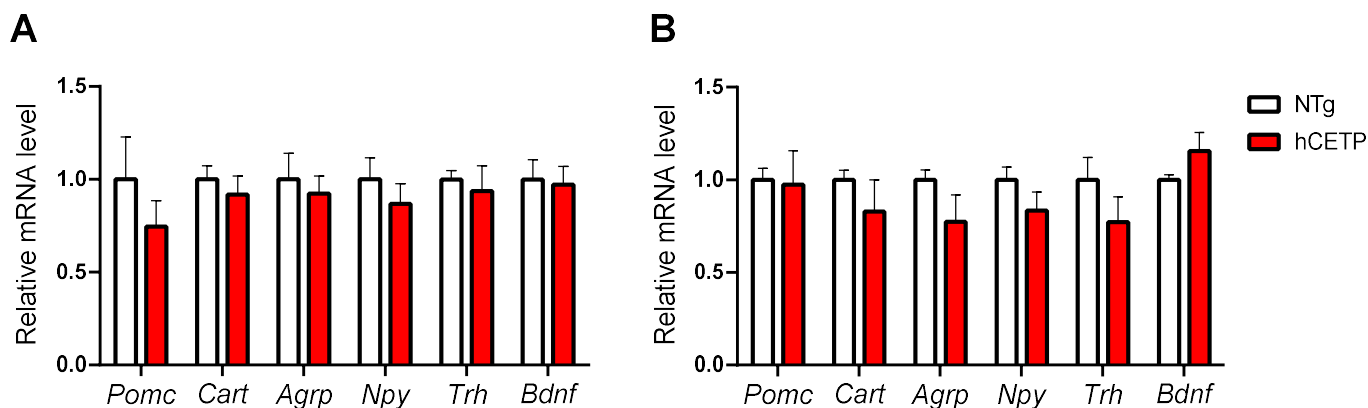


Figura 14. Expressão de RNAm de neuropeptídeos anorexigênicos, orexigênicos e *Bdnf* no hipotálamo de camundongos transgênicos para proteína de transferência de éster de colesterol humano (hCETP) e controles irmãos não transgênicos (NTg). Os camundongos foram expostos a temperatura de 30°C por 1 semana (**A**) ou 7 semanas (**B**), estado alimentado. Média $\pm$ EP. N = 5 para os genes *pomc*, *cart*, *agrp* e *npy*, e n = 4 para os genes *Trh* e *Bdnf*. Controle interno do RT-PCR: *gapdh*

FIGURAS SUPLEMENTARES

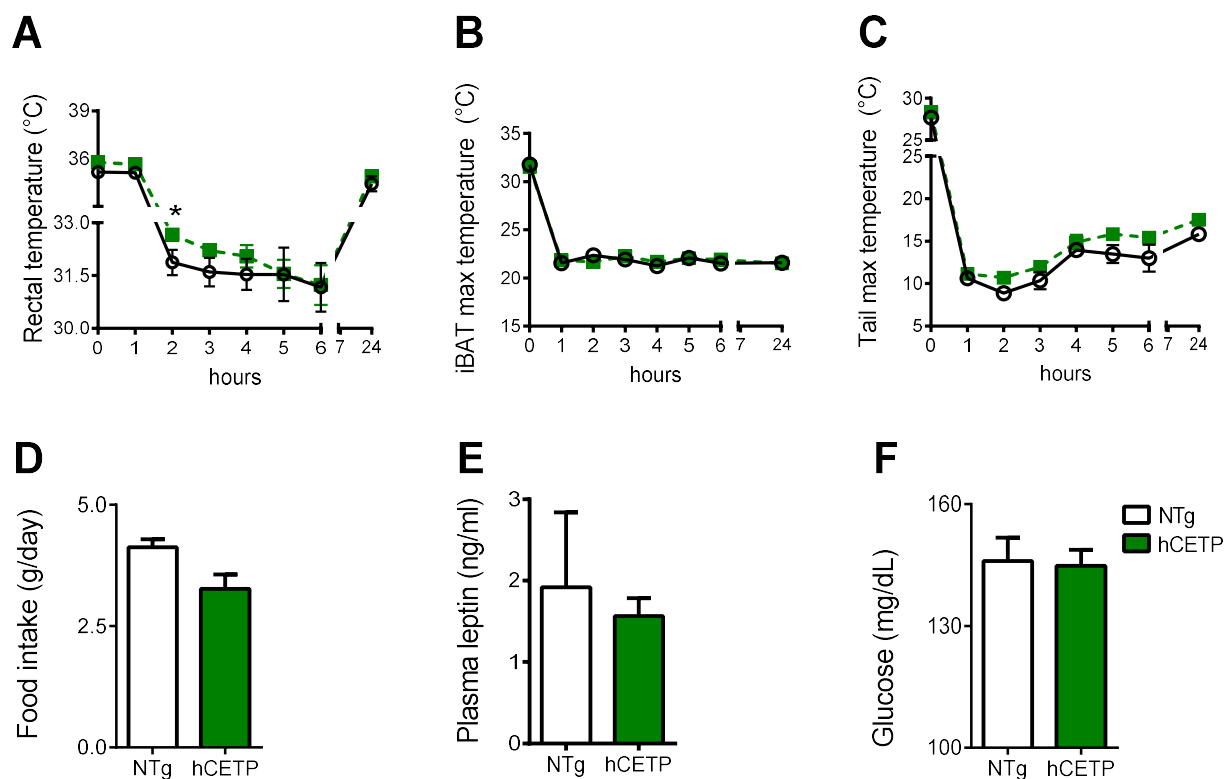


Figura S1. Temperatura corpórea (retal) (A), temperatura máxima da região do tecido adiposo marrom (B) e cauda (C), consumo alimentar (D), dosagem plasmática de leptina (E) e glicemia (F) de animais que foram expostos ao frio agudo (24 horas). Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

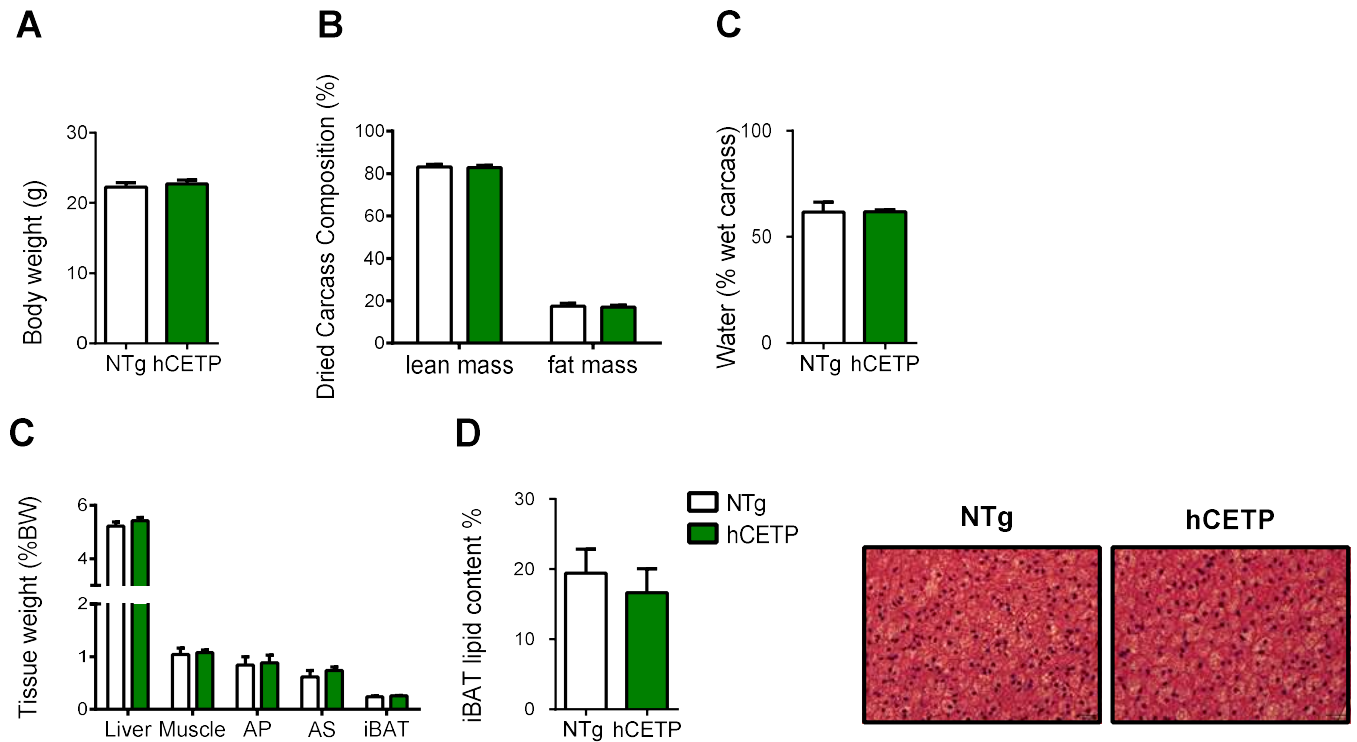


Figura S2. Consumo alimentar (**A**), composição da carcaça liofilizada (**B**) e % de água da carcaça (**C**), gravimetria dos tecidos (**D**), análise histológica do conteúdo lipídico do tecido adiposo marrom de animais que foram expostos ao frio agudo (24 horas). Camundongos não transgênicos (NTg) e transgênicos para CETP de humanos (hCETP). Média $\pm$ epm (n=6). Teste “t” de Student, * $p \leq 0.05$.

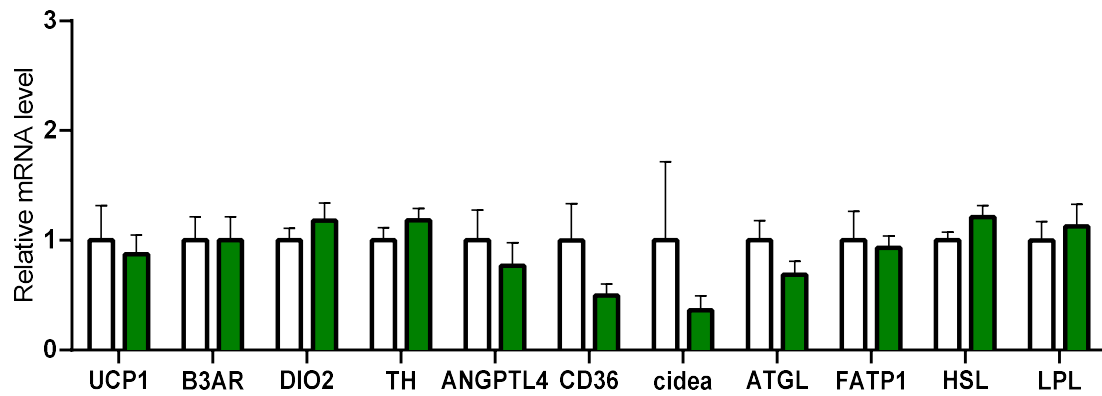
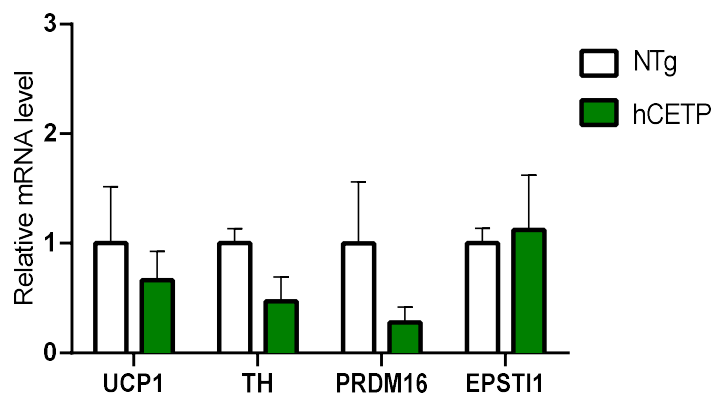
A**B**

Figura S3. Expressão de genes relacionados a termogênese e lipólise em tecido adiposo marrom **(A)** e adiposo subcutâneo inguinal **(B)** de animais hCETP e NTg submetidos ao frio (4 °C) por 24 horas. Média $\pm$ epm (n=4-6). Controle interno do RT-PCR: *Rplp0* (*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*)

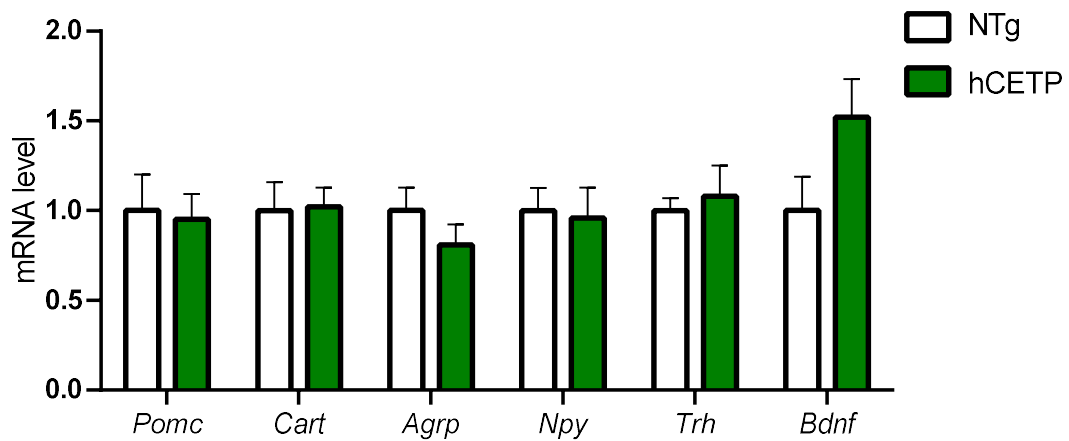


Figura S4: A expressão da CETP não modifica a expressão de genes de neuropeptídeos anorexigênicos, orexigênicos e de *Bdnf* no hipotálamo. Os camundongos foram expostos ao frio (4 °C) por 24 horas. Média $\pm$ epm. N = 4 para o grupo NTg e n = 6 para o grupo hCETP.

REFERÊNCIAS

- Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem*. 1991;266(17):10796-801
- Agellon LB, Zhang P, Jiang XC, Mendelsohn L, Tall AR. The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter. *J Biol Chem*. 1992;267(31):22336-9.
- Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC Jr, Elmquist JK, Lowell BB. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*. 2004 Jun 24;42(6):983-91. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.004
- Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem*. 2004 Feb;271(3):462-9. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x.
- Barzilai N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB. A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology*. 2006 Dec 26;67(12):2170-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000249116.50854.65
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007 Jul 12;448(7150):204-8. doi: 10.1038/nature05910.
- Berti JA, Amaral ME, Boschero AC, Nunes VS, Harada LM, Castilho LN, Oliveira HC. Thyroid hormone increases plasma cholesteryl ester transfer protein activity and plasma high-density lipoprotein removal rate in transgenic mice. *Metabolism*. 2001 May;50(5):530-6. doi: 10.1053/meta.2001.22514. PMID: 11319713.
- Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJ, Casquero AC, Boschero AC, Oliveira HC. Effects of diabetes and CETP expression on diet-induced atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *APMIS*. 2005 Jan;113(1):37-44. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130106.x. PMID: 15676013.
- Bell C, Day DS, Jones PP, Christou DD, Petitt DS, Osterberg K, Melby CL, Seals DR. High energy flux mediates the tonically augmented beta-adrenergic support of resting metabolic rate in habitually exercising older adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jul;89(7):3573-8. doi: 10.1210/jc.2003-032146.
- Benoist, F., Lau, P., McDonnell, M., Doelle, H., Milne, R., McPherson, R., 1997. Cholesteryl Ester Transfer Protein Mediates Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesteryl Esters by Human Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* 272(38): 23572–7, Doi: 10.1074/jbc.272.38.23572.
- Blauw LL, de Mutsert R, Lamb HJ, de Roos A, Rosendaal FR, Jukema JW, Wang Y, van Dijk KW, Rensen PC. Serum CETP concentration is not associated with measures of body fat: The NEO study. *Atherosclerosis*. 2016 Mar;246:267-73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.031.
- Blondin DP, Haman F. Shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles. *Handb Clin Neurol*. 2018;156:153-173. doi: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00010-2.
- Blondin DP, Labbé SM, Tingelstad HC, Noll C, Kunach M, Phoenix S, Guérin B, Turcotte EE, Carpentier AC, Richard D, Haman F. Increased brown adipose

- tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Mar;99(3):E438-46. doi: 10.1210/jc.2013-3901
- Blondin DP, Nielsen S, Kuipers EN, Severinsen MC, Jensen VH, Miard S, Jespersen NZ, Kooijman S, Boon MR, Fortin M, Phoenix S, Frisch F, Guérin B, Turcotte ÉE, Haman F, Richard D, Picard F, Rensen PCN, Scheele C, Carpentier AC. Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β 2-AR Stimulation. *Cell Metab.* 2020 Aug 4;32(2):287-300.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.005.
- Bowman L, Hopewell JC, Chen F, Wallendszus K, Stevens W, Collins R, Wiviott SD, Cannon CP, Braunwald E, Sammons E, Landray MJ. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med.* 2017 Sep 28;377(13):1217-1227. doi: 10.1056/NEJMoa1706444.
- Buning J, Dimova LG, Perton FG, Tietge UJF, van Beek AP, Dullaart RPF. Downregulation of cholesteryl ester transfer protein by glucocorticoids: a randomised study on HDL. *Eur J Clin Invest.* 2017;47(7):494-503. doi:10.1111/eci.12770
- Bray MS, Loos RJ, McCaffery JM, Ling C, Franks PW, Weinstock GM, Snyder MP, Vassy JL, Agurs-Collins T; Conference Working Group. NIH working group report-using genomic information to guide weight management: From universal to precision treatment. *Obesity (Silver Spring).* 2016 Jan;24(1):14-22. doi: 10.1002/oby.21381. Erratum in: *Obesity (Silver Spring).* 2016 Mar;24(3):757.
- Busanello ENB, Marques AC, Lander N, de Oliveira DN, Catharino RR, Oliveira HCF, Vercesi AE. Pravastatin Chronic Treatment Sensitizes Hypercholesterolemic Mice Muscle to Mitochondrial Permeability Transition: Protection by Creatine or Coenzyme Q₁₀. *Front Pharmacol.* 2017 Apr 5;8:185. doi: 10.3389/fphar.2017.00185.
- Calcagno M, Kahleova H, Alwarith J, Burgess NN, Flores RA, Busta ML, Barnard ND. The Thermic Effect of Food: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2019 Aug;38(6):547-551. doi: 10.1080/07315724.2018.1552544.
- Campos AMP, Teixeira PDS, Wasinski F, Klein MO, Bittencourt JC, Metzger M, Donato J Jr. Differences between rats and mice in the leptin action on the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Implications for the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Neuroendocrinol.* 2020 Sep;32(9):e12895. doi: 10.1111/jne.12895)
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003.
- Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol.* 2011 Jan 15;214(Pt 2):242-53. doi: 10.1242/jeb.050989.
- Cannon B, Nedergaard J. What Ignites UCP1? *Cell Metab.* 2017 Nov 7;26(5):697-698. doi: 10.1016/j.cmet.2017.10.012..
- Capri M, Salvioli S, Sevini F, Valensin S, Celani L, Monti D, Pawelec G, De Benedictis G, Gonos ES, Franceschi C. The genetics of human longevity. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 May;1067:252-63. doi: 10.1196/annals.1354.033.
- Casquero AC, Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJ, Cazita PM, Ketelhuth DF, Gidlund M, Oliveira HC. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1526-34.

- Cazita PM, Berti JA, Aoki C, Gidlund M, Harada LM, Nunes VS, Quintão EC, Oliveira HC. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. *J Lipid Res.* 2003;44(1):33-40.
- Cellini E, Nacmias B, Olivieri F, Ortenzi L, Tedde A, Bagnoli S, Petrucci C, Franceschi C, Sorbi S. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and longevity in Italian centenarians. *Mech Ageing Dev.* 2005 Jun-Jul;126(6-7):826-8. doi: 10.1016/j.mad.2005.01.009.
- Chen Y, Ikeda K, Yoneshiro T, Scaramozza A, Tajima K, Wang Q, Kim K, Shinoda K, Sponton CH, Brown Z, Brack A, Kajimura S. Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state. *Nature.* 2019 Jan;565(7738):180-185. doi: 10.1038/s41586-018-0801-z.
- Cheung MC, Wolfbauer G, Albers JJ. Plasma phospholipid mass transfer rate: relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Sep 27;1303(2):103-10.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007 Nov 23;318(5854):1258-65. doi: 10.1126/science.1150577.
- Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019 Jan 8;29(1):27-37. doi: 10.1016/j.cmet.2018.11.002.
- Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.* 2000 Jul 27;406(6794):415-8. doi: 10.1038/35019082.
- Clark RW. Raising high-density lipoprotein with cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Apr;6(2):162-8. doi: 10.1016/j.coph.2005.10.012.
- Costford SR, Chaudhry SN, Salkhordeh M, Harper ME. Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jun;290(6):E1304-12. doi: 10.1152/ajpendo.00401.2005.)
- Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Sep 28;12(11):722-34. doi: 10.1038/nrm3198. PMID: 21952300; PMCID: PMC7171550.
- Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Jun;22(6):393-409. doi: 10.1038/s41580-021-00350-0.
- Cui X, Nguyen NL, Zarebidaki E, Cao Q, Li F, Zha L, Bartness T, Shi H, Xue B. Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. *Physiol Rep.* 2016 May;4(10):e12799. doi: 10.14814/phy2.12799.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509-17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780.

- De Feo P, Di Loreto C, Lucidi P, Murdolo G, Parlanti N, De Cicco A, Piccioni F, Santeusano F. Metabolic response to exercise. *J Endocrinol Invest*. 2003 Sep;26(9):851-4. doi: 10.1007/BF03345235.
- Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, Paul SM, Hudak CS, Raposo HF, Kwan HY, Kang C, Wong RH, Sul HS. Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol Cell*. 2015 Jan 22;57(2):235-46. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.005.
- Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C, Lawn R. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*. 1987 Jun 18-24;327(6123):632-4. doi: 10.1038/327632a0.
- Durnin J. Basal Metabolic Rate in Man. University of Glasgow Glasgow Scotland. Joint FAO/WHO/ UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. 1981. Rome, 5-17 October
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foulle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004 Nov;86(11):839-48. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018.
- El Bouhassani M, Gilibert S, Moreau M, Saint-Charles F, Tréguier M, Poti F, Chapman MJ, Le Goff W, Lesnik P, Huby T. Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2011 May 13;286(19):17227-38.
- Enerbäck S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*. 2010 Apr 7;11(4):248-52. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.008.
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, . 2017;960:1-17. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_1.
- Eyolfson DA, Tikuisis P, Xu X, Weseen G, Giesbrecht GG. Measurement and prediction of peak shivering intensity in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2001 Jan-Feb;84(1-2):100-6. doi: 10.1007/s004210000329.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab*. 2009 Feb;9(2):203-9. doi: 10.1016/j.cmet.2008.12.014.
- Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J. Leptin: Is It Thermogenic? *Endocr Rev*. 2020 Apr 1;41(2):232–60. doi: 10.1210/endrev/bnz016.
- Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JMA, Petrovic N, Mittag J, Cannon B, Nedergaard J. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Rep*. 2016 Feb 23;14(7):1621-1631. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.041.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. 15:269–272.
- Fonseca-Alaniz, Miriam H, Takada, J, Alonso-Vale, Maria Isabel C., & Lima, Fabio Bessa. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinol. & Metabologia*. 2006. 50(2), 216-229. doi:10.1590/S0004-27302006000200008
- Gavva NR. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Nov;29(11):550-7. doi: 10.1016/j.tips.2008.08.003.

- Grant RW, Dixit VD. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity* (Silver Spring). 2015 Mar;23(3):512-8. doi: 10.1002/oby.21003. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25612251; PMCID: PMC4340740.
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. 1997. *Diabetes*. 46:900–906.
- Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gamber P, Lallemand C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta*. 1994 Dec 16;231(2):147-60.
- Golay A, Allaz AF, Morel Y, de Tonnac N, Tankova S, Reaven G. Similar weight loss with low- or high-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr*. 1996. 63:174–178
- Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennström B, Nedergaard, J. Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol*. 2004;18, 384–401.
- Ha YC, Barter PJ. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp Biochem Physiol B*. 1982. 71(2):265- 269.
- Haemmerle, G.; Zimmermann, R.; Hayn, M.; Theussl, C.; Waeg, G.; Wagner, E.; Sattler, W.; Magin, T.M.; Wagner, E.F.; Zechner, R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem*. 2002, 277, 4806–4815.
- Hall KD. Diet versus exercise in "the biggest loser" weight loss competition. *Obesity* (Silver Spring). 2013 May;21(5):957-9. doi: 10.1002/oby.20065.
- Hall JE, da Silva AA, do Carmo JM, Dubin J, Hamza S, Munusamy S, Smith G, Stec DE. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *J Biol Chem*. 2010 Jun 4;285(23):17271-6. doi: 10.1074/jbc.R110.113175. Epub 2010 Mar 26.
- Harada LM, Amigo L, Cazita PM, Salerno AG, Rigotti AA, Quintão EC, Oliveira HC. CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. *Atherosclerosis*. 2007 Apr;191(2):313-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.036.
- Harder C, Lau P, Meng A, Whitman SC, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression protects against diet induced atherosclerosis in SR-BI deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Apr;27(4):858-64
- Harlan SM, Morgan DA, Agassandian K, Guo DF, Cassell MD, Sigmund CD, Mark AL, Rahmouni K. Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ Res*. 2011 Apr 1;108(7):808-12. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240226. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311043; PMCID: PMC3072835.
- Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest*. 1995 Oct;96(4):2071-4. doi: 10.1172/JCI118255. PMID: 7560101; PMCID: PMC185846.
- Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*. 1997; 100: 270–278
- Hesler, C. B., Swenson, T. L., and Tall, A. R. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Biol. Chem*. (1987) 262, 2275–2282.

- Hesselink MK, Mensink M, Schrauwen P. Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obes Res.* 2003 Dec;11(12):1429-43. doi: 10.1038/oby.2003.192.
- Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med.* 2017 Jan 19;376(3):254-266. doi: 10.1056/NEJMr1514009. PMID: 28099824.
- Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev.* 2006 Dec;27(7):750-61. doi: 10.1210/er.2006-0032
- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, Claus TH. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol.* 1994 Apr;266(4 Pt 2):R1371-82. doi: 10.1152/ajpregu.1994.266.4.R1371. PMID: 7910436.
- Hirano, K., Yamashita, S., Nakajima, N., Arai, T., Maruyama, T., Yoshida Y., Ishigami M. Sakai N., Kameda-Takemura K., and Matsuzawa Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan: marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1997) 17, 1053–1059.
- Horton TJ, Drougas H, Brachey A, Reed GW, Peters JC, Hill JO. Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage. *Am J Clin Nutr.* 1995. 62:19–29
- Huijsman, E.; van de Par, C.; Economou, C.; van der Poel, C.; Lynch, G.S.; Schoiswohl, G.; Haemmerle, G.; Zechner, R.; Watt, M.J. Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009, 297, E505–E513.
- Hulbert AJ, Else PL. Basal metabolic rate: history, composition, regulation, and usefulness. *Physiol Biochem Zool.* 2004 Nov-Dec;77(6):869-76. doi: 10.1086/422768.
- Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, Shinoda K, Chen Y, Lu X, Maretich P, Tajima K, Ajuwon KM, Soga T, Kajimura S. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017 Dec;23(12):1454-1465. doi: 10.1038/nm.
- Iwen KA, Backhaus J, Cassens M, Walzl M, Hedesan OC, Merkel M, Heeren J, Sina C, Rademacher L, Windjäger A, Haug AR, Kiefer FW, Lehnert H, Schmid SM. Cold-induced brown adipose tissue activity alters plasma fatty acids and improves glucose metabolism in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017; 102, 4226–4234.
- Iwen KA, Oelkrug R, Brabant G. Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. *J Mol Endocrinol.* 2018 Apr;60(3):R157-R170. doi: 10.1530/JME-17-0319.
- Izem L, Greene DJ, Bialkowska K, Morton RE. Overexpression of full-length cholesteryl ester transfer protein in SW872 cells reduces lipid accumulation. *J Lipid Res.* 2015; 56(3):515-25.
- Izem L, Morton RE (2007) Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. *J Biol Chem* 282:21856–21865

- Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem*. 1991 Mar 5;266(7):4631-9. PMID: 1999438.
- Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest*. 1992. 90: 1290-1295.
- Jiang XC, Masucci-Magoulas L, Mar J, Lin M, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein. Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles. *J Biol Chem*. 1993. 268(36):27406 12.
- Johansson LE, Danielsson AP, Parikh H, Klintenberg M, Norström F, Groop L, Ridderstråle M. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. *Am J Clin Nutr*. 2012 Jul;96(1):196-207. doi: 10.3945/ajcn.111.020578.
- Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, Chin S, Tempst P, Lazar MA, Spiegelman BM. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*. 2008; 22(10):1397-409.
- Kako Y, Massé M, Huang LS, Tall AR, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase deficiency and CETP in streptozotocin-treated apoB-expressing mice. *J Lipid Res*. 2002 Jun;43(6):872-7. PMID: 12032161.
- Keijer J, Li M, Speakman JR. What is the best housing temperature to translate mouse experiments to humans? *Mol Metab*. 2019; 25:168-176.
- Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2914-23. doi: 10.1172/JCI118363. PMID: 8675663; PMCID: PMC186003.
- Kopecký J, Hodný Z, Rossmeisl M, Syrový I, Kozak LP. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):E768-75. doi: 10.1152/ajpendo.1996.270.5.E768. PMID: 8967464.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; 6;404(6778):635-43.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):333-43. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.
- Lay, S.L., Krief, S., Farnier, C., Lefrère, I., Liepvre, X.L., Bazin, R., et al., 2001. Cholesterol, a Cell Size-dependent Signal That Regulates Glucose Metabolism and Gene Expression in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 276(20): 16904–10, Doi: 10.1074/jbc.M010955200.
- Laskowski KR, Russell RR 3rd. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2008 Jun;5(2):75-9. doi: 10.1007/s11897-008-0013-1.
- Locke AE, Kahali B, Berndt SI. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518:197–206. , et al.
- Lou Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest*. 2000 Feb;105(4):513-20. doi: 10.1172/JCI8573

- Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404: 652– 660.
- MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Osborne JN, Bradfield JF, Burden HW, Bensch WH, Kauffman RF, Barakat HA. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Aug 1;23(8):1412-5.
- Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*. 1993;364(6432):73-5.
- Mayer J, Barnett RJ. Sensitivity to cold in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome of mice. *Yale J Biol Med*. 1953;26(1):38–45.
- McArdle, William D. *Exercise Physiology* (2nd ed.). Philadelphia: Lea & Febigier. 1986. P. 240.
- McMurray RG, Soares J, Caspersen CJ, McCurdy T. Examining variations of resting metabolic rate of adults: a public health perspective. *Med Sci Sports Exerc*. 2014 Jul;46(7):1352-8. doi: 10.1249/MSS.0000000000000232
- Meigal A. Gross and fine neuromuscular performance at cold shivering. *Int J Circumpolar Health*. 2002 May; 61(2):163-72. doi: 10.3402/ijch.v61i2.17449.
- Nakamura, Y., Nakamura, K. Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2018; 470, 823–837
- Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab*. 2010 Apr 7;11(4):268-72. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.007. PMID: 20374959.
- Okamatsu-Ogura Y, Nio-Kobayashi J, Nagaya K, Tsubota A, Kimura K. Brown adipocytes postnatally arise through both differentiation from progenitors and conversion from white adipocytes in Syrian hamster. *J. Appl. Physiol*. 2018;124, 99–108.
- Oliveira HC, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life*. 2011;63(4):248-57.
- Oliveira, H.C.F.. Adipócito. In: *Hernandes F Carvalho; Carla B. Collares-Buzato. (Org.). Células: Uma abordagem multidisciplinar*. 1ed.Barueri, SP: Manole, 2005, v. , p. 1-10.).
- Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1996;271(50):31831-8.
- Oliveira, H.C.F., Raposo, H.F., 2020. Cholesteryl Ester Transfer Protein and Lipid Metabolism and Cardiovascular Diseases. In: Jiang, X.-C., editor. *Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease*, Singapore: Springer p. 15–25.
- Oliver P, Lombardi A, De Matteis R. Editorial: Insights Into Brown Adipose Tissue Functions and Browning Phenomenon. *Front Physiol*. 2020 Mar 6;11:219. doi: 10.3389/fphys.2020.00219.

- Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <
<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.
 Acesso em: 22. Jan. 2021
- Pearson H. When good cholesterol turns bad. *Nature*. 2006; 444: 794-795.
- Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33:5533–5541.
- Pratley R, Nicklas B, Rubin M, Miller J, Smith A, Smith M, Hurley B, Goldberg A. Strength training increases resting metabolic rate and norepinephrine levels in healthy 50- to 65- yr-old men. *J Appl Physiol* 1994; 76: 133–137. doi: 10.1152/jappl.1994.76.1.133.
- Quinet E, Tall A, Ramakrishnan R, Rudel L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 1991;87(5):1559-1566.
- Quinet EM, Agellon LB, Kroon PA, Marcel YL, Lee YC, Whitlock ME, Tall AR. Atherogenic diet increases cholesteryl ester transfer protein messenger RNA levels in rabbit liver. *J Clin Invest*. 1990; 85(2):357-363.
- Rahmouni K. Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation: Signaling Mechanisms and Cardiovascular Consequences in Obesity. *Curr Hypertens Rev*. 2010 May 1;6(2):104-209. doi: 10.2174/157340210791170994.
- Ran, C., Hoon, M. & Chen, X. The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat Neurosci* 2016; 19, 1201–1209
 Nov 6:154429. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154429.
- Raposo HF, Forsythe P, Chausse B, Castelli JZ, Moraes-Vieira PM, Nunes VS, Oliveira HCF. Novel role of cholesteryl ester transfer protein (CETP): attenuation of adiposity by enhancing lipolysis and brown adipose tissue activity. *Metabolism*. 2021 Jan;114:154429. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154429.
- Raposo HF, Paiva AA, Kato LS, de Oliveira HC. Apolipoprotein CIII overexpression exacerbates diet-induced obesity due to adipose tissue higher exogenous lipid uptake and retention and lower lipolysis rates. *Nutr Metab (Lond)*. 2015 12:6.
- Reverte-Salisa L, Sanyal A, Pfeifer A. Role of cAMP and cGMP Signaling in Brown Fat. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;251:161-182. doi: 10.1007/164_2018_117.
- Rodríguez E, Mateo I, Infante J, Llorca J, Berciano J, Combarros O. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. *J Neurol*. 2006 Feb;253(2):181-5. doi: 10.1007/s00415-005-0945-2.
- Romanovsky AA. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol(Oxf)* 2014;210:498–507.
- Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. *Functional architecture of the thermoregulatory system*. *Am J Physiol* 2007; 292: R37-R46
- Rossato M, Granzotto M, Macchi V, et al. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol* 2014;383:137–46.

- Rowland LA, Bal NC, Periasamy M. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015 Nov;90(4):1279-97. doi: 10.1111/brv.12157.
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*; 2009;58(7):1526-31
- Salerno AG, Patrício PR, Berti JA, Oliveira HC. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) increases postprandial triglyceridaemia and delays triacylglycerol plasma clearance in transgenic mice. *Biochem J.* 2009;419(3):629-34
- Salerno AG, Silva TR, Amaral MEC, Alberici LC, Bonfleur ML, Patrício PR, Francesconi EPMS, Grassi-Kassisse DM, Vercesi AE, Boschero AC, Oliveira HCF. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(10):1586-95.
- Sanders AE, Wang C, Katz M, Derby CA, Barzilai N, Ozelius L, Lipton RB. Association of a functional polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene with memory decline and incidence of dementia. *JAMA.* 2010 Jan 13;303(2):150-8. doi: 10.1001/jama.2009.
- Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients.* 2015 Nov 13;7(11):9453-74. doi: 10.3390/nu7115475.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):961-7. doi: 10.1038/nature07182. PMID: 18719582; PMCID: PMC2583329.
- Schoeller DA, Shay K, Kushner RF. How much physical activity is needed to minimize weight gain in previously obese women? *Am J Clin Nutr.* 1997 Sep;66(3):551-6. doi: 10.1093/ajcn/66.3.551.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661-71. doi: 10.1038/35007534. PMID: 10766253.
- Schwingshackl L, Dias S, Strasser B, Hoffmann G. Impact of Different Training Modalities on Anthropometric and Metabolic Characteristics in Overweight/Obese Subjects: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2013; 8(12): e82853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082853>
- Shaw, C.S.; Clark, J.A.; Shepherd, S.O. HSL and ATGL: The movers and shakers of muscle lipolysis. *J. Physiol.* 2013, 591, 6137–6138
- Shi LL, Fan WJ, Zhang JY, Zhao XY, Tan S, Wen J, Cao J, Zhang XY, Chi QS, Wang DH, Zhao ZJ. The roles of metabolic thermogenesis in body fat regulation in striped hamsters fed high-fat diet at different temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2017;12:35-44.
- Shuangtao Ma, Hao Yu, Zhigang Zhao, Zhidan Luo, Jing Chen, Yinxing Ni, Rongbing Jin, Liqun Ma, Peijian Wang, Zhenyu Zhu, Li Li, Jian Zhong, Daoyan Liu, Bernd Nilius, Zhiming Zhu, Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents

- obesity, *Journal of Molecular Cell Biology*, v.4, Issue 2, April 2012, p.88–96
- Simcox J, Geoghegan G, Maschek JA, Bensard CL, Pasquali M, Miao R, Lee S, Jiang L, Huck I, Kershaw EE, Donato AJ, Apte U, Longo N, Rutter J, Schreiber R, Zechner R, Cox J, Villanueva CJ. Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis. *Cell Metab.* 2017;26(3):509-522.
- Simonsen L, Bulow J, Madsen J, Christensen NJ. Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol* 1992; 263: E850–E855.
- Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr.* 2004 Aug;134(8 Suppl):2090S-2105S. doi: 10.1093/jn/134.8.2090S.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 2013.123, 215–223.
- Sveidahl Johansen O, Ma T, Hansen JB, Markussen LK, Schreiber R, Reverte-Salisa L, Dong H, Christensen DP, Sun W, Gnad T, Karavaeva I, Nielsen TS, Kooijman S, Cero C, Dmytriyeva O, Shen Y, Razzoli M, O'Brien SL, Kuipers EN, Nielsen CH, Orchard W, Willemsen N, Jespersen NZ, Lundh M, Sustarsic EG, Hallgren CM, Frost M, McGonigle S, Isidor MS, Broholm C, Pedersen O, Hansen JB, Grarup N, Hansen T, Kjær A, Granneman JG, Babu MM, Calebiro D, Nielsen S, Rydén M, Soccio R, Rensen PCN, Trebak JT, Schwartz TW, Emanuelli B, Bartolomucci A, Pfeifer A, Zechner R, Scheele C, Mandrup S, Gerhart-Hines Z. Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPR3 to induce adipose thermogenesis. *Cell.* 2021 Jun 24;184(13):3502-3518.e33. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.037.
- Swoap SJ. The pharmacology and molecular mechanisms underlying temperature regulation and torpor. *Biochem Pharmacol.* 2008 Oct 1;76(7):817-24. doi: 10.1016/j.bcp.2008.06.017.
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Wang N. The failure of torcetrapib: was it the molecule or the mechanism? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:257-260
- Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64:235–257.
- Talbot, C.P.J., Plat, J., Joris, P.J., Konings, M., Kusters, Y.H.A.M., Schalkwijk, C.G., et al., 2018. HDL cholesterol efflux capacity and cholesteryl ester transfer are associated with body mass, but are not changed by diet-induced weight loss: A randomized trial in abdominally obese men. *Atherosclerosis.* 2018. 274: 23–8, Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.029.
- Tan CL, Knight ZA. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron.* 2018 Apr 4;98(1):31-48. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.022.
- Terán-García M, Després JP, Tremblay A, Bouchard C. Effects of cholesterol ester transfer protein (CETP) gene on adiposity in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis* 2008;196, 455– 460.
- Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, Langin D. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia.* 2007 Oct;50(10):2190-9. doi: 10.1007/s00125-007-0765-2

- Triaca LM, Dos Santos AMA, Tejada CAO. Socioeconomic inequalities in obesity in Brazil. *Econ Hum Biol.* 2020 Dec;39:100906. doi: 10.1016/j.ehb.2020.100906. Epub 2020 Jul 12. PMID: 32721628.
- Tsiloulis T, Watt MJ. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;135:175-201. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.016.
- Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol Pharm Bull* 2001;24:579–581
- Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- Vercesi AE, Borecký J, Maia Ide G, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:383-404. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105335.
- Veyrat-Durebex C, Poher AL, Caillon A, Montet X, Rohner-Jeanrenaud F. Alterations in lipid metabolism and thermogenesis with emergence of brown adipocytes in white adipose tissue in diet-induced obesity-resistant Lou/C rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Jun;300(6):E1146-57. doi: 10.1152/ajpendo.00575.2010. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21406614.
- Warren, J. B.; Dalton, N.; Turner, C.; Clark, T. J. H.; Toseland, P. A. Adrenaline Secretion during Exercise. *Clinical Science*, 1984;66(1), 87–90. doi:10.1042/cs0660087
- Wijers SL, Saris WH, WD VML. Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes. Rev.* 2009; 10 (2), 218–226.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. *Genes Dev* 2013;27(3):234-50.
- Yoneshiro T, Rodríguez-Rodríguez R, Betz MJ and Rensen PCN Editorial: Current Challenges for Targeting Brown Fat Thermogenesis to Combat Obesity. *Front. Endocrinol.* 2020;11:600341. doi: 10.3389/fendo.2020.600341
- Zhang Y, Chua S Jr. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol.* 2017 Dec 12;8(1):351-369. doi: 10.1002/cphy.c160041.
- Zhang, Yiying; Proenca, Ricardo; Maffei, Margherita; Barone, Marisa; Leopold, Lori; Friedman, Jeffrey M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. 1994; 372(6505), 425–432. doi:10.1038/372425a0
- Zhou H, Li Z, Silver DL, Jiang XC. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(12):1482-8.

ANEXO I



CEUA/Unicamp

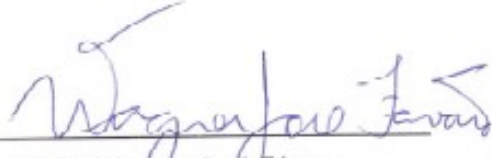
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Impacto da expressão da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) na adiposidade em condição de termoneutralidade e dieta obesogênica: foco no tecido adiposo branco** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **5122-1/2019**), de responsabilidade do Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, teve aprovada a inclusão de nova executora, pós-graduanda **Júlia Zago Castelli**.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 14/03/2019.

Campinas, 25 de abril de 2019.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente da CEUA/UNICAMP


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

ANEXO II



CERTIFICADO

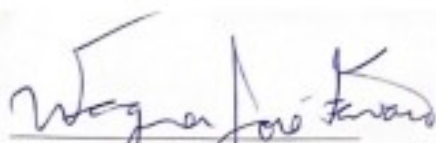
Certificamos que a proposta intitulada Impacto da expressão da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) na adiposidade em condição de termoneutralidade e dieta obesogênica: foco no tecido adiposo branco, registrada com o nº 5122-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Helena Coutinho Franco de Oliveira e Helena Fonseca Raposo, 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 reunião de 14/03/2019.

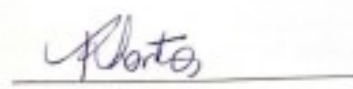
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2018 a 01/12/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/03/2019 a 01/12/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J
No. de animais:	26
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J
No. de animais:	26
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tail
No. de animais:	26
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tail
No. de animais:	26

Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tall
No. de animais:	13
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tall
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tall
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Tg(CETP)5203Tall
No. de animais:	13
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	50
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	25 Machos 25 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	100
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	50 Machos 50 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J sem NNT
No. de animais:	26
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / 001929 C57BL/6 Tg(CETP)UCTP20Pnu/J sem NNT
No. de animais:	26
Idade/Peso:	5.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	13 Machos 13 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / wistar
No. de animais:	40
Idade/Peso:	3.00 Meses / 300.00 Gramas
Sexo:	20 Machos 20 Fêmeas
Origem:	Os camundongos usados serão gerados no Biotério de acordo com prot. CEUA 5105-1/2018. Para isso serão feitos cruzamentos dos camundongos das próprias linhagens transgênicas (adquiridos anteriormente) com animais não transgênicos adquiridos no CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP

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

Campinas, 06 de junho de 2019.


Prof. Dr. Wagner José Fávoro
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 do CEJAS/MCAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novas proteções sejam submetidas.

ANEXO III**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 **IMPACTO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTER (CETP) NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO AO FRIO E TERMONEUTRALIDADE**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05 de abril de 2022



Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Júlia Zago Castelli**

RG n.º 50.459.138-1



Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Helena Coutinho Franco de Oliveira**

RG n.º 7.563.630