



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
COORDENADORIA GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
NÚCLEO DE PESQUISA EM PLANTA MEDICINAL - NPPM

LORENA BRAZ DE OLIVEIRA

**Efeito da associação entre óleo de peixe e agonista β 3-adrenérgico sobre o
balanço energético**

Teresina – PI
2019

LORENA BRAZ DE OLIVEIRA

**Efeito da associação entre óleo de peixe e agonista β 3-adrenérgico sobre o
balanço energético**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI) para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área: Farmacologia Endócrino

Orientador: Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres Leal.

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do CCS

Serviço de Processamento Técnico

Oliveira, Lorena Braz de.

O48e Efeito da associação entre óleo de peixe e agonista β 3-adrenérgico sobre o balanço energético / Lorena Braz de Oliveira. – 2019.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de PósGraduação em Farmacologia, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal.

Bibliografia

1. Balanço energético corporal. 2. Óleo de peixe. 3. Mirabegrona. I. Título.

CDD 615.7

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

BRAZ DE OLIVEIRA, Lorena

Efeito da associação entre óleo de peixe e agonista β 3-adrenérgico sobre o balanço energético

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Aprovado em: 21/11 /2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. FRANCISCO LEONARDO TORRES LEAL

Julgamento: _____

Prof(a). Dr. SALETE MARIA DA ROCHA CIPRIANO BRITO

Julgamento: _____

Prof. Dr. WALLACE RODRIGUES DE HOLANDA MIRANDA

Julgamento: _____

Prof. Dr. LUCIANO DA SILVA LOPES

InJulgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar pelos caminhos tortuosos. Aos meus pais Ivanídia e José Braz pelo imensurável apoio dado a suas filhas diante as dificuldades. As minhas irmãs, Layze e Larissa que me fazem sentir a certeza que nunca estarei só e a toda a minha família que está comigo onde quer que eu esteja.

Ao meu noivo, Michel, por sempre estar ao meu lado e ser o grande incentivador dos meus sonhos tornados meus dias mais leves.

Ao meu orientador, Francisco Leonardo, pelo crescimento profissional e aprendizados que me proporcionou e também pelo acolhimento. A todos os professores, por todo os conselhos e ajuda durante os meus estudos e elaboração de todo meu trabalho.

A todos do grupo DOMEN por estarem presentes em momentos importantes do meu trabalho, em especial à Amanda pelo companheirismo das manhãs e palavras de apoio.

Aos meus amigos de trabalho e parceiros de pesquisa, por toda a ajuda e apoio durante este período tão importante da minha formação acadêmica. A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

“Dificuldades preparam pessoas para destinos extraordinários.”

C.S.LEWIS

RESUMO

OLIVEIRA, L. B. EFEIO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ÓLEO DE PEIXE E AGONISTA β 3-ADRENÉRGICO SOBRE O BALANÇO ENERGÉTICO. 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí. Teresina – PI.

O aumento drástico da prevalência de patologias associadas ao ganho de peso é resultado do desequilíbrio no balanço energético corporal, o que caracteriza uma desregulação neuroendócrina e leva a um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas. Frente à importância das alterações causadas por esse desbalanço, estratégias são empregadas com a finalidade de elevar a eficácia de perda de peso, como por exemplo, o uso de nutrientes presentes nos alimentos, como o óleo de peixe, capaz de ligar-se a receptores importantes na manutenção da homeostase energética, associado à estimulação do receptor β 3-adrenérgico, um dos principais responsáveis pela termogênese e gasto energético. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a utilização do óleo de peixe (OP) potencializa a ação β 3-adrenérgica do agonista mirabegrone (MIRA) em ratos. Após o estudo dose-resposta foram selecionadas as doses com maior efeito para os tratamentos via oral (V.O) e intracerebroventricular (ICV), estas doses foram utilizadas no tratamento crônico (8 dias), os animais foram segregados em quatro grupos, Salina, OP, MIRA e OP+MIRA. A associação de OP+MIRA (V.O) mostrou-se mais eficaz que os demais tratamentos para, redução do peso corporal, consumo de ração e aumento da temperatura interescapular, além de aumento da expressão de genes responsáveis pelo fenótipo termogênico (LPL, UCP1 e ADRB3) e redução da expressão do gene relacionado à adipogênese (PPAR γ) no tecido adiposo branco epididimal (TABepi) onde a frequência de distribuição referente à área dos adipócitos foi menor para o grupo OP+MIRA. Após a estimulação da termogênese através do frio o tratamento OP+MIRA sobrepôs seu efeito termogênico em relação aos grupos salina e OP, e após exposição contínua ao calor o tratamento OP+MIRA manteve a temperatura interescapular maior que os demais tratamentos mesmo em uma condição de redução da taxa metabólica. O protocolo realizado com um β -bloqueador revelou que apenas os grupos MIRA e OP+MIRA são influenciados pela via simpática no aumento da temperatura interescapular, porém sem promover aumento da pressão arterial média, verificado através do protocolo de pressão arterial média por medida indireta. A associação entre OP+MIRA no tratamento ICV promoveu redução no consumo de ração e a frequência de distribuição referente à área dos adipócitos deste grupo foi menor que os demais tratamentos. Conclui-se que a terapia combinada utilizando OP e MIRA mostra-se eficaz na modulação do balanço energético, com efeitos sobre o peso corporal, o consumo de ração e termogênese interescapular podendo constituir uma estratégia futura para estudos de tratamento e prevenção da obesidade.

Palavras-chave: balanço energético, óleo de peixe, mirabegrone.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. B. **EFFECT OF THE ASSOCIATION BETWEEN FISH OIL AND β 3-ADRENERGIC AGONIST ON THE ENERGY BALANCE.** 2019. Dissertation (Master) - Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Piauí. Teresina - PI.

The drastic increase in the prevalence of pathologies associated with weight gain is a result of imbalance in body energy balance, which characterizes neuroendocrine dysregulation and leads to a heterogeneous group of conditions with multiple causes. Given the importance of the changes caused by this imbalance, strategies are employed to increase the effectiveness of weight loss, such as the use of nutrients present in food, such as fish oil, capable of binding to receptors. important in maintaining energy homeostasis, associated with stimulation of the β 3-adrenergic receptor, one of the main factors responsible for thermogenesis and energy expenditure. The present study aimed to evaluate if the use of fish oil (OP) potentiates the β 3-adrenergic action of mirabegron agonist (MIRA) in rats. After the dose-response study, the doses with the greatest effect for oral (VO) and intracerebroventricular (ICV) treatments were selected. These doses were used for chronic treatment (8 days), the animals were segregated into four groups, Salina, OP. , MIRA and OP + MIRA. The association of OP + MIRA (VO) was more effective than the other treatments for body weight reduction, feed intake and interscapular temperature increase, as well as increased expression of genes responsible for thermogenic phenotype (LPL, UCP1 and ADRB3) and reduction of adipogenesis-related gene (PPAR γ) expression in epididymal white adipose tissue (TABepi) where the frequency of distribution regarding adipocyte area was lower for the OP + MIRA group. After cold thermogenesis stimulation, the OP + MIRA treatment overlapped its thermogenic effect in relation to the saline and OP groups, and after continuous exposure to heat, the OP + MIRA treatment kept the interscapular temperature higher than the other treatments, even under normal conditions. reduction of metabolic rate. The protocol performed with a β -blocker revealed that only the MIRA and OP + MIRA groups are influenced by the sympathetic pathway in the increase of the interscapular temperature, but without promoting an increase in mean arterial pressure, verified through the indirect measure mean arterial pressure protocol. The association between OP + MIRA in the ICV treatment promoted a reduction in feed intake and the frequency of distribution regarding the adipocyte area of this group was lower than the other treatments. It can be concluded that combined therapy using OP and MIRA is effective in modulating energy balance, with effects on body weight, feed intake and interscapular thermogenesis and may be a future strategy for obesity treatment and prevention studies.

Keywords: Energy balance, fish oil, mirabegron.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: INTEGRAÇÃO DE SINAIS METABÓLICOS ENTRE HIPOTÁLAMO E PERIFERIA | 16 |
| FIGURA 2: CLASSIFICAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE ADIPÓCITOS E TRANSDIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS BEGE | 19 |
| FIGURA 3: INTERAÇÃO DE AGONISTA COM RECEPTOR B3-ADRENÉRGICO..... | 23 |
| FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DA MIRABEGRONA..... | 24 |
| FIGURA 5: AÇÃO GENÔMICA DO PPARs | 27 |
| FIGURA 6: FUNÇÕES DOS PPARs NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE VÁRIOS ÓRGÃOS. | 28 |
| FIGURA 7: DESENHO EXPERIMENTAL TRATAMENTO DOSE-RESPOSTA POR GAVAGEM E VIA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV): AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS, GANHO DE PESO CORPORAL E CONSUMO ACUMULADO DE RAÇÃO, APÓS 24 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES..... | 33 |
| FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL TRATAMENTO CRÔNICO POR GAVAGEM E VIA INTRACEREBROVENTRICULAR COM DURAÇÃO DE 8 DIAS: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS, GANHO DE PESO CORPORAL, CONSUMO DE RAÇÃO ACUMULADO E TEMPERATURA INTERESCAPULAR. .. | 34 |
| FIGURA 9: QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE ADIPÓCITOS (ILUSTRATIVO) ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ | 39 |
| FIGURA 10: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL, POR GAVAGEM, DE DIFERENTES DOSES DE ÓLEO DE PEIXE SOBRE O PESO E O CONSUMO EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTOS DURANTE 24 HS. | 46 |
| FIGURA 11: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL, POR GAVAGEM, DE DIFERENTES DOSES DE MIRABEGRONA SOBRE O PESO E CONSUMO EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTOS DURANTE 24 HS..... | 47 |
| FIGURA 12: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL, POR GAVAGEM, DE ÓLEO DE PEIXE E/OU MIRABEGRONA SOBRE PESO E CONSUMO ACUMULADOS EM RATOS TRATADOS POR 8 DIAS. . | 48 |
| FIGURA 13: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL, POR GAVAGEM, CONSECUTIVA DE ÓLEO DE PEIXE E/OU MIRABEGRONA SOBRE A TEMPERATURA INTERESCAPULAR EM RATOS TRATADOS POR 8 DIAS. | 49 |
| FIGURA 14: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DOS ESTOQUES DO FÍGADO DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO POR GAVAGEM. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA..... | 51 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 15: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DOS ESTOQUES DO TECIDO ADIPOSEO MARROM DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO POR GAVAGEM. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA..... | 53 |
| FIGURA 16: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DOS ESTOQUES DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO POR GAVAGEM. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA. | 54 |
| FIGURA 17: EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL..... | 56 |
| FIGURA 18: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL, VIA INTRACEREBROVENTRICULAR, DE DIFERENTES DOSES DE ÓLEO DE PEIXE SOBRE O PESO E CONSUMO ACUMULADOS EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTOS DURANTE 24 HS..... | 57 |
| FIGURA 19: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL, VIA INTRACEREBROVENTRICULAR, CONSECUTIVA DE ÓLEO DE PEIXE E/OU MIRABEGRONA REDUZ O GANHO DE PESO CORPORAL EM RATOS TRATADOS POR 8 DIAS. | 59 |
| FIGURA 20: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL, VIA INTRACEREBROVENTRICULAR, CONSECUTIVA DE ÓLEO DE PEIXE E/OU MIRABEGRONA SOBRE A TEMPERATURA INTERESCAPULAR EM RATOS TRATADOS POR 8 DIAS..... | 59 |
| FIGURA 21: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA. | 61 |
| FIGURA 22: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO TECIDO ADIPOSEO MARROM DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA. | 62 |
| FIGURA 23: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DOS ESTOQUES DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL DOS ANIMAIS APÓS 8 DIAS DE TRATAMENTO VIA INTRACEREBROVENTRICULAR. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA..... | 64 |
| FIGURA 24: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ÓLEO DE PEIXE E/OU MIRABEGRONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA EM ANIMAIS. | 66 |
| FIGURA 25: EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO SOBRE A TERMORREGULAÇÃO PRODUZIDAS POR ANIMAIS EXPOSTOS POR UM TEMPO DE 6 HORAS AO FRIO INTENSO. | 68 |
| FIGURA 26: EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CALOR SOBRE PESO, CONSUMO E TERMORREGULAÇÃO PRODUZIDAS POR ANIMAIS EXPOSTOS POR UM PERÍODO DE 8 DIAS AO CALOR EXCESSIVO. | 69 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 27: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MIRABEGRONA E/OU DO ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO PROPRANOLOL SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL ACUMULADO EM ANIMAIS TRATADOS POR UM PERÍODO DE 8 DIAS..... | 71 |
| FIGURA 28: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MIRABEGRONA E/OU DO ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO PROPRANOLOL SOBRE O GANHO DE CONSUMO ACUMULADO EM ANIMAIS TRATADOS POR UM PERÍODO DE 8 DIAS. | 72 |
| FIGURA 29: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PROPRANOLOL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA TEMPERATURA INTERESCAPULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO COM OP E / OU MIRA. | 73 |
| FIGURA 30: PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, POR MEDIDA INDIRETA, DOS QUATRO GRUPOS TRATADOS E OS RESPECTIVOS VALORES APÓS TRATAMENTO COM O B-BLOQUEADOR (PROPRANOLOL). | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE UTILIZADO NO PRESENTE TRABALHO | 35 |
| TABELA 2: DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE PCR-RT | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC adenilato ciclase

ADRB3 Receptor β 3-adrenérgico

AGPI Ácidos graxos poli-insaturados

AgRP Peptídeo relacionado ao gene agouti

AGs Ácidos graxos

ANOVA Análise de variância

ARC Núcleo arqueado

ARC núcleo arqueado

ATP Adenosina trifosfato

CART Fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente

cDNA DNA complementar

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

ChREBP Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos

CIDEA Ativador da morte celular CIDE-A

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Cpt1b carnitina palmitoiltransferase 1 B

DHA ácido docosahexaenóico

EPA ácido eicosapentaenóico

Fgf21 Fator de crescimento de fibroblastos 21

GE gasto de energia

GPR120 Receptor acoplado à proteína G 120

H&E Hematoxilina e eosina

HSL lipase hormônio sensível

ICV Intracerebroventricular

IL-1 Interleucina-1

IL-6 Interleucina-6

LPL Lipase lipoproteica

MCP-1 proteína de quimioatração de monócitos

MIRA Mirabegrona

mRNA RNA mensageiro

NA noradrenalina

NaCl 9% Solução salina

NPY Neuropeptídeo Y

OP Óleo de peixe

PAI-1 Inibidor do ativador de plasminogênio -1

PET-CT tomografia combinada de emissão de pósitrons e tomografia computadorizada

PGC1 α Coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa

PKA Proteína quinase A

POMC Pró-opiomelanocortina

PPAR Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PPREs Elementos específicos de resposta ao PPAR

PRDM 16 Proteína contendo domínio PR 16

PVN Núcleo paraventricular

qPCR-RT Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

RBP-4 proteína ligante de retinol 4

RXR Receptor X retinóide

Slc27a1 Proteína 1 de transporte de ácidos graxos de cadeia longa

SNA sistema nervoso autônomo

SNC Sistema nervoso central

SNP Sistema nervoso parassimpático

SNS sistema nervoso simpático

SREBP1c Elemento regulador de esterol 1

TAB Tecido adiposo branco

TABepi Tecido adiposo branco epididimal

TAM Tecido adiposo marrom

Tbx1 Fator de transcrição T-box 1

TGs Triglicerídeos

Tmem26 Proteína transmembrana 26

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

TRPV1 Receptor vanilóide de potencial transitório 1

UA Unidade arbitrária

UCP1 Proteína desacopladora 1

VMH Núcleo ventromedial

α -AR Receptor α -adrenérgico

α -MSH Hormônio α estimulante de melanócitos

β -AR Receptor β -adrenérgico

°C Graus celsius

18F-FDG 18F-fluorodesoxiglucose

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 2.1 | Balço energético | 15 |
| 2.2 | Receptores β -3 adrenérgicos | 21 |
| 2.3 | Mirabegrona | 23 |
| 2.4 | Óleo de peixe | 25 |
| 3 | OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 | Geral | 31 |
| 3.2 | Específicos | 31 |
| 4 | METODOLOGIA | 32 |
| 4.1 | Animais | 32 |
| 4.2 | Desenho Experimental | 32 |
| 4.3 | Mirabegrona e óleo de peixe (Estudo dose-resposta) | 34 |
| 4.4 | Avaliação da ingestão de alimentos e do peso corporal | 35 |
| 4.5 | Avaliação da temperatura no TAM | 36 |
| 4.6 | Tratamento intracerebroventricular (ICV) | 36 |
| 4.7 | Coleta de amostras | 37 |
| 4.8 | Análise histológica | 37 |
| 4.8.1 | Obtenção e processamento dos tecidos | 37 |
| 4.8.2 | Desparafinização e hidratação | 37 |
| 4.8.3 | Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) | 37 |
| 4.8.4 | Análise das imagens | 38 |
| 4.8.5 | Análise da área dos adipócitos | 38 |
| 4.9 | Avaliação da expressão de genes | 39 |
| 4.9.1 | Extração de RNA total | 39 |
| 4.9.2 | Reação de transcrição reversa | 40 |
| 4.9.3 | Seleção dos primers | 40 |
| 4.9.4 | Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT) | 41 |
| 4.10 | Atividade locomotora obtida em teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado | 42 |
| 4.11 | Termorregulação | 42 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.11.1 | Estudo de adaptação ao frio..... | 43 |
| 4.11.2 | Estudo de adaptação ao calor..... | 43 |
| 4.12 | Tratamento com propranolol | 43 |
| 4.13 | Medida de pressão arterial média | 44 |
| 4.13.1 | Procedimento cirúrgico para canulação da artéria e veia femorais | 44 |
| 4.14 | Análise estatística | 44 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais..... | 46 |
| 5.2 | Avaliação da temperatura interescapular dos animais para o tratamento periférico..... | 48 |
| 5.3 | Parâmetros morfológicos e histológicos: Tratamento periférico..... | 51 |
| 5.4 | Análise de expressão gênica no Tecido adiposo branco epididimal..... | 55 |
| 5.5 | Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais tratados via intracerebroventricular (ICV)..... | 57 |
| 5.6 | Avaliação da temperatura interescapular dos animais tratados via intracerebroventricular | 59 |
| 5.7 | Parâmetros morfológicos e histológicos: Tratamento intracerebroventricular (ICV)..... | 61 |
| 5.8 | Avaliação da atividade locomotora: Teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado..... | 65 |
| 5.9 | Influência da temperatura ambiente sobre as respostas metabólicas | 66 |
| 5.10 | Avaliação da administração da Mirabegrona e/ou Óleo de peixe em associação com o propranolol sobre o ganho de peso corporal e consumo de ração 70 | |
| 5.11 | Avaliação da pressão arterial média..... | 75 |
| 6 | DISCUSSÃO | 76 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 83 |
| | REFERÊNCIAS..... | 84 |

1 INTRODUÇÃO

A manutenção do peso corporal saudável é possível através de uma fina regulação do balanço de energia, que coordena a ingestão e o gasto energética (DENIS et al., 2014). O excesso crônico de nutrientes, onde a ingestão de energia excede significativamente o gasto energético, resulta num estado de aumento da adiposidade que é um fator predisponente para o desenvolvimento de doenças como diabetes, hipertensão, hiperlipidemia, câncer e outras desordens (ZHANG et al., 2014).

O eixo hipotálamo-tecido adiposo integra informações importantes sobre o estado energético (XIE et al., 2017). Além desses, existem vários sistemas hormonais, neurotransmissores e receptores envolvidos na regulação do balanço energético. As tentativas farmacológicas para modular favoravelmente esses sistemas e encorajar a perda de peso têm sido de alguma forma eficazes, embora haja efeitos secundários adversos, isso leva à busca de alvos terapêuticos mais adequados (BERBÉE et al., 2015).

Atualmente, uma estratégia potencialmente eficaz para prevenir ou tratar desordens metabólicas associadas ao sobrepeso é aumentar o gasto de energia através da ativação da proteína desacopladora 1 (UCP1), resultado as transdiferenciação dos adipócitos brancos em adipócitos bege ("browning") com características de adipócitos marrom (BRAY; BELLANGER, 2006). Os adipócitos marrons são caracterizados pela expressão abundante de UCP1 e contêm gotículas lipídicas multiloculares sendo abundante na matriz interna das mitocôndrias. A UCP1 diminui o gradiente de prótons entre as membranas mitocondriais e dissipa energia como calor ao desacoplar a respiração da síntese de ATP (CEDIKOVA et al., 2016).

A via β 3-adrenérgica possui papel importante na ativação da proteína UCP1 e conseqüentemente na homeostase energética, seu receptor é altamente expresso no tecido adiposo marrom e também pode ser encontrado em tecido adiposo branco (SONG et al., 2017). Em ratos, a inibição do receptor β 3 adrenérgico causa obesidade, enquanto que os agonistas do receptor provocam efeitos anti-obesidade, como a supressão da ingestão de alimentos e a termogênese mediada pela proteína desacopladora 1. Com base nesses achados, vários ensaios clínicos avaliaram a viabilidade de desenvolver um tratamento potencialmente efetivo para a obesidade usando agonistas β 3-adrenérgicos (NASCIMENTO-FERREIRA et al., 2016).

No entanto, como outras monoterapias farmacológicas concebidas para este fim, essas estratégias apresentaram pouca eficácia clínica tendo em vista os potenciais e sérios efeitos colaterais de ativar o sistema simpático. Os esforços científicos estão agora focados no desenvolvimento da associação entre terapias que exercem seus efeitos em diferentes processos biológicos, como na ingestão de nutrientes e no gasto energético (SONG et al., 2017). Uma estratégia em potencial seria estudar os efeitos dos agonistas β 3-adrenérgicos em terapia combinatória com nutrientes, em especial com o óleo de peixe (OP), através de sua ligação ao receptor ativado por proliferador de peroxisoma (PPARs) seus subtipos tem papel fundamental em processos chaves da homeostase energética como na β -oxidação de ácidos graxos (PPAR α/β) e na adipogênese (PPAR γ) (MATSUMOTO; KIUCHI; MURASE, 2019).

No presente estudo, foi investigado a potencialização da redução do consumo alimentar e do ganho de peso corporal além do aumento da temperatura interescapular quando os receptores β 3-adrenérgicos e PPARs são coativados pelo agonista pleno adrenérgico mirabegrona (MIRA) e pelo óleo de peixe (OP), respectivamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Balanço energético

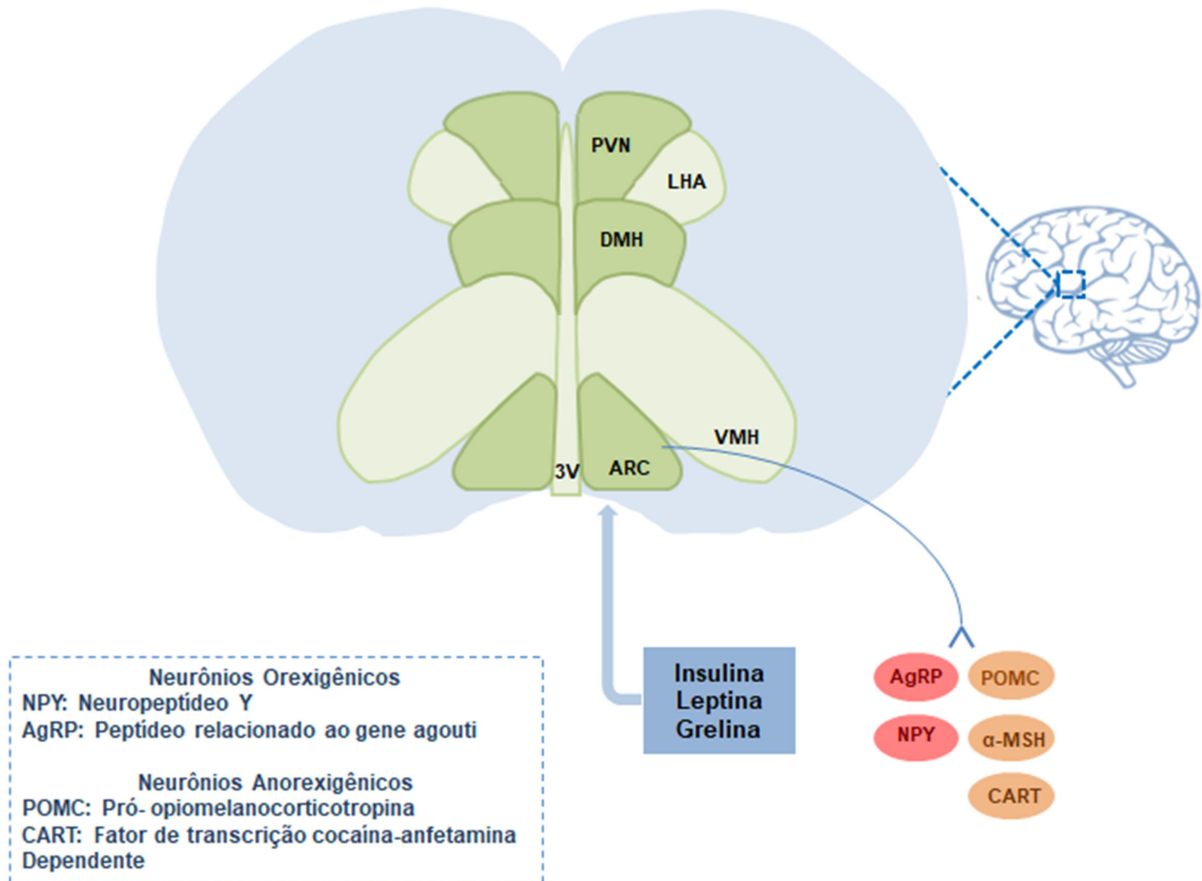
O balanço energético é resultado do equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto de energia, o desequilíbrio entre os mesmos é a condição mínima para desencadear o balanço energético positivo ou negativo, quando positivo é a condição básica para o aparecimento da obesidade, que se configura uma importante alteração nutricional (LÓPEZ et al., 2010). A atual abundância de alimentos com alto valor energético, combinada com uma mudança nos estilos de vida para sedentários, leva a um crescente desequilíbrio termodinâmico e como consequência principal ao desenvolvimento de desordens metabólicas associadas a diversas patologias (WU; CLARK; PALMITER, 2012).

O controle da homeostase energética é orquestrado pelo sistema nervoso central mais especificamente pelo sistema nervoso autônomo (SNA) que é um importante e poderoso regulador. O SNA garante a homeostase das funções do corpo. O apetite é regulado por um sistema complexo de sinais centrais e periféricos que interagem para modular a resposta individual à ingestão de nutrientes (BRUINSTROOP; FLIERS; KALSBECK, 2014). A regulação periférica inclui sinais de saciedade e sinais de adiposidade, enquanto o controle central é realizado por vários efetores, incluindo os sistemas neuropeptidérgico, monoaminérgico e endocanabinóide (YABAKI et al., 2010). Essas aferências são integradas para emitir uma resposta através da regulação da ingestão de alimentos, gasto de energia (GE) e destino dos nutrientes (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2007).

No controle do peso corporal, o tecido adiposo interage diretamente com o hipotálamo, este possui vários centros neuronais, entre eles o núcleo hipotalâmico lateral, que é importante na homeostase da fome e os núcleos ventromediais importante na homeostase da saciedade (KONTUREK et al., 2005). O núcleo arqueado é responsável por reconhecer uma diminuição nas concentrações de leptina e insulina. Isso causa a supressão de sinais anorexígenos (hormônios estimulantes de melanócitos: α -MSH) e a estimulação de sinais orexígenos (Peptídeo relacionado ao gene agouti: ARGP ou neuropeptídeo Y: NPY), resultando num aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto de energia, visando assim, restaurar a massa de células adiposas (**Figura 1**). De forma inversa, a

ingestão de alimentos gera sinais de saciedade neural e hormonal para o hipotálamo (TORRES, CHABARDÈS e BENABID, 2011).

Figura 1: Integração de sinais metabólicos entre hipotálamo e periferia



Fonte: Adaptado de Denis et al., 2013

A pesar do complexo processo de regulação da homeostase energética envolver várias áreas do cérebro, as rotas de efetores centrais e periféricos mostram-se mais sensíveis na região do hipotálamo, demonstrando serem estreitas suas interações com os circuitos de fome, saciedade e tamanho da massa adiposa, o que regula o tamanho da refeição, modulando o consumo e balanço de energia (HALPER et al., 2011). Além disso, o balanço energético periférico é controlado pelo hipotálamo através do SNA, quando os neurônios do núcleo arqueado (ARC) detectam fatores circulantes, como insulina, grelina, leptina e sinais nutricionais, como glicose, aminoácidos ou lipídios, refletindo nas necessidades de energia do organismo. Isso é possível, pois, o ARC está localizado na base do terceiro

ventrículo onde a membrana hematoencefálica é especialmente modificada e permite a passagem desses fatores circulantes (CONTRERAR et al., 2017).

Além desses efeitos, a ativação simpática é o gatilho fisiológico da termogênese nos adipócitos marrom. As terminações nervosas do sistema nervoso simpático (SNS) atingem tais adipócitos e libera noradrenalina, que estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (TAM) por meio da ligação aos receptores adrenérgicos, principalmente o receptor β 3-adrenérgico (FENZL; KIEFER, 2014). Primariamente, o TAM atua na produção de calor, é encontrado em abundância relativa em pequenos mamíferos eutérios, distribuído em pequenos depósitos discretos. Em ratos e camundongos, os depósitos de TAM são encontrados nas regiões interescapular, subescapular, axilar, perirrenal e periaórtica, isso possibilita que vivam em ambientes frios sem depender do processo de tremor para produzir calor, já em humanos adultos foi constatada a presença de depósitos importantes de TAM no pescoço e no ombro. (BARTNESS et al., 2014).

Apesar de ter sido considerado praticamente inexistente e irrelevante na fisiologia adulta, há indícios de sua presença e atuação no gasto energético em humanos adultos, a estimulação máxima de cerca de 50 g de TAM, poderia responder por até 20% do gasto energético diário em um humano adulto. Apesar de sua importância fisiológica potencial, métodos para medir a massa e a atividade do tecido adiposo marrom em humanos é deficiente. Recentemente, tomografia combinada de emissão de pósitrons e tomografia computadorizada (PET-CT) tem sido usada para identificar o tecido adiposo com uma alta taxa de captação de 18F-fluorodesoxiglicose (18F-FDG) indicando presença de tecido adiposo marrom, Cypess e colaboradores, (2009), analisaram imagens de 18F-FDG PET-CT em 1972 pacientes e apresentaram evidência para a presença de tecido adiposo marrom fisiologicamente significativo em humanos adultos, apresentando depósitos substanciais desse tecido em uma região que se estende desde o pescoço anterior até o tórax, além do mais, os adipócitos dessa região apresentaram presença de UCP1 e demonstraram ser multiloculares (CYPESS et al., 2010).

Embora relativamente escassa em comparação com a inervação do SNS no TAM estudos imuno-histoquímicos e de microscopia eletrônica revelaram terminações nervosas simpáticas no parênquima de tecido adiposo branco (TAB) (BARTNESS et al., 2014) essa estimulação simpática, no entanto, apresenta-se distinta nos diferentes coxins do TAB, apesar de que existam condições em que

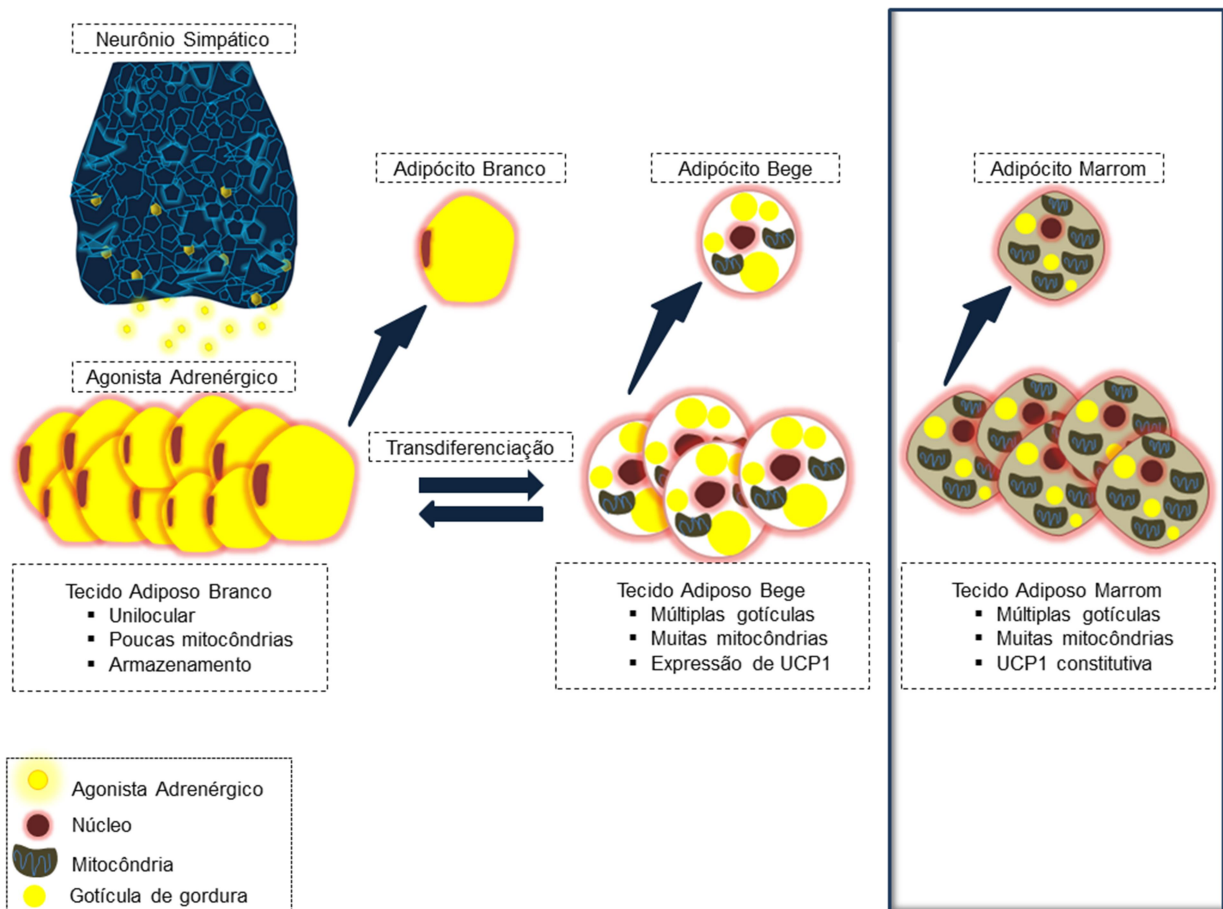
múltiplos tecidos são, similarmente, simpaticamente estimulados (ex.: exposição ao frio), nesta condição o impulso para o TAM é aumentado para culminar no aumento da termogênese e o aumento do estímulo simpático ao TAB poderia fornecer combustível para a produção de calor pelo TAM e outros tecidos (BARTNESS ; SONG, 2007).

O TAB é o principal órgão de armazenamento, acumulando o excesso de energia na forma de triglicerídeos. Além de atuar como um importante órgão endócrino liberando mediadores como as adipocinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas, como peso corporal (leptina), metabolismo vascular (PAI-1), metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina (adiponectina) e algumas citocinas inflamatórias e quimiocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, RBP-4 ou MCP-1) entre outros (FERNÁNDEZ et al., 2015). Desta maneira o TAB é integrado em uma conversa cruzada global com diferentes órgãos e tecidos envolvidos na homeostase energética, incluindo o sistema nervoso central (SNC), fígado, músculo esquelético e pâncreas (TRAYHURN, 2005).

Mesmo não totalmente estabelecido, mecanismos moleculares atuam de diferentes formas nas células adiposas desses dois tipos de tecidos. Ademais adipócitos semelhantes à gordura marrom, com uma morfologia multilocular e expressando a proteína termogenina (proteína desacopladora: UCP), são encontrados intercalados no TAB de roedores e humanos (**Figura 2**). Estes têm sido chamados de células de gordura marrons adaptáveis ou células beges (ISHIBASHI; SEALE, 2010). O desenvolvimento dessas células parecidas com a gordura marrom no TAB é dramaticamente aumentado durante a adaptação ao frio ou em resposta ao tratamento com agonistas adrenérgicos β 3-seletivos. A transformação parda do TAB é mais proeminente no depósito subcutâneo inguinal, enquanto o tecido adiposo perigonadal é menos suscetível ao escurecimento (SEALE et al., 2011).

Devido ao desafio de entender os mecanismos moleculares pelos quais os estímulos ambientais estimulam a transformação dessas células alguns fatores têm sido implicados na ativação do desenvolvimento de adipócitos parecidos com o marrom no TAB, como a regulação transcricional do gene UCP1, que codifica a termogenina, a proteína desacopladora mitocondrial cuja ação é controlada por elementos reguladores que mostraram-se críticos para a adipogênese das gorduras branca e marrom (PETROVIC et al., 2010).

Figura 2: Classificação de diferentes tipos de adipócitos e transdiferenciação de adipócitos bege



Fonte: Adaptado de Favero et al., 2018

No TAB, os prótons bombeados durante a transferência de elétrons reentram na matriz por meio da ATP-sintase, e a energia dessa transferência é conservada na síntese de ATP. No TAM, a termogenina proporciona uma via alternativa para a entrada dos prótons na matriz, que ignora a ATP-sintase; a energia do gradiente de prótons é assim dissipada na forma de calor, que mantém o corpo (principalmente o sistema nervoso e as vísceras) na sua temperatura ótima quando a temperatura ambiente estiver relativamente baixa (RICQUIER, 2016).

Fatores nutricionais como ácidos graxos poliinsaturados são capazes de promover alterações nesses tecidos mediante ativação de receptores como o TRPV1 (receptor vanilóide de potencial transitório 1) que está envolvido na homeostase energética e na modulação de hormônios do apetite (CAO et al., 2013). Também são ligantes de membros das famílias de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) que estão envolvidas no “escurecimento” das células adiposas brancas (OHNO et al., 2013).

Com relação ao PPARs, o tratamento de camundongos com agonistas sintéticos do PPAR α promove o escurecimento do tecido adiposo, demonstrado pelo aparecimento de adipócitos multiloculares e aumento da expressão de UCP1, o que desencadeia a capacidade termogênica no TAB (GUAN et al., 2005). Além disso, a ativação de PPAR α em pré-adipócitos e adipócitos humanos aumentou a expressão de UCP1 e outros genes relacionados com escurecimento (BARQUISSAU et al., 2016). Estudos mostram que a ativação da função transcricional do PPAR- γ é estimulado pela proteína contendo domínio PR 16 (proteína Prdm16), este controla o desenvolvimento de adipócitos marrons em depósitos clássicos da TAM além de ser fundamental para o recrutamento dos adipócitos beges. Prdm16 é expresso no TAB subcutâneo, TAB epididimal e no TAB retroperitoneal, o Prdm16 estimula a adipogênese marrom por ligação ao PPAR- α ativando sua função transcricional (SEALE et al., 2008).

Embora a regulação do equilíbrio energético pareça uma balança de complexos mecanismos hormonais e neurais que se autorregulam para compensar o déficit energético e o aumento da adiposidade essas condições não são facilmente revertidas. Em resumo, o hipotálamo é o sítio primário do SNC para o controle do balanço energético, neurônios localizados nessas regiões produzem mensageiros químicos que são liberados em seus terminais para estimular ou inibir o comportamento alimentar.

A sequência de eventos a partir da ingestão de nutrientes e posteriores sinais periféricos chegam diretamente ao sistema nervoso central, levando a respostas adaptativas apropriadas. Em resumo (1) a ingestão alimentar e o gasto energético são regulados principalmente por núcleos hipotalâmicos; (2) o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo contém pelo menos duas populações neuronais principais atuando sobre a homeostase energética, os neurônios orexigênicos e anorexigênicos; (3) a maioria dos receptores para esses sinais estão concentrados nos núcleos paraventricular (PVN) e ventromediais (VMH); (4) os neurônios que expressam esses neuropeptídeos interagem entre si e com sinais periféricos (ex.: leptina, insulina entre outros), atuando na regulação do controle alimentar e do gasto energético; (5) a ativação do SNS, promove aumento da liberação de noradrenalina (NA) o que aumenta a termogênese e ativa o processo de lipólise, iniciando assim a produção de calor mitocondrial e aumentando sinergicamente o gasto energético; (6)

em contraste, o TAB acumula energia em excesso, como triglicerídeos (TG), o que gera aumento do peso corporal e liberação de adipocinas.

2.2 Receptores β -3 adrenérgicos

O sistema nervoso autônomo (SNA), também conhecido como neurovegetativo ou sistema nervoso visceral, é a parte do sistema nervoso que está relacionada ao controle das funções vegetativas frente às modificações do ambiente, como respiração, circulação, controle de temperatura, digestão e excreção. O SNA se subdivide em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) (MUND; FRISHMAN, 2013). O SNS desempenha importante papel no sistema cardiovascular e no metabolismo através da liberação de adrenalina. Essas catecolaminas ativam os receptores adrenérgicos localizados na membrana celular, regulando assim os diversos órgãos e sistemas. Os receptores adrenérgicos são classificados em α (α -AR) e β (β -AR) e estes podem ser subdivididos predominantemente em α 1 e α 2 e β 1, β 2 e β 3 (Davis et al., 2008).

Estes receptores são proteínas transmembranas com duas porções, uma amino terminal (extracelular) e a outra carboxi terminal (intracelular). Sua porção hidrofóbica atravessa sete vezes a membrana celular. Os diferentes subtipos de receptores adrenérgicos apresentam aminoácidos homólogos e diferenças em seus segmentos que lhes conferem a especificidade para seus agonistas (FITZGERALD, 2007). Tardamente aos demais receptores o subtipo β 3 (β 3-AR) foi caracterizado ao final da década de 80, e sua clonagem permitiu elucidar alguns efeitos das catecolaminas não relacionados à ativação dos receptores β 1 e β 2. Os receptores β 3-AR estão amplamente distribuídos em diferentes células, encontrando-se principalmente no tecido adiposo branco. São receptores acoplados à proteína Gs (estimulatória), e sua ativação promove cronotropismo positivo, relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, lipólise no tecido adiposo branco e termogênese no tecido adiposo marrom (SILVA, 2018).

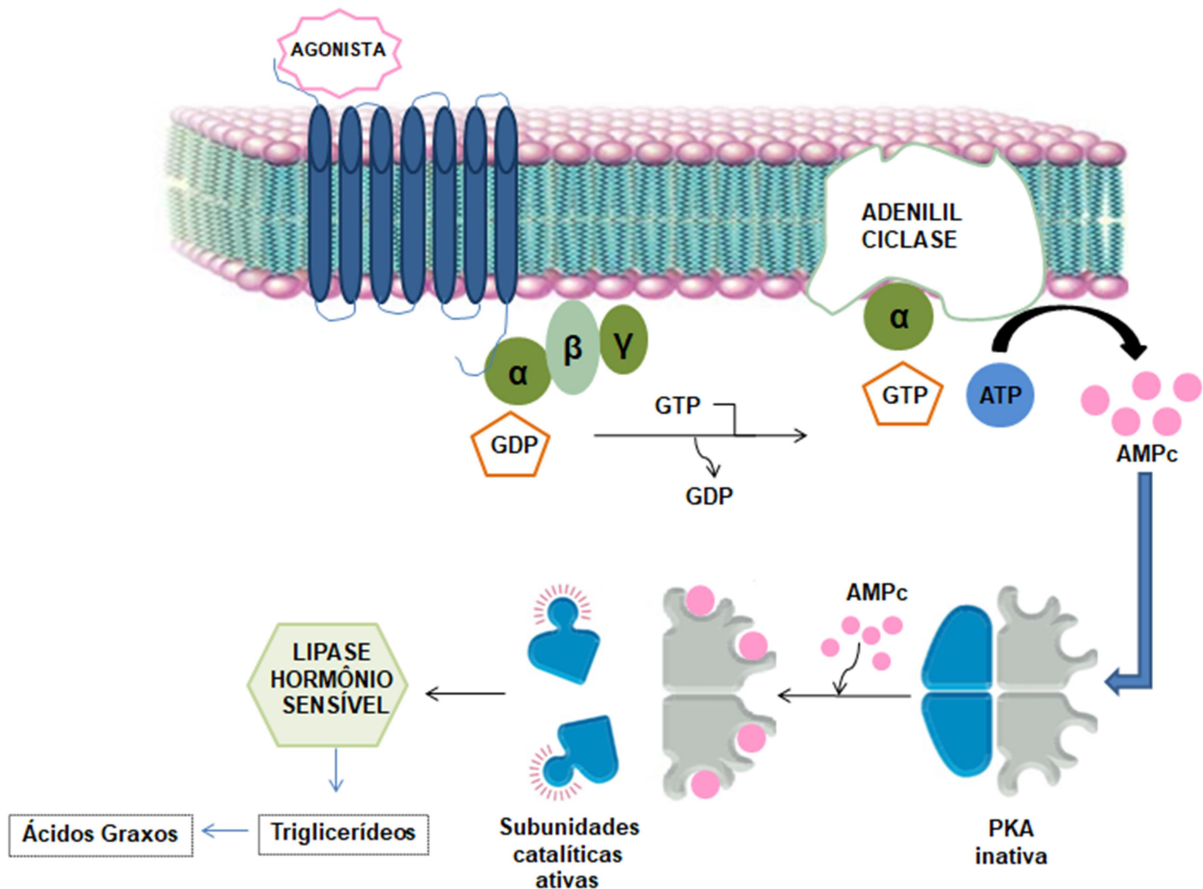
Sua ativação está envolvida na estimulação do gasto energético e na lipólise, isso ocorre pela maior expressão da UCP1, uma molécula mitocondrial envolvida na termogênese induzida pelo frio, assim como induzida por dieta e pelo desacoplamento da cadeia respiratória em adipócitos no TAM e no TAB (SUAREZ et al., 2014). Embora ainda não totalmente esclarecido, aparentemente está envolvido

na sinalização da insulina e no aumento da captação de glicose pelas células. Camundongos sem os receptores β 3-adrenérgicos podem desenvolver obesidade, enquanto que agonistas destes receptores provocam efeitos sobre a homeostase energética, a supressão da ingestão de alimentos, a perda de gordura corporal, a oxidação lipídica, o consumo de oxigênio e a biogênese mitocondrial, bem como melhorar a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (CHERNOGUBOVA; CANNON; BENGTSSON, 2004).

Em seres humanos as catecolaminas noradrenalina e adrenalina são os principais mediadores da lipólise, sendo este efeito mediado pelos adrenoreceptores α e β , ambos ligados à proteína G. No tecido adiposo, a ativação dos β 3-AR/Gs, ativa a enzima adenilato ciclase (AC) a qual converte a adenosina trifosfato (ATP) em AMPc., levando ao acúmulo deste segundo mensageiro, e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, irá fosforilar a lipase hormônio sensível (HSL), o que desencadeia a hidrólise de TG em ácidos graxos livres e glicerol (**figura 3**). (SILVA, 2018) A PKA também levará ao aumento da captação de glicose por esse tecido, fornecendo substratos para o metabolismo mitocondrial e produção de calor pelas UCPs. Além disso, a ativação da PKA levará à sinalização nuclear para aumento da expressão proteica de UCP1 (ZHENG et al., 2014).

Estudos com agonistas de receptores β 3-AR evidenciaram o aumento da termogênese pelo TAM em modelos animais, o que poderia ser uma ferramenta farmacológica para o direcionamento do gasto energético (MUND, FRISHMAN, 2013). Além disso, a administração de agonistas de receptores β 3-adrenérgicos parece contribuir para a diferenciação de células bege de algumas regiões de TAB subcutâneo de roedores, em humanos essa relação permanece não esclarecida por falta de estudos clínicos que comprovem sua eficácia na regulação do metabolismo (ZHENG et al., 2014).

Figura 3: Interação de agonista com receptor β 3-adrenérgico

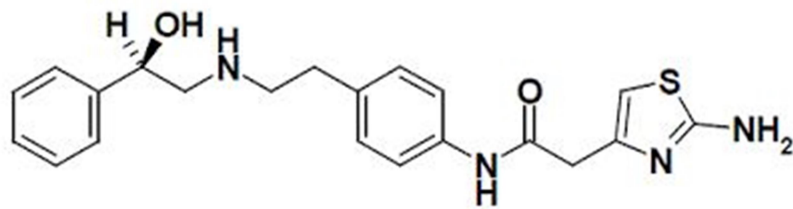


Fonte: Adaptado de Luo and Liu, 2016

2.3 Mirabegrona

A MIRA quimicamente conhecida como 2- (2-amino-1, 3-tiazol-4-il) -N- [4- (2 - {{(2R) -2-hidroxi-2-feniletil] amino} etilo) fenil acetamida (**figura 4**) é um agonista β 3-adrenérgico seletivo, atualmente desenvolvido por Astellas Pharma Inc. e aprovado desde 2012 pelos EUA para tratamento de bexiga hiperativa, considerando a ação dos β 3-adrenérgicos no relaxamento do músculo liso e importância desse subtipo de receptor no controle da função vesical (TYAGI, 2010). Em relação aos efeitos da MIRA sobre o metabolismo energético a literatura ainda é escassa, sendo que poucos estudos avaliam as implicações desse fármaco sobre o peso corporal e os resultados são controversos (YUNO et al. 2014; CALMASINI et al. 2017). Pouco se sabe sobre os efeitos desse composto na composição corporal e os possíveis efeitos cardiometabólicos. Após a administração oral do fármaco, a MIRA é absorvida atingindo o pico de concentração plasmática (C_{max}) entre 3 e 4 horas (IITSUKA et al., 2015).

Figura 4: Estrutura química da mirabegrona



Fonte: Adaptado de Chen and zhang, 2019.

A MIRA é extensamente distribuída no organismo e liga-se às proteínas plasmáticas (aproximadamente 71%), apresentando uma afinidade para a albumina e alfa 1-glicoproteína ácida e distribui-se nos eritrócitos. Foram identificados dois metabólitos principais no plasma humano (ambos glucurónideos e inativos farmacologicamente) (IITSUKA et al., 2015). A excreção urinária da MIRA é dependente da dose e varia desde aproximadamente 6% após uma dose diária de 25 mg até 12,2% após uma dose diária de 100 mg.

A MIRA pode ativar a termogênese de TAM, induzindo a captação de glicose e aumentando o gasto de energia além de aumentar o escurecimento de TAB e diminuir a gordura corporal. Além disso, a administração de MIRA reduz os pesos dos depósitos de gordura, com redução acentuada do tamanho do adipócito e aumento da expressão de UCP1 em TAM (SUI, 2019).

Cypess e colaboradores, (2015) após detectar a presença de TAM em humanos adultos, testaram a capacidade de estimulação da atividade termogênica de forma aguda desse tecido pela mirabegrona (200 mg), observou-se uma elevação na taxa metabólica de repouso nos indivíduos assim como houve evidência de estimulação da lipólise do TAB, Além disso, a dose de 200 mg foi bem tolerada mesmo após 12 semanas de administração oral diária mesmo sendo esta dose muito superior à dose diária recomendada (50 mg) para o tratamento da bexiga hiperativa (CYPESS et al., 2015). Outro estudo, porém, em animais demonstrou que a administração aguda de mirabegrona (0,1 µg/g de peso corporal) através de injeção intraperitoneal estimulou a captação de glicose no TAM (ROBERTS-TOLER et al., 2015).

Além disso, um estudo feito com animais obesos resultou em redução do peso corporal total e da massa da gordura epididimal independente de alteração na ingestão calórica de animais tratados por duas semanas com MIRA (10mg/kg) (SILVA, 2018).

Assim, são escassos os estudos que convergem sobre os efeitos do tratamento crônico com MIRA tanto em modelo de animais normais quanto obesos, porém, dados sugerem que os efeitos sobre o gasto energético podem ser decorrentes da ativação β -3 adrenérgica nos adipócitos ocasionando aumento da lipólise.

2.4 Óleo de peixe

Após estudos epidemiológicos estabelecerem relação sobre a baixa incidência de doenças cardiovasculares nos esquimós e japoneses, e o consumo de lipídeos provenientes de peixes marinhos (DYERBERG; BANG, 1979), a ingestão dietética de ácidos graxos, de diferentes fontes e composições diversas, tornou-se crescente alvo de estudos de pesquisadores de diferentes linhas de pesquisa (DYERBERG, 1981). Os ácidos graxos são constituintes dietéticos naturais e possuem extensas funções metabólicas, estruturais e funcionais no corpo, tendo relevantes funções como fonte energética, componente de membranas celulares e precursores de moléculas sinalizadoras. Os benefícios por traz dos lipídios na alimentação humana são subjacentes às quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente os da família ômega-3, presentes em sua composição (CALDER, 2011).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) com uma ligação dupla entre os carbonos ω -3 e ω -4 (ômega-3) ou entre ω -6 e ω -7 (ômega-6), a partir da extremidade da cadeia com grupo metila são de grande importância na dieta humana. Em animais, os AGPI (ômega 3 e 6) são biossintetizados a partir de um precursor, o ácido linoléico (18: 2 Δ ^{9,12}) e o ácido α -linolênico (18: 3 Δ ^{9,12,15}) (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000). Os ácidos linoléico e α -linolênico não podem ser biossintetizados pelos organismos animais e devem ser fornecidos pelos alimentos. A partir desses precursores também são produzidos outros AGPI de grande importância no funcionamento celular: ácido eicosapentaenóico (EPA ou 20: 5n-3) ácido docosahexaenóico (DHA ou 22: 6n-3) e ácido araquidônico (REES et al., 2006).

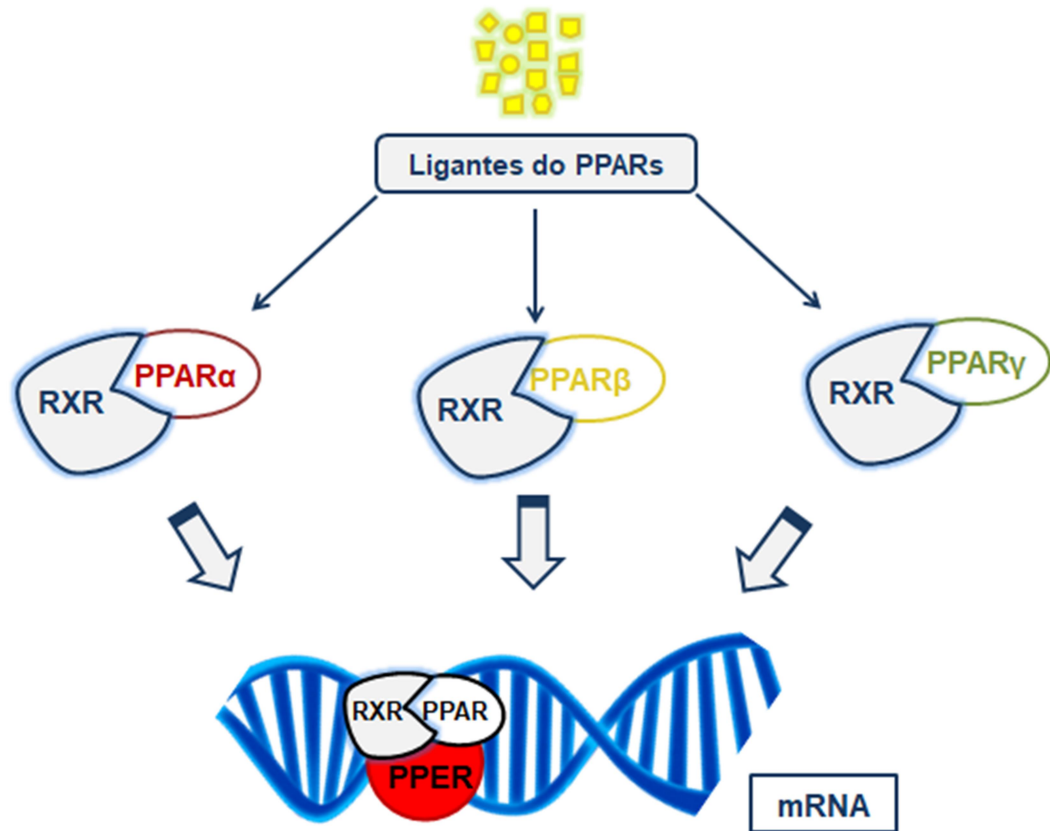
Os AGPI ω -3 DHA e EPA são encontrados em concentrações mais expressivas em lipídios de peixes e animais marinhos, especialmente aqueles procedentes de regiões frias. Eles estão bem documentados por diminuir o ganho de peso corporal e acúmulo de gordura concomitante com aumento do gasto energético, o que sugere que sua ingestão aumenta a termogênese (SAINI; KEUM, 2018). Além da complexidade de processos biológicos em que estão envolvidos os AG são moléculas biológicas

onipresentes que são usadas como combustíveis metabólicos, como reguladores covalentes de moléculas de sinalização e componentes essenciais de membranas celulares. Dessa forma a regulação é importante, tendo em vista que alguns dos distúrbios médicos mais comuns nas sociedades industrializadas são as doenças cardiovasculares, hiperlipidemia, obesidade e resistência à insulina, caracterizadas por níveis alterados de ácidos graxos ou metabólitos (LORENTE-CEBRIÀN et al., 2013).

Para controlar as concentrações de AG, os organismos possuem sensores responsivos às mudanças nos níveis disponíveis de metabólitos de AG, o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) parece ser o principal regulador da oxidação de AGs. Foi identificado como um receptor nuclear de vertebrado que regula os genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos. Esse receptor é altamente expresso no fígado e tecido adiposo sendo integrante da superfamília de receptores hormonais nucleares que atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes (ADEGHATE et al., 2011; HAN, 2017). Por atuarem como ligantes de uma ampla gama de ácidos graxos poli-insaturados, atuando como sensores de lipídeos importantes na manutenção da homeostase lipídica e na regulação do metabolismo da glicose, acabam tendo papel importante sobre o metabolismo energético (LI et al., 2010).

Por serem ativados por pequenas moléculas, os receptores nucleares são alvos em potencial, não apenas para fármacos, mas também para fatores alimentares funcionais. Sendo assim, entre os receptores nucleares, os PPARs é um dos alvos principais dos nutrientes que regulam os distúrbios metabólicos (CORRALES; VIDAL; MEDINA, 2018). Após interagirem com um ligante ocorre translocação do PPAR para o núcleo, onde eles heterodimerizam-se com outro receptor nuclear, o receptor X retinóide (RXR), este complexo liga-se a elementos específicos de resposta ao PPAR (PPREs) (**Figura 5**), encontrados nas proximidades de promotores de genes responsivos ao PPAR, e contribuem para transativar e/ou transcrever genes específicos envolvidos na inflamação, adipogênese, metabolismo lipídico e homeostase da glicose (MOUTINHO et al., 2018).

Figura 5: Ação genômica do PPARs



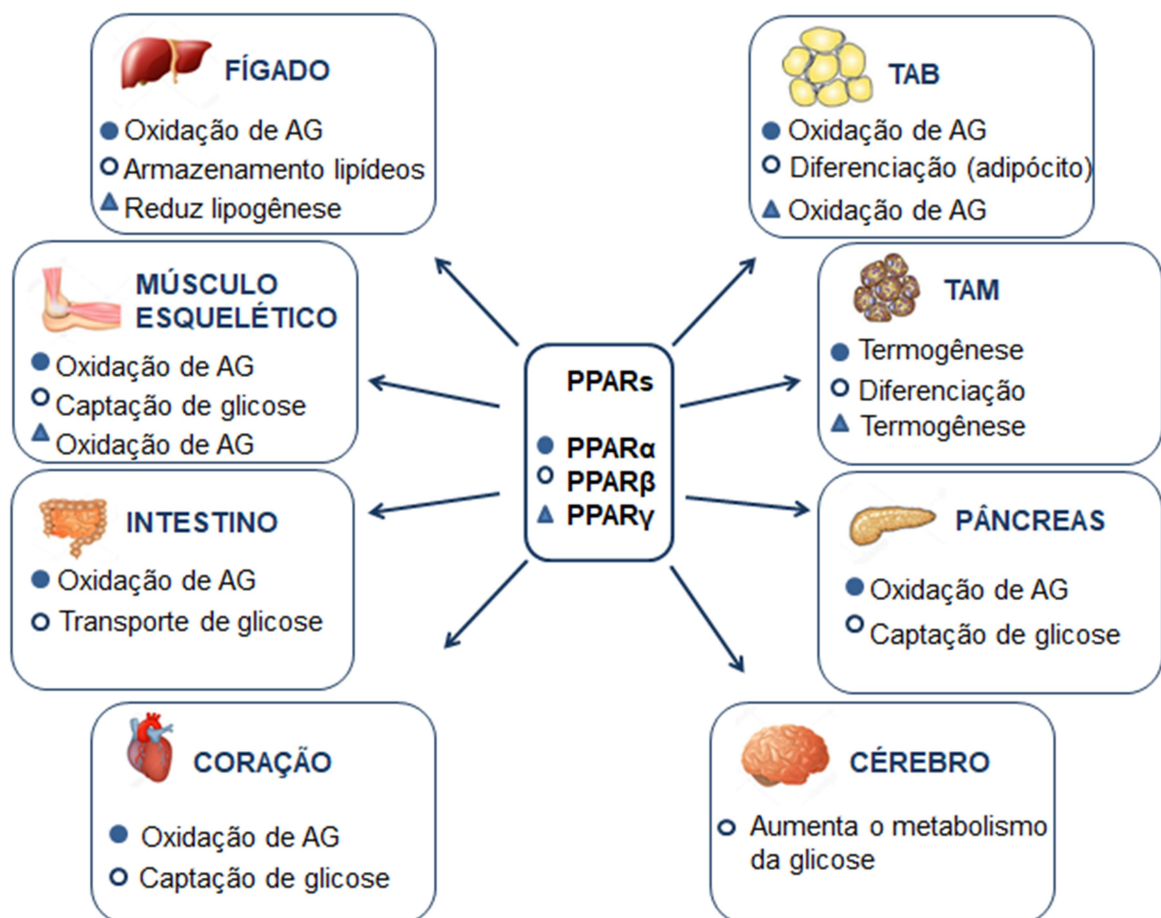
Fonte: Adaptado de Darbre, 2015.

Atualmente são descritos três isotipos principais de PPAR: PPAR α , PPAR β (também conhecido como PPAR δ) e PPAR γ (CORRALES; VIDAL; MEDINA, 2018). Estes são ativados por diferentes compostos, o que desencadeia respostas biológicas específicas inerentes a cada isotipo que estão distribuídos em tecidos distintos e possuem diferenças intrínsecas em suas propriedades bioquímicas, além disso, a expressão dos PPARs em vários tecidos ocorre de maneira e tempo distintos em resposta à alimentação, ao exercício físico e ao frio, por exemplo. As duas isoformas mais relacionadas com distúrbios metabólicos são PPAR α e PPAR γ (WAHLI, 2014).

O subtipo PPAR α é expresso principalmente no fígado e no músculo esquelético e sua ativação está envolvida na resposta de privação, aumentando a β -oxidação de ácidos graxos e inibindo a utilização de glicose. O PPAR β está presente no trato gastrointestinal, pele, TAM, fígado, rim, pulmão e em baixo nível no músculo esquelético, cérebro e outros tecidos, vários ácidos graxos e eicosanoides

funcionam como ligantes do PPAR β (HONG et al., 2019). O PPAR γ é expresso em diversos tecidos como fígado e músculo, mas seu papel principalmente ocorre no tecido adiposo onde é considerado o principal regulador da diferenciação desse tecido, promove lipogênese e armazenamento de lipídeos, além de regular a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em funções chave dos adipócitos, como metabolismo dos lipídeos, sensibilidade insulínica e produção de adipocinas (AUBOEUF et al., 1997; MICHALIK L, et al., 2006) (**Figura 6**).

Figura 6: Funções dos PPARs no metabolismo energético de vários órgãos.



Fonte: Adaptado de Hong et al., 2019

Legenda: AG: Ácido graxo; TAB= Tecido adiposo branco; TAM= Tecido adiposo marrom.

Dentre os principais ligantes dos PPARs que ocorrem naturalmente incluem ácidos graxos e seus derivados eicosanóides, especialmente ácidos graxos poliinsaturados, atuam como sensores lipídicos que desempenham um papel importante na manutenção da homeostase lipídica e na regulação do metabolismo da glicose (balanço energético) (BURRI et al., 2011; GRYGIEL, 2014). Fato coerente

com sua forma de regulação, uma vez que podem afetar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos. Por meio deste mecanismo, a homeostase celular é mantida durante períodos de alimentação e fome, estudos com óleo de peixe mostraram aumento da expressão de genes de resposta PPAR, em particular com altas doses de AGPI n-3 (AHMADIAN et al., 2013; ROLE et al., 2013).

Estudos em animais demonstraram que o óleo de peixe reduz o acúmulo de gordura corporal, que poderia ser mediado por vários mecanismos possíveis, incluindo a redução da proliferação de células adiposas e alterações metabólicas no fígado, no tecido adiposo e no intestino delgado (PUGLISI M et al., 2011; KIM et al., 1999; KAWADA et al., 1998; KIMURA et al., 2013). A princípio esses processos são mediante a ativação do receptor PPAR, porém outros mecanismos são propostos para o envolvimento do óleo de peixe no gasto energético, como a indução da termogênese tanto em TAM interescapular quanto em TAB epididimal através da ativação de UCP1 independente da ativação direta do SNS possivelmente resultado do aumento no *turnover* de noradrenalina (NA) (CRESCENZO et al., 2017). A UCP1 é ativada posteriormente à liberação de catecolaminas, para correlacionar os efeitos da liberação de catecolaminas KIM et al. 2015, quantificaram a NA na urina de camundongos tratados com OP. A quantidade de NA encontrada foi significativamente aumentada pela ingestão de OP, sendo assim, posteriormente foi avaliado os efeitos do tratamento com OP sobre a expressão de genes marcadores de receptores β 3-adrenérgicos e UCP1 que para ambos mostrou-se aumentado, sugerindo que a ingestão de OP aumenta o fluxo simpático (KIM et al., 2015).

Para além dos níveis de UCP1 também foi relatado o escurecimento o TAB epididimal após administração de OP (MAEDA, 2015; KIM et al., 2016). Além disso, a expressão de genes marcadores de adipócitos beges, incluindo coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa (PGC1 α) carnitina palmitoiltransferase 1 B (Cpt1b), ativador da morte celular CIDE-A (Cidea), proteína contendo domínio PR 16 (Prdm16), e fator de crescimento de fibroblastos 21 (Fgf21), foi aumentado em TAM interescapular e TAB epididimal de camundongos alimentados com óleo de peixe (BARGUT et al., 2016; KIM et al 2015). Além desses o fator de transcrição T-box 1 (Tbx1), recentemente definido como um marcador de adipócitos beges, foi significativamente induzido na TAB epididimal pelo óleo de peixe (SHAN; LIANG & KUANG, 2013).

Entre os genes seletivamente expressos no adipócito bege, destacam-se o Tbx1 (que codifica o fator de transcrição T-box 1), o Slc27a1 (que codifica o transportador de ácidos graxos solute carrier Family 27) e genes que codificam proteínas de superfície, como Cd40 e Cd137 (envolvidos na resposta imunológica e inflamatória) e Tmem26 (que codifica a proteína transmembrana 26)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Determinar se a administração do OP potencializa o efeito da estimulação β 3-adrenérgica pelo agonista MIRA em ratos.

3.2 Específicos

- Determinar a melhor dose-resposta da administração aguda do:
 - Agonista β 3-adrenérgico, MIRA, sobre o consumo alimentar acumulativo de 24h.
 - OP, sobre o consumo alimentar acumulativo de 24h.
- Estudar o efeito da administração consecutiva por 8 dias de MIRA e/ou OP sobre o(a):
 - Consumo alimentar, peso corporal e adiposidade dos animais;
 - Temperatura do TAM inter-escapular;
 - Massa do TAB epididimal, TAM e do fígado;
 - Morfologia do TAB epididimal, TAM e do fígado;
 - Fenótipo semelhante ao TAM em TAB;
 - Regulação da expressão de genes associados ao metabolismo energético.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, adultos-jovem, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, os protocolos foram aprovados pelo CEUA 451/18. Todos os animais foram mantidos individualmente em condições experimentais controladas (temperatura: 22 ± 2 °C, umidade: $40 \pm 5\%$, ciclo claro-escuro de 12 horas, luzes acesas às 6:00 da manhã) com acesso livre a alimento e água. A ingestão de ração individual foi monitorada ao longo de todo desenho experimental, bem como o ganho de peso corporal.

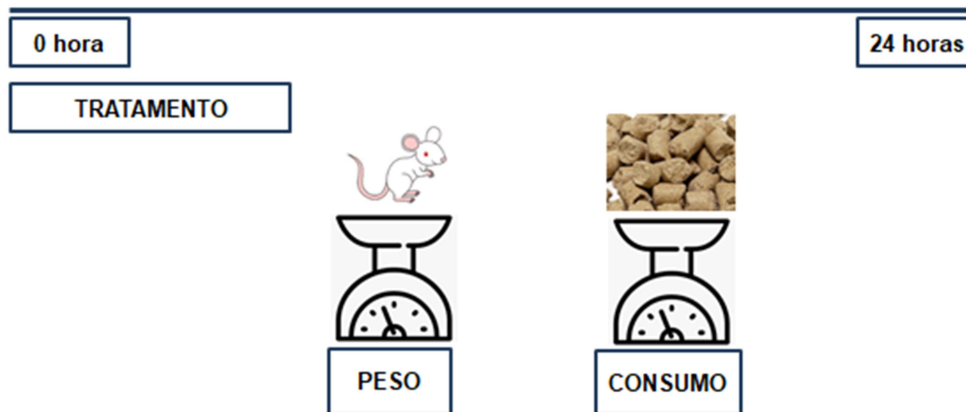
4.2 Desenho Experimental

Inicialmente, os animais foram tratados com Mira e/ou OP em diferentes doses previamente estabelecidas (tratamento dose-resposta agudo) por via oral (V.O.) e via intracerebroventricular (ICV), capazes de promover redução na ingestão de ração e / ou peso corporal (**Figura 7**). Posteriormente, foram utilizadas as doses de melhor resposta nos demais experimentos: Para os tratamentos crônicos via oral avaliamos: ingestão alimentar, variação do peso corporal, temperatura no TAM interescapular, teste de resposta ao frio, teste de resposta ao calor, avaliação da atividade locomotora, avaliação de resposta ao propranolol sobre o peso, consumo e temperatura interescapular e avaliação da pressão arterial média, foi realizada ao final dos protocolos de ingestão alimentar, variação do peso corporal, temperatura no TAM interescapular. Para os tratamentos crônicos via intracerebroventricular avaliamos a ingestão alimentar, variação do peso corporal, temperatura no TAM interescapular. Ao final do protocolo crônico via oral procedeu-se a eutanásia dos animais seguida da coleta dos tecidos para análises de RT-PCR do TABepi, e histologia do fígado, TABepi e do TAM (**Figura 8**).

Figura 7: Desenho Experimental tratamento dose-resposta por gavagem e via intracerebroventricular (ICV): Avaliação dos parâmetros, ganho de peso corporal e consumo acumulado de ração, após 24 horas da administração de diferentes doses.

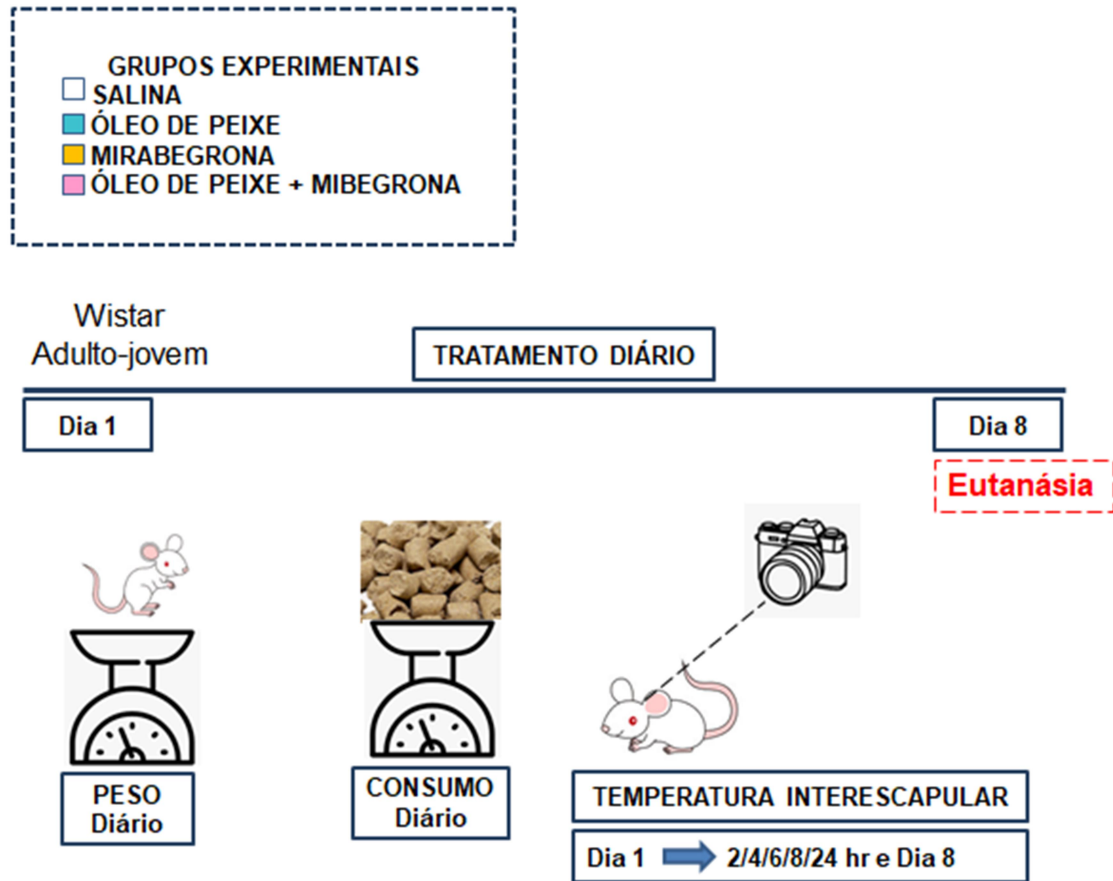
| GRUPOS EXPERIMENTAIS | GAVAGEM | | | ICV | | |
|----------------------|---------|-------|---------|--------|-------------|--------------|
| | | OP | MIRA | | OP | MIRA |
| □ SALINA | Dose 1 | 1g/kg | 10mg/kg | Dose 1 | 0,9 µg/rato | 1,6µg/rato |
| ■ ÓLEO DE PEIXE | Dose 2 | 2g/kg | 20mg/kg | Dose 2 | 1,8 µg/rato | 4,0µg/rato |
| ■ MIRABEGRONA | Dose 3 | 3g/kg | 30mg/kg | Dose 3 | 3,7µg/rato | 8,0µg/rato |
| | | | | Dose 4 | 4,6 µg/rato | 16,0 µg/rato |

Wistar
Adulto-jovem



Fonte: Própria

Figura 8: Desenho Experimental tratamento crônico por gavagem e via intracerebroventricular com duração de 8 dias: Avaliação dos parâmetros, ganho de peso corporal, consumo de ração acumulado e temperatura interescapular.



Fonte: Própria

4.3 Mirabegrona e óleo de peixe (Estudo dose-resposta)

A fim de se obter a dose mais eficaz para o estudo crônico do agonista do receptor β_3 -adrenérgico, mirabegrona (MIRA) (Astellas, São Paulo, Brasil) e do óleo de peixe (OP) (fonte de AGPI, razão 1:5 EPA / DHA; Nordic Naturals, São Paulo, Brasil) (**Tabela 1**), foram feitos estudos dose-resposta agudos. A ingestão de alimentos e a variação do peso foram mensuradas ao longo do tempo 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12 e 24 horas em ratos previamente privados de comida durante 24 horas. A MIRA foi dissolvida em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) e administrada V.O. nas doses de 10,0; 20,0; e 30,0 mg/kg de peso corporal. O OP foi administrado V.O. nas doses de

1,0; 2,0 e 3,0 g/kg de peso corporal. O grupo controle foi tratado com solução salina estéril (NaCl a 0,9%) V.O. na dose de 2 g/kg do animal. A dose mais eficaz, relacionada às reduções de ingestão alimentar e variação do peso corporal acumulados, foi selecionada para cada agonista e utilizada no tratamento crônico (tratamento de 8 dias), para cada dose o respectivo grupo contou com um total de 10 animais. Este protocolo experimental deu origem aos quatro grupos estudados nos protocolos (de administração por via oral) posteriores, sendo eles: Grupo Salina (solução salina na dose de 2 g/kg do animal), Grupo OP (2g/kg), Grupo MIRA (30mg/kg) e Grupo OP+MIRA (2g/kg de OP + 30 mg/kg de MIRA).

Tabela 1: Composição do óleo de peixe utilizado no presente trabalho

| Composição Nutricional | |
|----------------------------|-----------------------|
| Porção 3g | Quantidade por porção |
| Valor energético | 27 kcal=113 KJ |
| Carboidrato | 0g |
| Proteína | 0g |
| Gorduras totais | 3g |
| Gorduras saturadas | 0g |
| Gorduras trans | 0g |
| Gorduras monoinsaturadas | 0,3g |
| Gorduras poliinsaturadas | 1,8g |
| EPA (Ác.Eicosapentaenoico) | 0,3g |
| DHA (Ác.Docosahexaenoico) | 1,5g |
| Fibra alimentar | 0g |
| Sódio | 0mg |
| Vitamina E | 6mg |

Fonte: Naturalis, 2019 (Adaptado).

4.4 Avaliação da ingestão de alimentos e do peso corporal

Após a determinação da melhor dose do óleo de peixe (OP) e da mirabegrona (MIRA), (tratamento dose-resposta agudo), foi avaliado a ingestão alimentar e ganho de peso corporal durante 8 dias de tratamento V.O e ICV, que por sua vez, foi seguido da

eutanásia dos animais para coleta dos tecidos nos quatro grupos experimentais (Salina, OP, MIRA e OP+ MIRA), conforme desenho experimental (**Figura 8**). Foram utilizados 10 animais por grupo e os tecidos coletados foram utilizados para as análises de RT-PCR (tratamento V.O), e histologia do fígado, TABepi e do TAM (V.O e ICV).

4.5 Avaliação da temperatura no TAM

A temperatura interescapular do TAM foi obtida com auxílio de câmera infravermelha (Compact-Infrared-Thermal-Imaging Camera ONE PRO FLIR, West Malling, Kent, Reino Unido), ao longo do experimento nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8° dia de protocolo e analisada por meio de software específico (FLIR Tools Software). Em cada animal foi calculada a temperatura média, a partir de três imagens, de uma área interescapular definida (2 cm de Ø) (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

4.6 Tratamento intracerebroventricular (ICV)

As cânulas intracerebroventriculares (ICV) foram implantadas através do aparelho estereotáxico no ventrículo lateral sob anestesia com ketamina 100 mg/kg intraperitoneal e xilazina 5 mg/kg intraperitoneal, como descrito anteriormente (LOPEZ et al., 2008, 2010, WHITTLE et al., 2012, CONTRERAS et al., 2014, MARTINEZ et al., 2014, ALVAREZ- CRESPO et al., 2016, MARTINS et al., 2016), usando as seguintes coordenadas 1,6 mm lateral, 0,6 mm posterior, 4,5 mm de profundidade do crânio. Durante o período de 72h após a cirurgia os animais foram tratados com anti-inflamatório cetoprofeno na dose de 2,5 mg/kg, via oral de 12h/12h. A fim de se obter a dose mais eficaz de OP e MIRA foram feitos estudos dose-resposta agudos sob o consumo de ração e o peso corporal. A MIRA foi diluída em solução salina e administrada centralmente nas doses de 1,6; 4,0; 8,0 e 16 µg/rato, o OP foi administrado nas doses 0,9; 1,8; 3,7; 4,6 µg/rato e no grupo controle será administrada salina 1,0 µg/rato. Em seguida, foi utilizada a dose de melhor resposta nos tratamento via ICV crônico (tratamento de 8 dias), neste foram utilizados 10 animais por grupo, os parâmetros avaliados foram: paralelamente a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal, e a captura das imagens térmicas nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8° dia, seguido da eutanásia dos animais para coleta dos tecidos para análise histológica do fígado TABepi e do TAM.

4.7 Coleta de amostras

Os animais dos quatro grupos experimentais (Salina, MIRA, OP e MIRA+OP) do tratamento via oral e via intracerebroventricular foram eutanasiados por sobredose de anestésico (Tiopental sódico - 150 mg/kg + Cloridrato de Lidocaína 10 mg/kg, via intraperitoneal) 2 horas após a última dose de tratamento para os protocolos crônicos de 8 dias por via oral e ICV . O TAB (epididimal), o TAM e o fígado foram dissecados e fixados com 10% de paraformaldeído em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) por imersão até análise histológica. O restante da amostra do TABepi do tratamento V.O foi congelado à -80 °C para análises RT-qPCR.

4.8 Análise histológica

4.8.1 Obtenção e processamento dos tecidos

As amostras dos diferentes tecidos fígado, TAM e TABepi foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Depois de fixadas, foram então desidratadas com concentrações crescentes de etanol (70, 95 e 100%) e em seguida à desidratação, as amostras foram compensadas em banhos de xilol e mergulhadas em parafina (Paraplast X-tra, SEM) para inclusão. Todo o procedimento teve duração de 12 horas e foi executado no histotécnico (Leica[®]). Decorrido esse tempo, as amostras foram montadas em blocos de parafina para realização da microtomia, de forma que foram feitos cortes de 3 µm de espessura e colocados sobre as lâminas. Técnica adaptada de Silvério et al. (2017).

4.8.2 Desparafinização e hidratação

Os cortes foram colocados em estufa a 70 °C e em seguida, desparafinizados com sucessivos banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 95 e 70%) e lavados em água destilada.

4.8.3 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

A coloração com H&E foi realizada em cestos metálicos da seguinte forma: i) 7 minutos com hematoxilina; e ii) 3 minutos com eosina. Após o processo de coloração, as lâminas foram fechadas com lamínulas e seladas com resina.

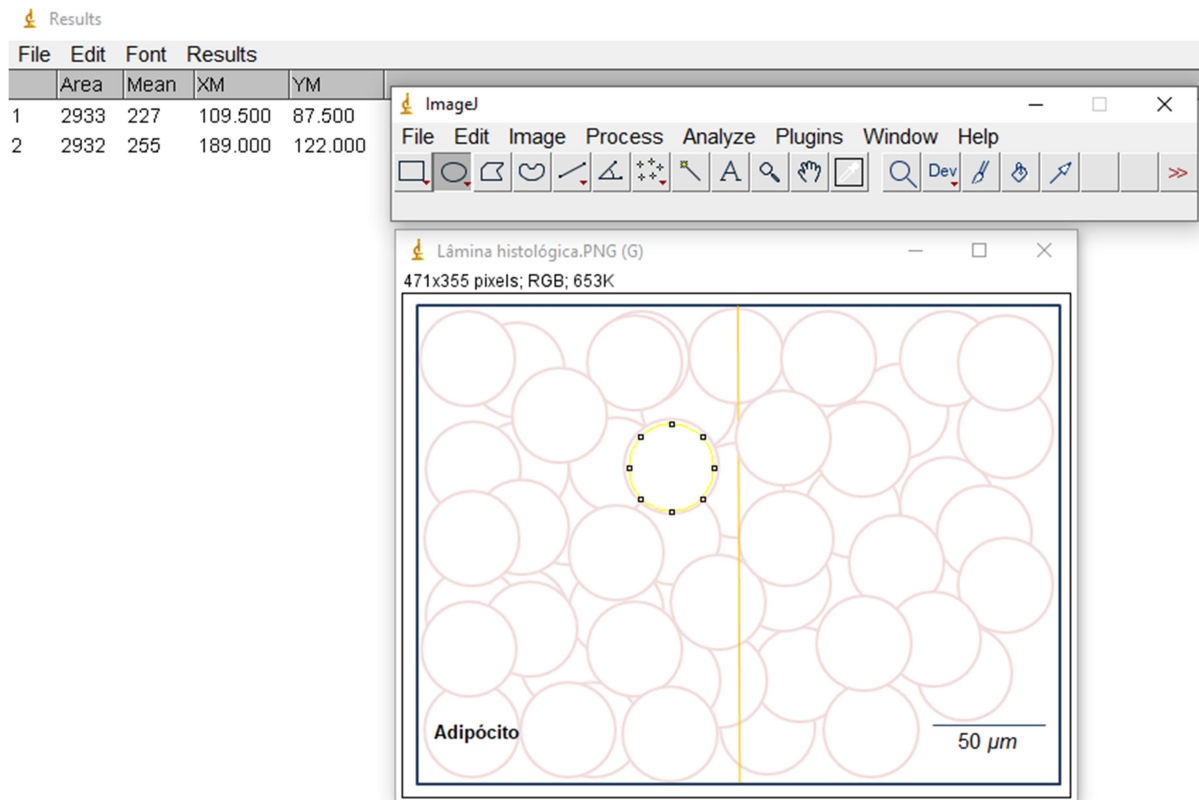
4.8.4 Análise das imagens

As imagens teciduais foram obtidas com aumento de 40x em microscópio de luz (Olympus CX41), gravadas em câmera digital (Olympus SC30) e exibidas em monitor de alta resolução (LG, Flatron, E2011P).

4.8.5 Análise da área dos adipócitos

A área das gotículas lipídicas nas seções do tecido adiposo foi determinada usando o software ImageJ (National Institutes of Health) de acordo com o método descrito em Parlee et al. (2014). As áreas mensuradas pertenciam a 3 lâminas histológicas distintas e por cada lâmina foram mensurados 15 adipócitos distribuídos centralmente na lâmina (**Figura 9**).

Figura 9: Quantificação da área de adipócitos (ilustrativo) através do software ImageJ



Fonte: Própria

4.9 Avaliação da expressão de genes

Para a análise da influência da administração de OP e / ou MIRA sobre a expressão de genes relacionados ao balanço energético, foi utilizada a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (q PCR - RT), cujo procedimento foi adaptado de Norren et al (2015). Com base nos resultados de Massa dos tecidos coletados, optamos por realizar este protocolo apenas no TABepi, dos grupos tratados por V.O, por ter demonstrado alterações significativas e robustas quando comparado aos demais. As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Metabolismo de Lipídios no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.9.1 Extração de RNA total

Para isolar o RNA total do tecido adiposo branco epididimal, as amostras de aproximadamente 15 mg, foram homogeneizadas em 1 mL solução de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após essa etapa, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio ao homogeneizado e, posteriormente realizada uma centrifugação a 15.100 G (4 °C, 15 minutos), para recuperação da fase aquosa superior. A esta, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico e em seguida, realizada nova centrifugação (15.100 g, 4 °C, 10 minutos) para obtenção do precipitado. Descartou-se o sobrenadante, ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 95% e realizou-se centrifugação a 10.700 g (4 °C, 5 minutos). O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem com etanol 95% foi repetido. Após secagem, o precipitado final, sem resíduo de etanol, foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura (Sigma®). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese, com gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. A leitura da concentração do RNA total foi realizada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop (Biotek® Synergy/H1) no comprimento de onda de 260/280 nm.

4.9.2 Reação de transcrição reversa

As amostras contendo 2 µg de RNA total foram adicionadas de água ultrapura e incubadas por 10 minutos a 65 °C para desnaturação. Em seguida foram submetidas à reação de transcrição reversa. Para tanto, foi adicionado em cada amostra o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen) com o volume final de 14 µL. As reações foram realizadas em ciclo único sob as condições de tempo e temperatura que seguem: i) 10 minutos a 25°C; ii) 120 minutos a 37 °C; iii) 5 minutos a 85 °C; e iv) resfriamento a 4 °C. Por fim, as amostras de DNA complementar (cDNA) foram armazenadas a - 20 °C.

4.9.3 Seleção dos primers

Os primers foram sintetizados pela Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA). Para determinar a sequência do primer utilizou-se o Genbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Além disso, foram selecionados os candidatos a primer de acordo com os seguintes critérios: i) comprimento entre 18 e 24 pares de bases (bp); ii) T_m entre 58 e 62 °C; iii) comprimento do produto amplificado entre 100 e 150 bp; e iv) as sequências Sense e Antisense nunca devem sair do mesmo éxon. Para determinar a especificidades do primer, as sequências foram comparadas com o Genbank usando o programa Blast (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.9.4 Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT)

A expressão dos genes (**Figura 17**) foi quantificada por qPCR-RT em Termociclador QuantStudio™ 12k Flex e SYBR Green como marcador de fluorescência (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para reação foram utilizados 2 µL de cDNA da amostra para um volume final de 10 µL. A concentração de cDNA foi de 10 ng por amostra e foi utilizado um intervalo de 200-800 nM de acordo com o primer, utilizando 5 µL do mix SYBR Green, que contém dNTP tampão de reação, Taq DNA polimerase SYBR green. A reação ocorreu do seguinte modo: primeiramente, um ciclo de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificação: i) desnaturação a 95 °C por 15 segundos, ii) anelamento a 63 °C por 60 segundos e iii) extensão a 72 °C, por 2 minutos. Para análise dos resultados foram calculados os valores do limiar de ciclagem (ΔC_t) para cada gene de interesse ($\Delta C_t = C_t \text{ gene de interesse} - C_t \text{ gene constitutivo}$). A partir de teste inicial realizado com dois genes constitutivos, hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (HPRT1) e proteína ribossômica L32 (RPL32) utilizou-se como normalizador aquele que apresentou menor variabilidade entre as amostras. Os resultados foram expressos com base na relação do mRNA de cada gene de interesse, relativizado com o conteúdo de mRNA do gene constitutivo selecionado (HPRT1)

Tabela 2: Descrição dos primers utilizados nas análises de PCR-RT.

| Gene | N acesso | Sense | Massa |
|---------------|-------------|--------------------------|-------|
| | | Antisense | |
| LPL | NM_012598.2 | TGCCCTAAGGACCCCTGAAG | 140 |
| | | ACATTCCTGTCACCGTCCAT | |
| UCP1 | NM_012682.2 | CCGAGCCAAGATGGTGAGTT | 114 |
| | | CCTTGGATCTGAAGGCGGAC | |
| ADBR3 | NM_013108.2 | TAGCAAGGAGCCTGACTTCTG | 133 |
| | | TTCTGGAGAGTTGCGGTTCC | |
| PPAR γ | NM_013124.3 | ACACAGACAAAACATCAGTGGG | 143 |
| | | TGGTAATTTCTTGTGAAGTGCTCA | |

Fonte: Própria

4.10 Atividade locomotora obtida em teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado

O Campo aberto consistiu de uma arena quadrada 60 cm de largura x 50 cm de altura subdivido em 9 quadrantes, sendo 8 periféricas e 1 central. Os animais receberam tratamento (VO) e após 30 minutos da administração foram colocados na área central e observados por 10 minutos. Durante este período, foi mensurado a atividade locomotora dos animais, o número de levantamentos no qual o animal ficava sob as duas patas traseiras e cada unidade de locomoção correspondeu ao ato do animal entrar com as 4 patas em qualquer um dos quadrantes do campo aberto no tempo estabelecido.

O labirinto em cruz elevado foi composto de 4 braços, sendo 2 abertos e dois fechados, arranjados de forma que os braços do mesmo tipo ficaram em oposição entre si, ligados por uma área central e o aparelho foi elevado a 40 cm do chão. Cada animal foi submetido a uma única sessão de cinco minutos. Os animais foram posicionados no centro da plataforma com a face voltada para o braço aberto e foi mensurado o tempo de permanência em cada um dos braços (aberto/fechado).

4.11 Termorregulação

4.11.1 Estudo de adaptação ao frio

Os animais foram mantidos por 6h a 4 °C. A temperatura corporal foi obtida com auxílio de câmera infravermelha (Compact-Infrared-Thermal-Imaging Câmera ONE PRO FLIR, West Malling, Kent, Reino Unido) (PARDO et al., 2016; BEIROA et al., 2014). Além disso, a temperatura interescapular do TAM foi avaliada antes da exposição ao frio, bem como, ao final da exposição. Cada animal foi mantido em sua respectiva caixa com maravalha nova, comida e água *ad libitum*, durante 6h em um sistema de refrigeração de volume de 337 litros (geladeira). A cada ronda de teste foram realizados com 6 animais (cada um em caixas individuais). A temperatura neste sistema foi mensurada por um termômetro termográfico em LCD (eLife Co., Ltd, China). Todo o sistema de ventilação, exaustão e renovação de ar foi controlado por um evaporador (moto-ventilador) que está localizado no compartimento do freezer que é capaz de promover a circulação de ar entre os compartimentos do freezer e do refrigerador. Ademais, o sistema de fluxo de ar multidirecional garante a circulação uniforme do ar frio em todo o compartimento. O fluxo de volume de ar é de 600 CFM (pés cúbicos por minuto) o equivalente a 189 L/s de ar o equivalente de 509.7 m³/h de exaustão.

4.11.2 Estudo de adaptação ao calor

Os animais foram previamente adaptados a um ambiente com temperatura média de 30°C, foi avaliado a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal durante 8 dias de tratamento. Foram utilizados 08 animais por grupo e a temperatura interescapular do TAM foi obtida com auxílio de câmera infravermelha (Compact-Infrared-Thermal-Imaging Câmera ONE PRO, FLIR, West Malling, Kent, Reino Unido), ao longo do experimento nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8° dia de protocolo e analisada por meio de software específico (FLIR Tools Software). Em cada animal foi calculada a temperatura média, a partir de três imagens, de uma área interescapular definida (2 cm de Ø) (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

4.12 Tratamento com propranolol

Os animais receberam injeção intraperitoneal de propranolol (2mg / kg). Trinta minutos após a injeção, os ratos receberam uma administração oral de Salina, OP, MIRA

e OP + MIRA (v.o.) e outros 4 grupos receberam apenas o tratamento padrão Salina, OP, MIRA e OP + MIRA, sem administração prévia de propranolol por 8 dias com as mesmas doses anteriormente pre-estabelecidas, neste foram utilizados 8 animais por grupo, os parâmetros avaliados foram: paralelamente a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal, e a captura das imagens térmicas nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8º dia.

4.13 Medida de pressão arterial média

A pressão arterial média (PAM) foi determinada usando o método de pletismografia de cauda (Powerlab/Adinstruments/Sidney-Austrália) em ratos conscientes. Os ratos foram acondicionados por três dias consecutivos em um tubo cilíndrico de acrílico. No dia da medida os ratos foram pré-aquecidos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos e colocados em um aparelho de contenção para medida da PAM. Para análise dos resultados foram quantificados o valor médio de três medidas consecutivas estáveis, com um intervalo de tempo, entre as medidas, de aproximadamente um minuto. A pressão do manguito foi controlada automaticamente e os pulsos sistólicos detectados pelo transdutor de pulso.

4.13.1 Procedimento cirúrgico para canulação da artéria e veia femorais

Ao final do período de tratamento e vinte quatro horas antes da realização do protocolo experimental, os animais foram submetidos à anestesia (cetamina – 100mg/Kg e xilazina – 5mg/100g, via i.p.). Em seguida foram implantadas cânulas de polietileno (PE-10/PE-50, Intramedic, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) na artéria e veia femorais esquerdas, para registro da pressão arterial pulsátil (PAM) e administração de drogas, respectivamente. As cânulas foram exteriorizadas no dorso e fixadas na nuca do animal.

4.14 Análise estatística

Todos os dados foram representados como média \pm SEM (erro padrão da média). O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para indicar se todos os dados seguiram uma distribuição gaussiana. As diferenças entre os tratamentos

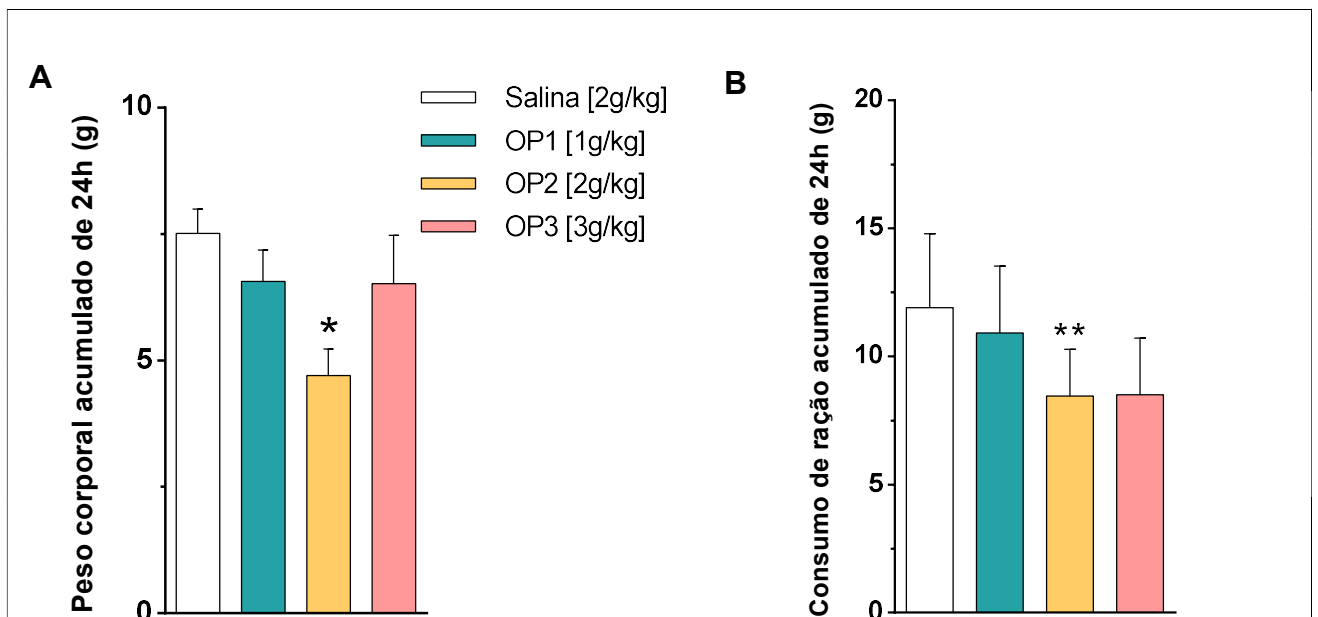
foram analisadas por ANOVA one-way, seguido do teste de Dunnett para comparação entre tratamento e controle e para comparações entre tratamentos foi utilizado teste de Tukey, $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais

Com objetivo de determinar o papel do óleo de peixe e da mirabegrona sobre o balanço energético, primeiro foi realizado um protocolo dose-resposta para avaliar a resposta dos animais às diferentes doses administradas. De acordo com os valores expressos nos **Gráficos 10A-B**, observou-se que houve uma supressão do ganho de peso e do consumo de ração pelos animais dos grupos óleos de peixe, mostrando-se para ambas as variáveis, ser mais significativo no grupo OP [2g/kg] principalmente a partir de 4 horas após a administração.

Figura 10: Efeitos da administração via oral, por gavagem, de diferentes doses de óleo de peixe sobre o peso e o consumo em ratos privados de alimentos durante 24 hs.

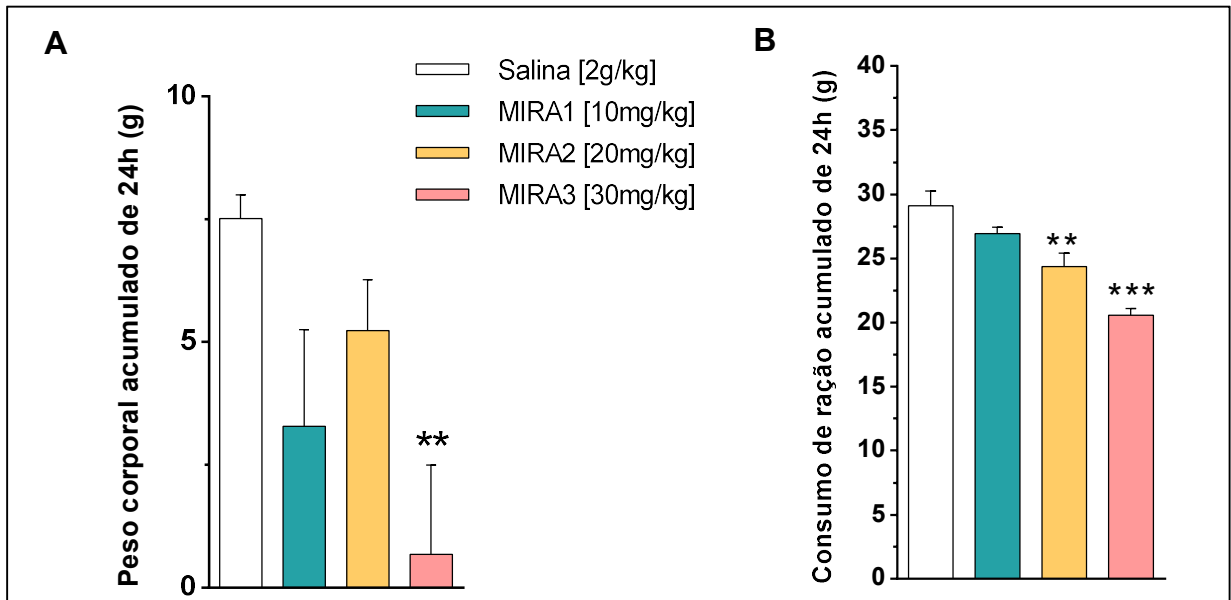


A. Efeito dose-resposta da administração oral de óleo de peixe nas doses de 1.0, 2.0 e 3.0 g/kg sobre o peso; **B.** Efeito dose-resposta da administração oral de óleo de peixe nas doses de 1.0, 2.0, 3.0 g/kg sobre o consumo. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, pós teste Dunnett. Legenda: OP = Óleo de peixe

Em relação ao tratamento com a mirabegrona, verificou-se resultados semelhantes, houve redução do ganho de peso, significativamente maior na dose 30 mg/kg e a partir de 4 horas de tratamento como mostra o **Gráfico 11A**. Semelhante

ao peso, a redução do consumo foi significativamente maior na dose 30 mg/kg, como mostra o **Gráfico 11B**.

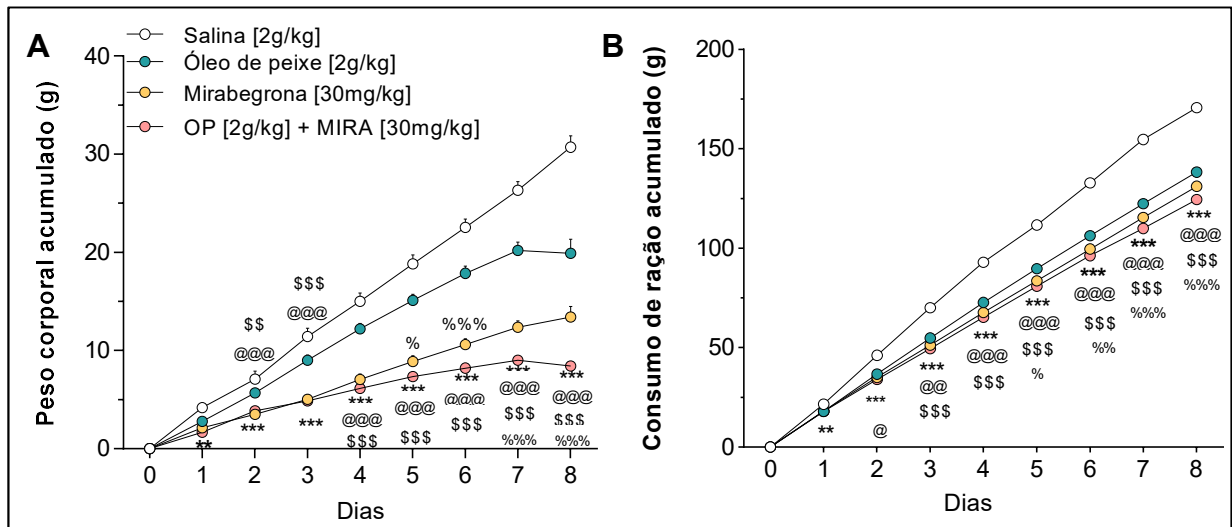
Figura 11: Efeitos da administração via oral, por gavagem, de diferentes doses de mirabegrona sobre o peso e consumo em ratos privados de alimentos durante 24 hs.



A, Efeito dose-dependente da administração oral de Mirabegrona nas doses de 10, 20, e 30 mg/kg sobre o peso acumulado; **B**, Efeito dose-dependente da administração oral de Mirabegrona nas doses de 10, 20, e 30 mg/kg sobre o consumo acumulado. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 9-10$ animais por grupo. * DS tratamento vs salina, onde $*p < 0,05$, $** < 0,001$, $***p < 0,0001$, pós teste Dunnett. Legenda: MIRA = Mirabegrona

Para analisar os efeitos acumulativos da administração das doses de óleo de peixe e de mirabegrona, bem como de seu uso combinado, os animais foram tratados por um período de 8 dias, com intervalo de administração de 24 horas, com as doses cujos efeitos foram mais significativos, assim para o óleo de peixe a dose escolhida foi 2g/kg e para mirabegrona foi 30mg/kg.

Figura 12: Efeito da administração via oral, por gavagem, de óleo de peixe e/ou mirabegrona sobre peso e soncumo acumulados em ratos tratados por 8 dias.



A. Efeito da administração oral de OP e/ou MIRA nas doses de 2g/kg e 30mg/kg sobre o peso acumulado por 8 dias consecutivos. **B.** Efeito da administração oral de OP e/ou Mirabegrona nas doses de 2g/kg e 30mg/kg sobre o consumo acumulado por 8 dias consecutivos. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001. Pós teste de Tukey.

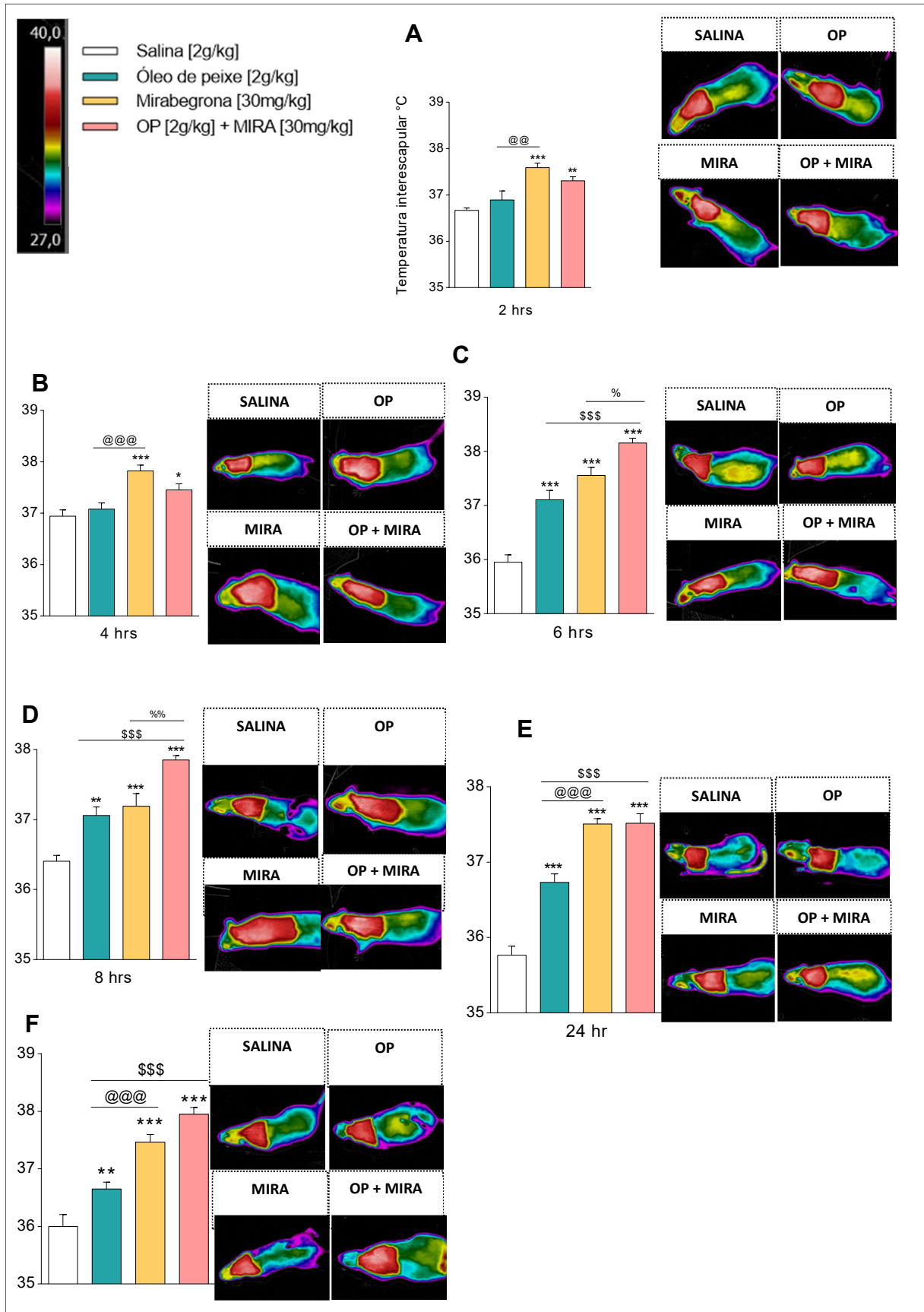
Os **Gráficos 12A-B** nos mostra que existe efeitos acumulados de ambos os tratamentos, com redução significativa do ganho de peso e consumo durante os 8 dias, sendo os efeitos sobre a redução do peso mais acentuados. Como vimos, o uso combinado das duas substâncias reduz ainda mais o ganho de peso em todos os dias, e do 5° ao 8° dia esse grupo teve redução significativamente maior do ganho de peso e consumo em relação a seus tratamentos isolados (**gráfico 12A-B**).

5.2 Avaliação da temperatura interescapular dos animais para o tratamento periférico

A fim de correlacionar a perda de peso com o aumento da termogênese foi capturada fotos térmicas da região interescapular dos animais nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8° (oitavo) dia (**Figura 13**). A imagem fototérmica mostra que em todos os tempos os grupos MIRA e OP+MIRA atingiram médias de temperatura maior que os animais dos grupos salina e OP. Nas primeiras 4 horas a média de temperatura registrada foi mais alta para os animais do grupo MIRA (**Gráficos 13A-B**). Nos demais tempos as temperaturas registradas são mais altas no grupo OP+MIRA (**Gráficos 13C-D-E-F**). A temperatura registrada nos animais do grupo

OP foi menor que os grupos MIRA e OP+MIRA em todos os tempos, entretanto a partir de 6 horas, foi significativamente maior que a média registrada no grupo controle (**Gráficos 13C-D-E-F**).

Figura 13: Efeito da administração oral, por gavagem, consecutiva de óleo de peixe e/ou mirabegrona sobre a temperatura interescapular em ratos tratados por 8 dias.



5.3 Parâmetros morfológicos e histológicos: Tratamento periférico

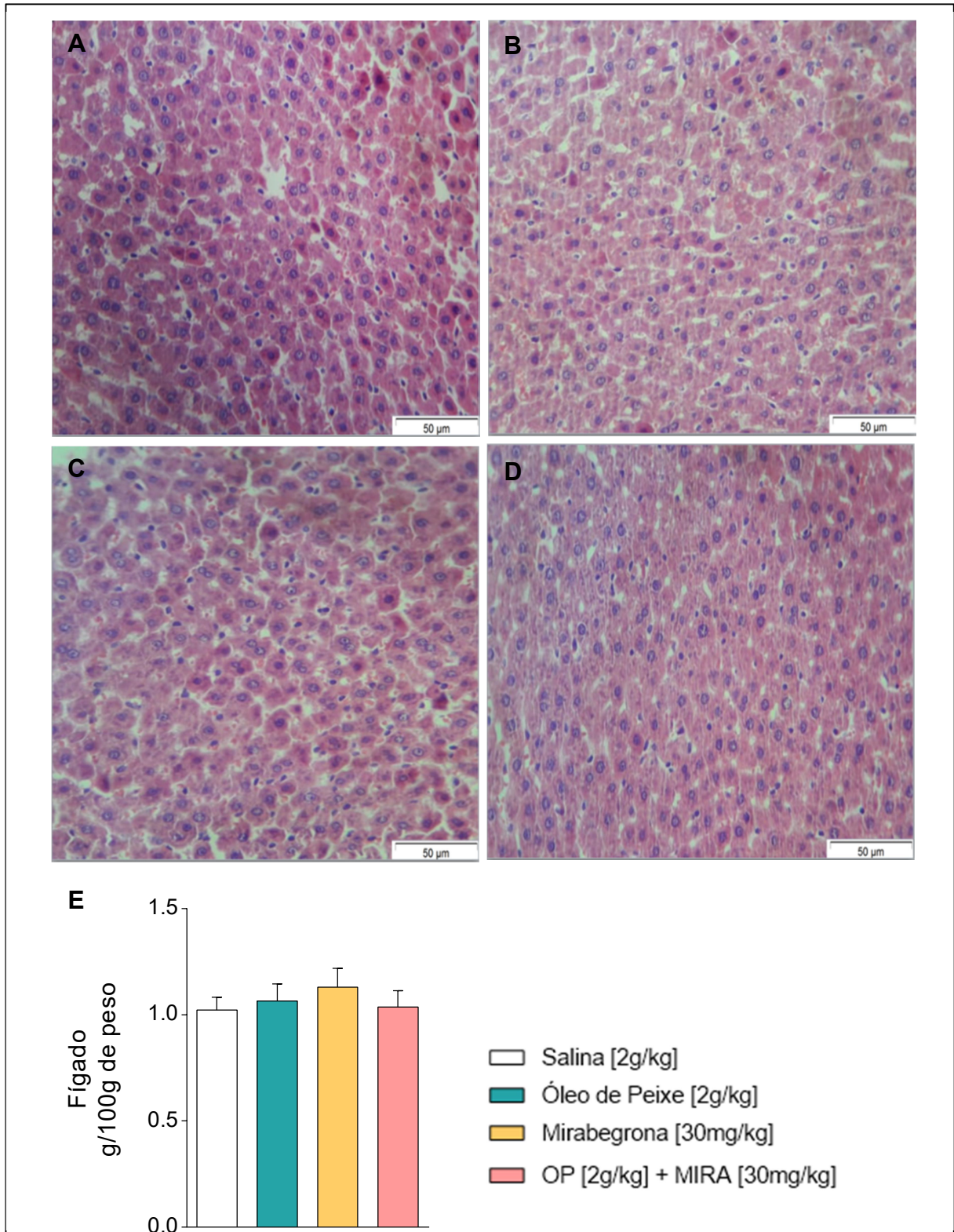
A histologia do fígado revelou um padrão semelhante para os quatro grupos tratados (**Figura 14A-D**), apresentando seus componentes básicos, os hepatócitos, “enfileirados” e organizados em placas que se interconectam e sem apresentar diferença significativa da massa total para todos os tratamentos (**Gráfico 14E**).

A figura 14 ilustra a histologia tecido adiposo marrom, os grupos apresentaram característica padrão do TAM, com presença de várias pequenas gotículas lipídicas multiloculares localizadas no citoplasma e presença de muitas mitocôndrias (**Figura 15**). Visivelmente, o grupo salina, revelou gotículas de gordura maiores e em maior quantidade que os demais tratamentos (**Figura 15A**).

Não houve diferença significativa na massa entre os grupos para a gordura marrom (**Figura 15E**).

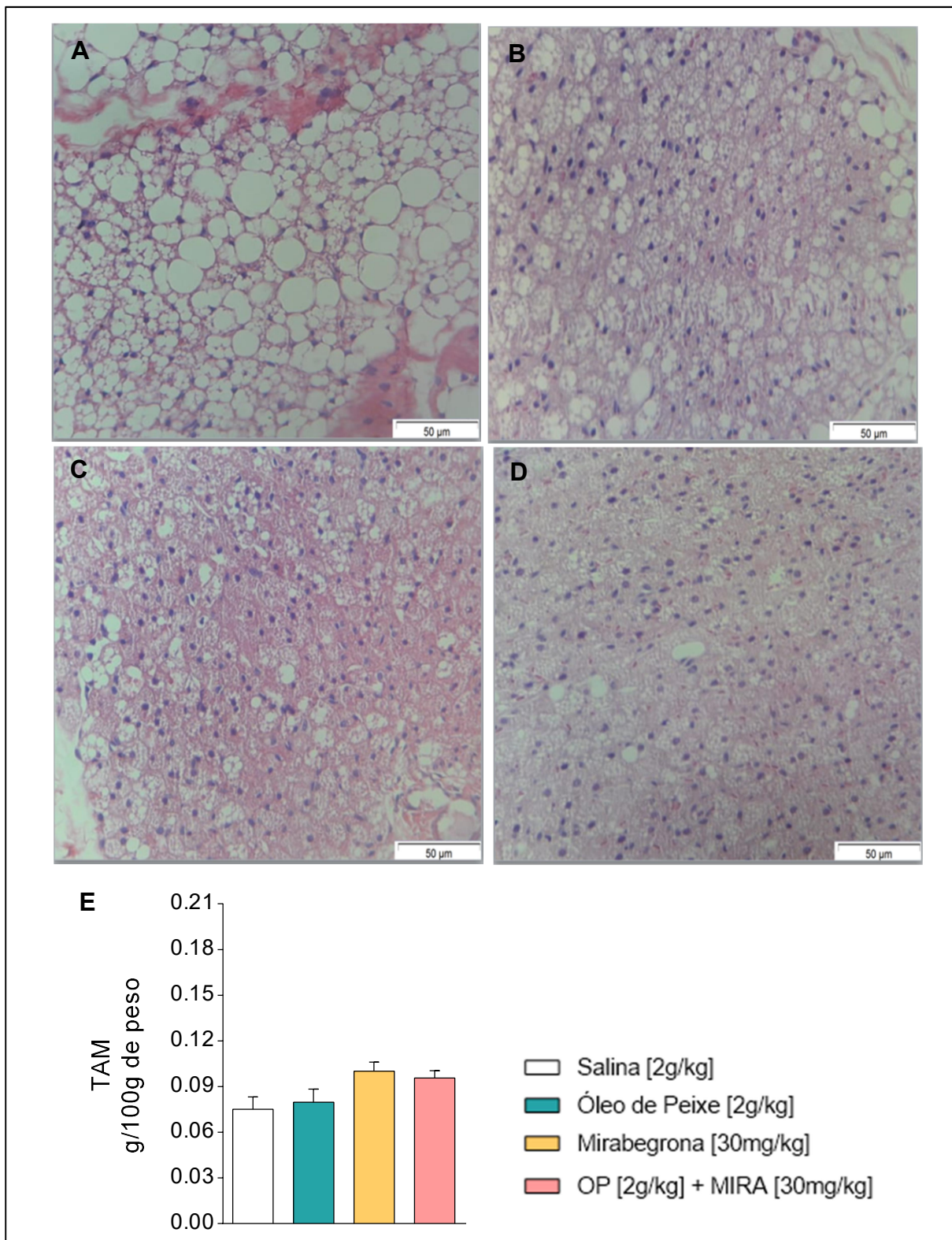
Os estoques de tecido adiposo branco epididimal dos grupos MIRA e OP + MIRA apresentaram-se reduzidos em relação ao tratamento com salina (**Figura 16J**). Os aspectos histológicos observados configuram-se distintos entre os grupos tratados. Enquanto, no grupo salina, os adipócitos obedecem a sua forma esférica característica, núcleo restrito á periferia e apresentando uma grande gotícula lipídica (**Figura 16A**), nos demais grupos há redução da área das gotículas lipídicas em comparação ao grupo salina, (**Figura 16I**). Além disso, a frequência de distribuição da área dos adipócitos segue uma ordem decrescente entre os tratamentos onde, para o grupo salina, a maior parte está entre 1400 e 2000 μm^2 (**Figura 16E**), para o grupo OP, a frequência é maior entre 700 e 1200 μm^2 (**Figura 16F**), para o grupo MIRA, está entre 800 μm^2 (**Figura 16G**), e para o grupo OP+MIRA está entre 600 e 900 μm^2 (**Figura 16H**).

Figura 14: Características histológicas e avaliação dos estoques do fígado dos animais após 8 dias de tratamento por gavagem. Coloração com hematoxilina e eosina.



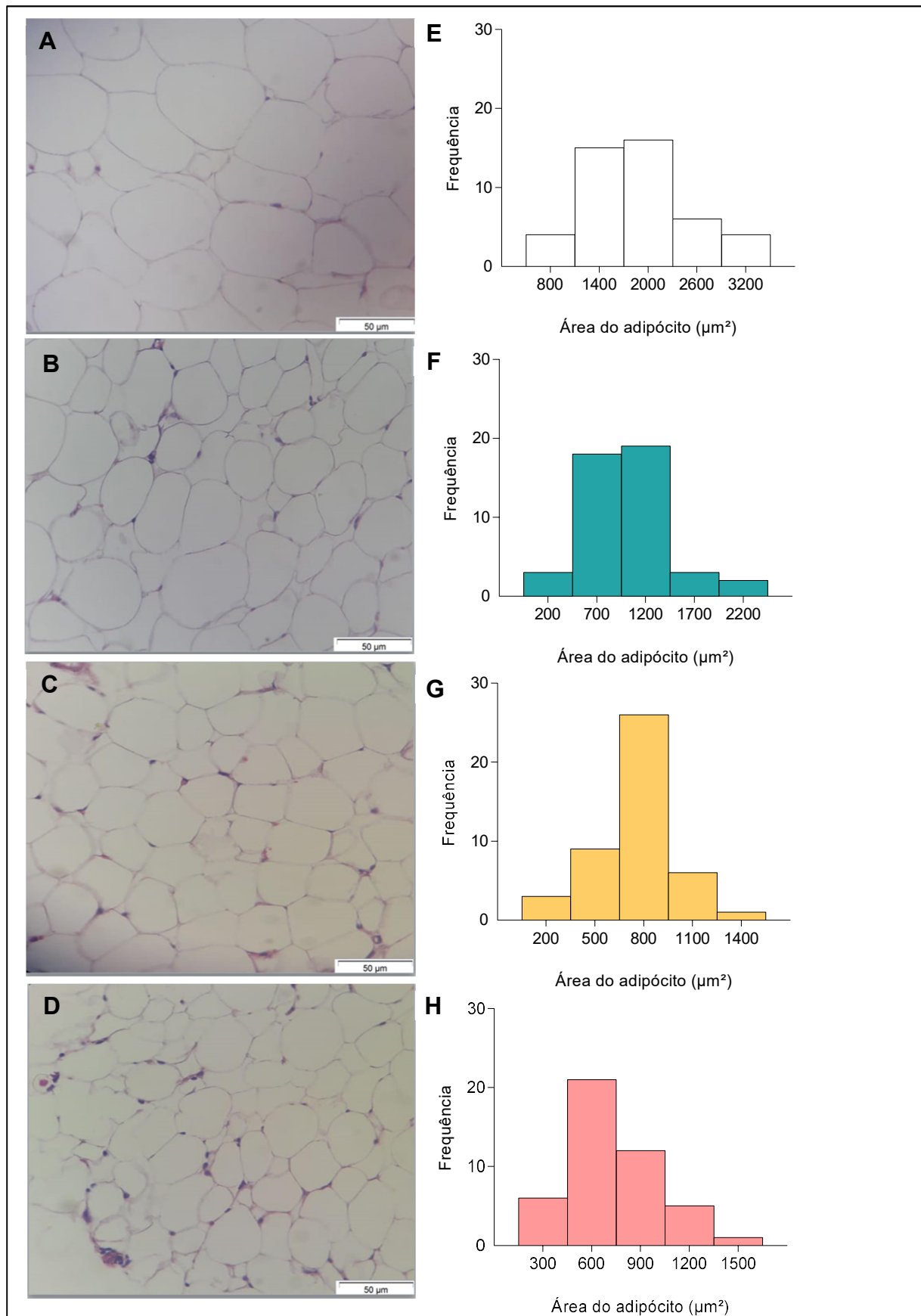
A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Peso do fígado para os diferentes tratamentos. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 9-10$ animais por grupo. * DS tratamento vs salina, onde $*p < 0,05$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$, pós teste Dunnett.

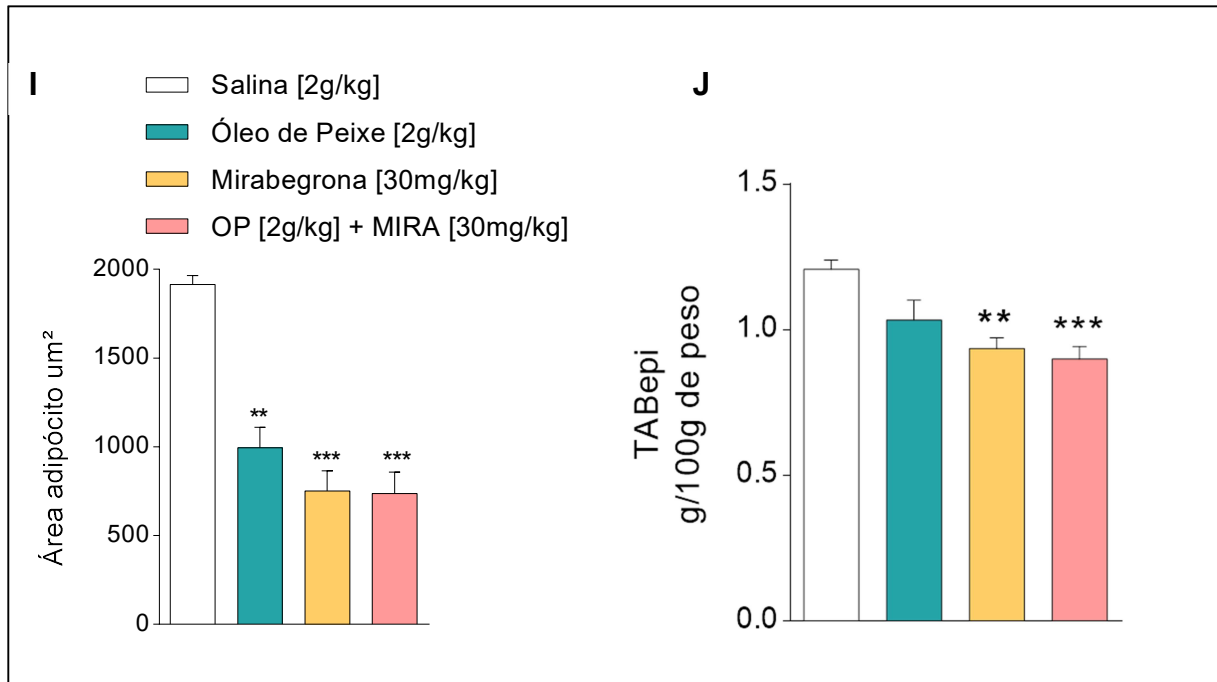
Figura 15: Características histológicas e avaliação dos estoques do tecido adiposo marrom dos animais após 8 dias de tratamento por gavagem. Coloração com hematoxilina e eosina.



A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Peso do TAM para os diferentes tratamentos. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, Pós teste de Dunnett.

Figura 16: Características histológicas e avaliação dos estoques do tecido adiposo branco epididimal dos animais após 8 dias de tratamento por gavagem. Coloração com hematoxilina e eosina.



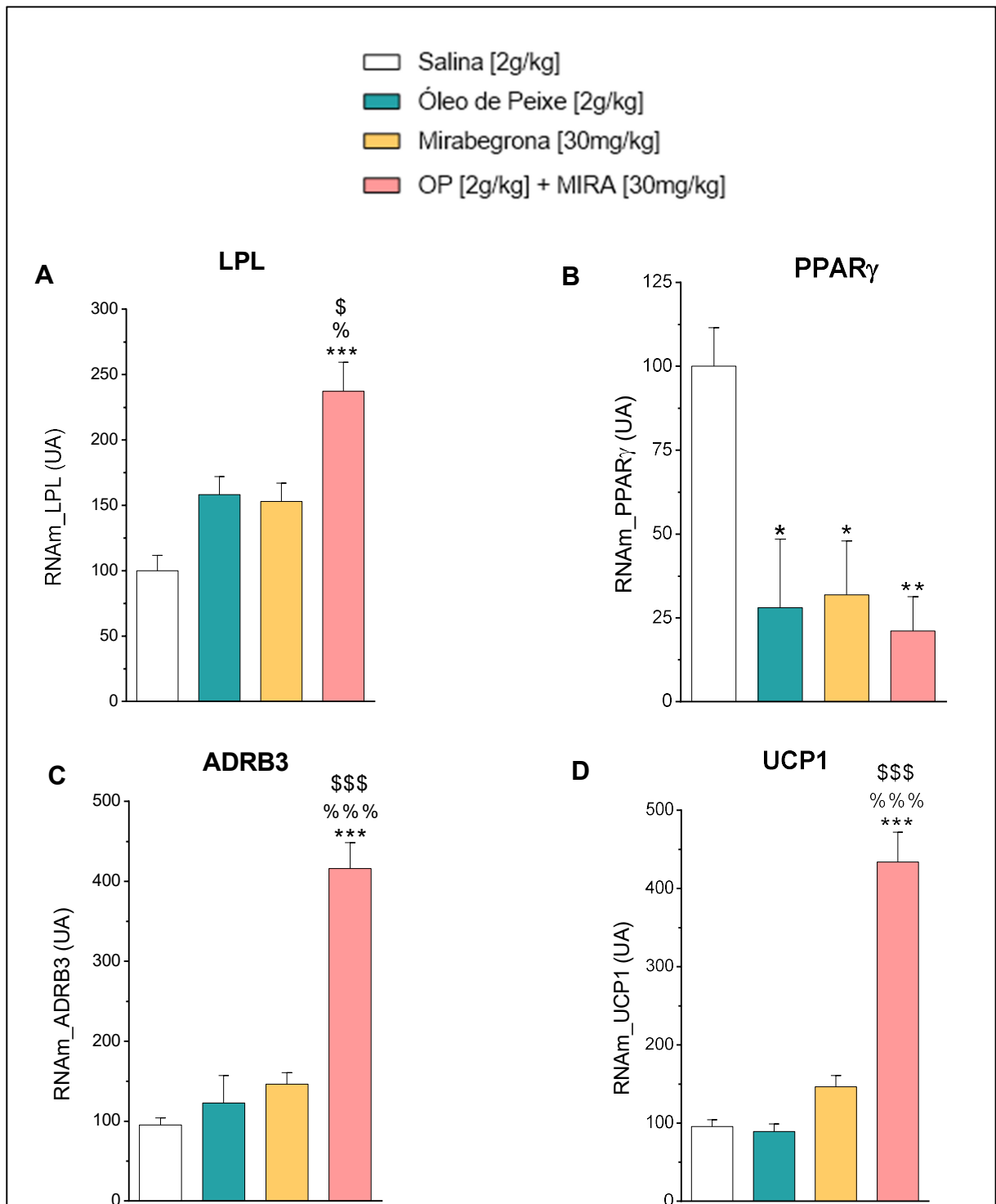


A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Frequência adipócitos grupo salina, **F.** Frequência adipócitos grupo OP, **G.** Frequência adipócitos grupo MIRA, **H.** Frequência adipócitos grupo OP + MIRA, **I.** Área dos adipócitos, **J.** Peso do TABepi para os diferentes tratamentos. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 9-10$ animais por grupo. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $< 0,001$, *** $p < 0,0001$, pós teste Dunnett. Legenda: TABepi = Tecido adiposo marrom epididimal

Para entender melhor os mecanismos moleculares responsáveis pela redução da massa de TABepi tal qual a redução da área dos adipócitos após o tratamento, foi analisado o perfil de expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Nos animais, a expressão do gene envolvido na lipogênese (LPL), estava significativamente aumentada no grupo OP+MIRA em relação aos demais tratamentos (**Figura 17A**). O PPAR γ , um dos principais reguladores da homeostase de lipídeos, demonstrou-se reduzido em todos os tratamentos quando comparado ao grupo controle, sendo esta redução maior para o grupo OP+MIRA (**Figura 17B**). Os genes do receptor beta-adrenérgico ADRB3 e o gene para UCP1, de forma semelhante, mostram padrão de expressão elevado para o tratamento OP+MIRA (**Figura 17C-D**) significativamente maior em relação aos demais tratamentos isolados.

5.4 Análise de expressão gênica no Tecido adiposo branco epididimal

Figura 17: Expressão gênica do tecido adiposo branco epididimal.

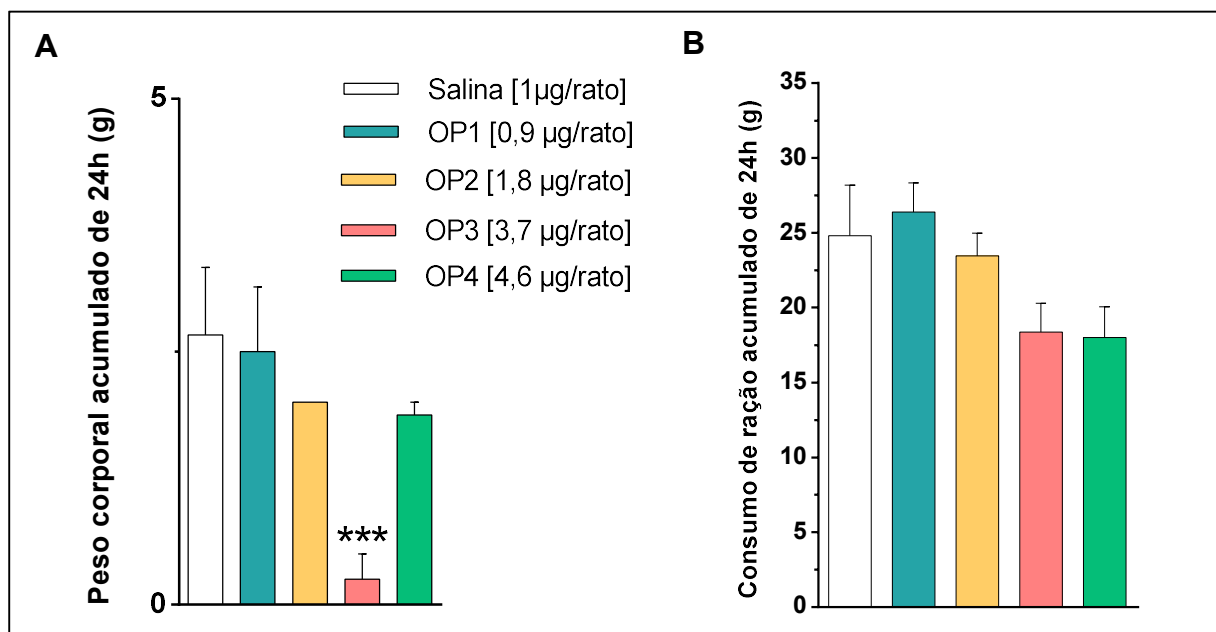


A. Expressão gênica de LPL, **B.** Expressão gênica de PPAR γ , **C.** Expressão gênica de ADRB3, **D.** Expressão gênica de UCP1, **E.** Expressão gênica de LPL. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 3-4 animais por grupo. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Pós teste Tukey. n = 3-4 animais por grupo. Legenda: UA = unidade arbitrária; UCP1 = proteína desacopladora 1; PPAR γ receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma; ADRB3 = receptor $\beta 3$ -adrenérgico; LPL = lipase lipoproteica.

5.5 Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais tratados via intracerebroventricular (ICV)

Tendo em vista que a via de administração pode influenciar a seletividade de um medicamento ou nutriente os animais receberam os mesmos tratamentos via central, por administração intracerebroventricular e foram obtidos resultados semelhantes ao tratamento periférico. Para o óleo de peixe a redução do peso acumulado ocorreu com significância a partir de 6 horas do tratamento e foi maior em todos os tempos para o grupo 3,7 $\mu\text{g}/\text{rato}$, já em relação ao consumo esse grupo apresentou redução significativa apenas no tempo de 24 horas, outro grupo que apresentou redução no consumo foi 4,6 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (**Figura 17A-B**).

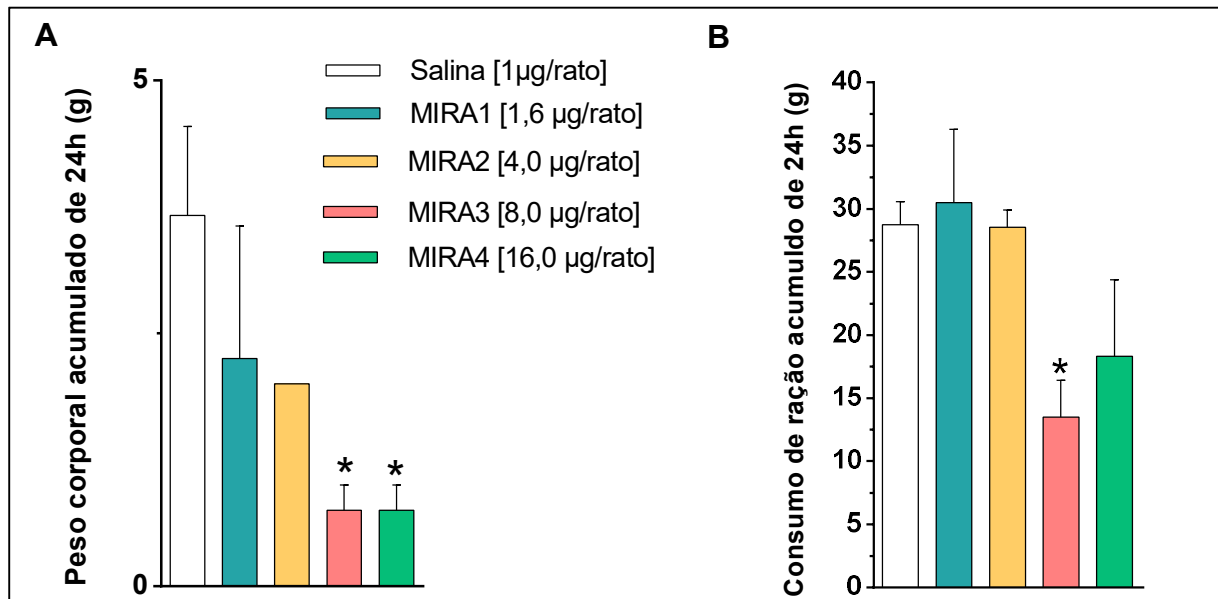
Figura 18: Efeitos da administração central, via intracerebroventricular, de diferentes doses de óleo de peixe sobre o peso e consumo acumulados em ratos privados de alimentos durante 24 hs.



A, Efeito dose-dependente da administração central de óleo de peixe nas doses de 0,9, 1,8, 3,7 e 4,6 $\mu\text{g}/\text{rato}$ sobre o peso acumulado; **B**, Efeito dose-dependente da administração central de óleo de peixe nas doses de 0,9, 1,8, 3,7 e 4,6 $\mu\text{g}/\text{rato}$ sobre o consumo acumulado. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 4-5 animais por grupo. Pós teste de Dunnett * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Legenda: OP=Óleo de peixe

Com o tratamento mirabegrona também houve redução significativa do ganho de peso para o grupo 8 $\mu\text{g}/\text{rato}$ aos tempos 4-24 horas (**gráfico 18A**), esses mesmos grupos similarmente apresentaram redução no consumo de ração quando comparado com o grupo controle e com os demais grupos entre os tempos 6 e 24 horas (**gráfico 18B**) após a administração do tratamento.

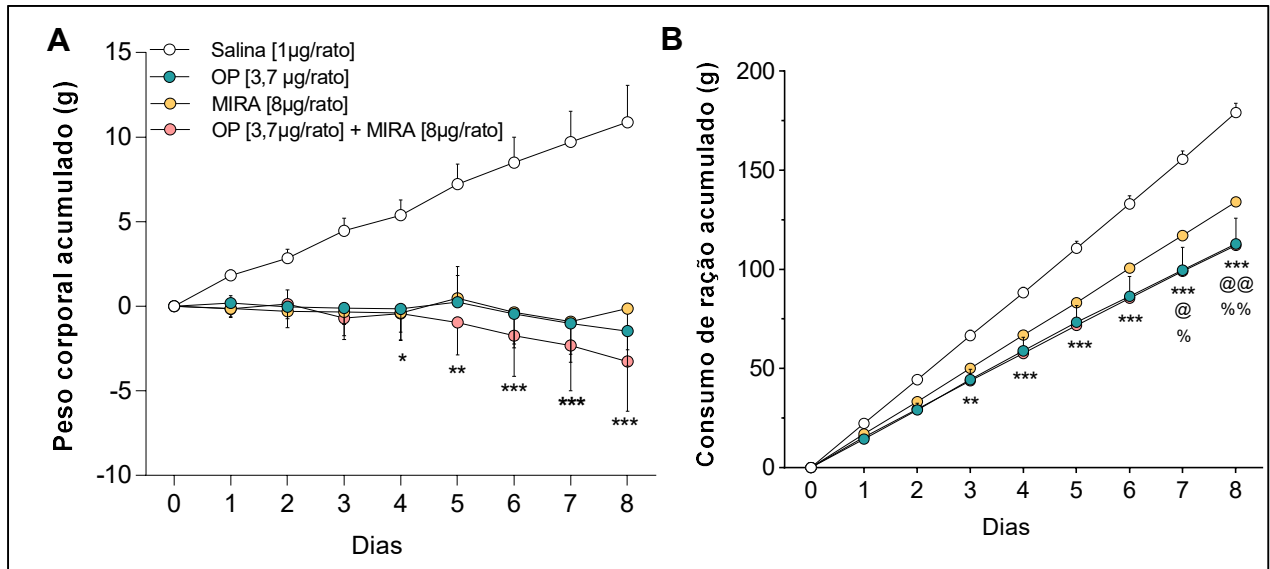
Figura 18. Efeitos da administração central, via intracerebroventricular, de diferentes doses de mirabegrona sobre o peso e consumo acumulados em ratos privados de alimentos durante 24 horas.



A. Efeito dose-dependente da administração oral de Mirabegrona nas doses de 1.6, 4.0, 8.0 e 16.0 µg/rato sobre o peso acumulado; **B.** Efeito dose-dependente da administração oral de Mirabegrona nas doses de 1.6, 4.0, 8.0 e 16.0 µg/rato sobre o consumo acumulado. Valores expressos como média ± erro-padrão da média, n = 4-5 animais por grupo. Pós teste de Dunnett * DS tratamento vs salina, onde *p<0,05, **<0,001, ***p<0,0001. Legenda: MIRA=mirabegrona

Assim como no tratamento periférico, para o tratamento central também é importante destacar os efeitos acumulativos da administração das doses de óleo de peixe e de mirabegrona, bem como de seu uso combinado, os animais foram tratados por um período de 8 dias, com intervalo de administração de 24 horas, com as doses cujos efeitos foram mais significativos, assim para o óleo de peixe a dose escolhida foi 3,7 µg/rato e para mirabegrona foi 8 µg/rato, por mais que a redução do peso tenha sido significativa para o grupo 16 µg/rato, houve óbito neste mesmo, o que nos levou a optar pelo tratamento contínuo com o grupo 8 µg/rato. Em relação ao tratamento contínuo, no 4º dia os grupos MIRA e OP+MIRA reduziram o peso significativamente em relação aos demais grupos, do 5-8º dia todos os grupos reduziram o ganho de peso em relação ao grupo controle, e não foi observado redução significativa entre os três grupos tratados. Em relação ao consumo, a partir do 3º dia todos os grupos apresentaram redução significativa em relação ao controle, e no 7º e 8º dia os grupos OP e OP+MIRA tem redução significativa em relação ao grupo MIRA (**gráfico 19A-B**).

Figura 19: Efeito da administração central, via intracerebroventricular, consecutiva de óleo de peixe e/ou mirabegrona reduz o ganho de peso corporal em ratos tratados por 8 dias.

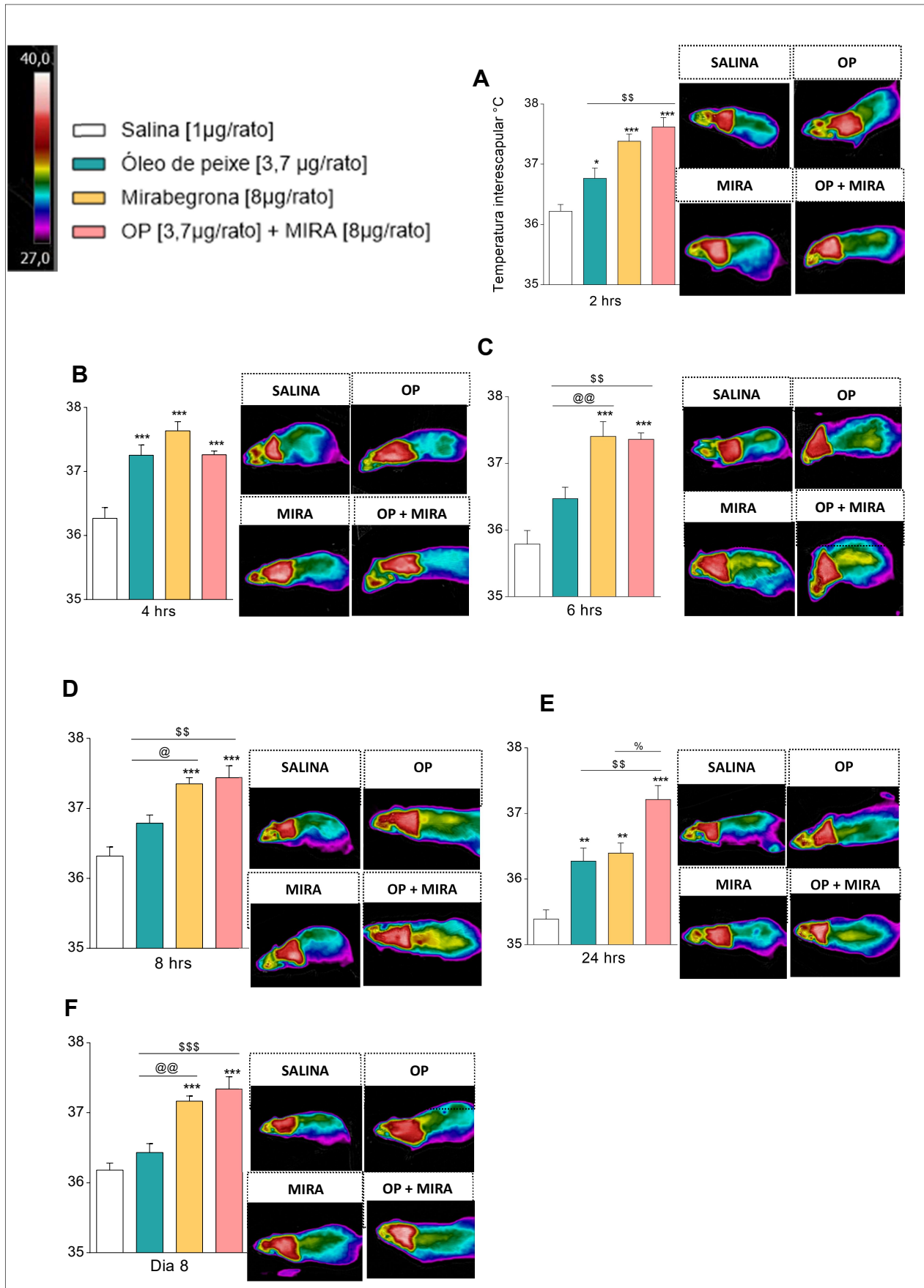


A. Efeito da administração oral de óleo de peixe e/ou mirabegrona nas dose de 3,7µg/rato e 8µg/rato por 8 dias consecutivos sobre o peso acumulado. **B.** Efeito da administração oral de óleo de peixe e/ou mirabegrona nas dose de 3,7µg/rato e 8µg/rato por 8 dias consecutivos sobre o consumo acumulado. . Valores expressos como média ± erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. Pós teste de Tykey. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde *p<0,05, **<0,001, ***p<0,0001.

5.6 Avaliação da temperatura interescapular dos animais tratados via intracerebroventricular

Dados resultados positivos, com redução do ganho de peso e consumo, foram capturadas fotos térmicas da região interescapular dos animais nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 e no 8º dia, a fim de estabelecer uma relação entre o aumento de temperatura e o tratamento proposto. De modo semelhante ao tratamento periférico, os grupos MIRA e OP+MIRA apresentaram temperatura superior aos demais tratamentos em todos os tempos avaliados (**figura 20**), estes dois grupos mostram médias de temperatura bastante próximas e apenas nos tempo 4-6 horas a temperatura do grupo MIRA ultrapassou os valores obtidos no grupo OP+MIRA (**gráfico 20B-C**). A temperatura do grupo OP foi inferior a dos demais tratamentos, porém maior que o grupo salina.

Figura 20: Efeito da administração central, via intracerebroventricular, consecutiva de óleo de peixe e/ou mirabegrona sobre a temperatura interescapular em ratos tratados por 8 dias.



Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 9-10$ animais por grupo. Pós teste de Tukey. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

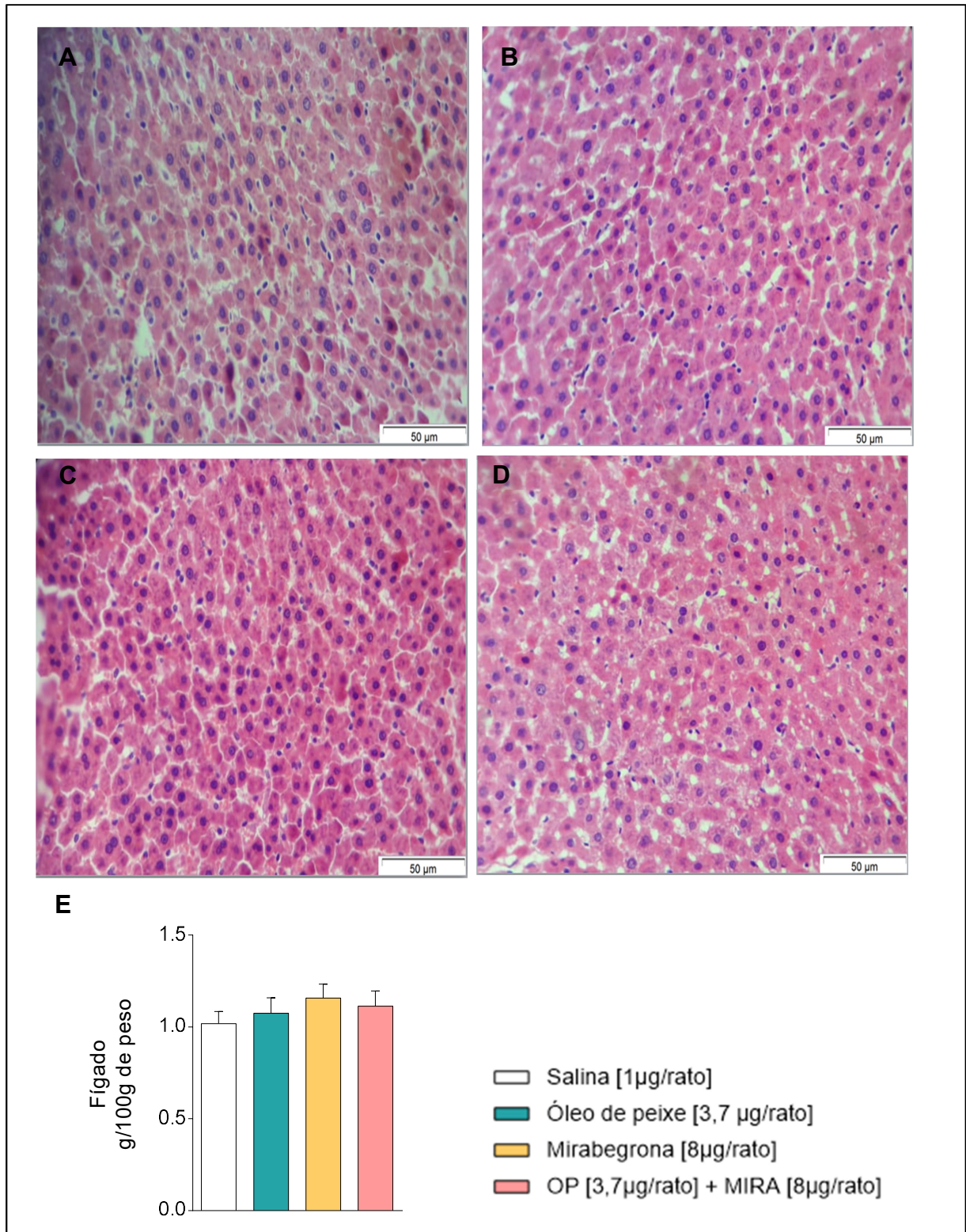
5.7 Parâmetros morfológicos e histológicos: Tratamento intracerebroventricular (ICV)

A figura 20 ilustra a histologia do fígado, onde todos os grupos demonstram semelhanças na apresentação de seus componentes básicos, os hepatócitos, “enfileirados” e organizados em placas que se interconectam. Não houve diferença significativa de peso do fígado entre os grupos tratados, (**Gráfico 21-E**).

A histologia do tecido adiposo marrom (**Figura 22**) para os diferentes tratamentos (Salina, OP, MIRA e OP + MIRA) apresentou característica padrão do tecido com presença de várias pequenas gotículas lipídicas multiloculares localizadas no citoplasma e a presença de muitas mitocôndrias. Os grupos, salina e OP, apresentaram gotículas de gordura visivelmente maiores em relação aos demais tratamentos e em maior quantidade (**Figura 22 A-B**). Não houve diferença significativa de peso do TAM entre os grupos tratados, (**Gráfico 22 E**).

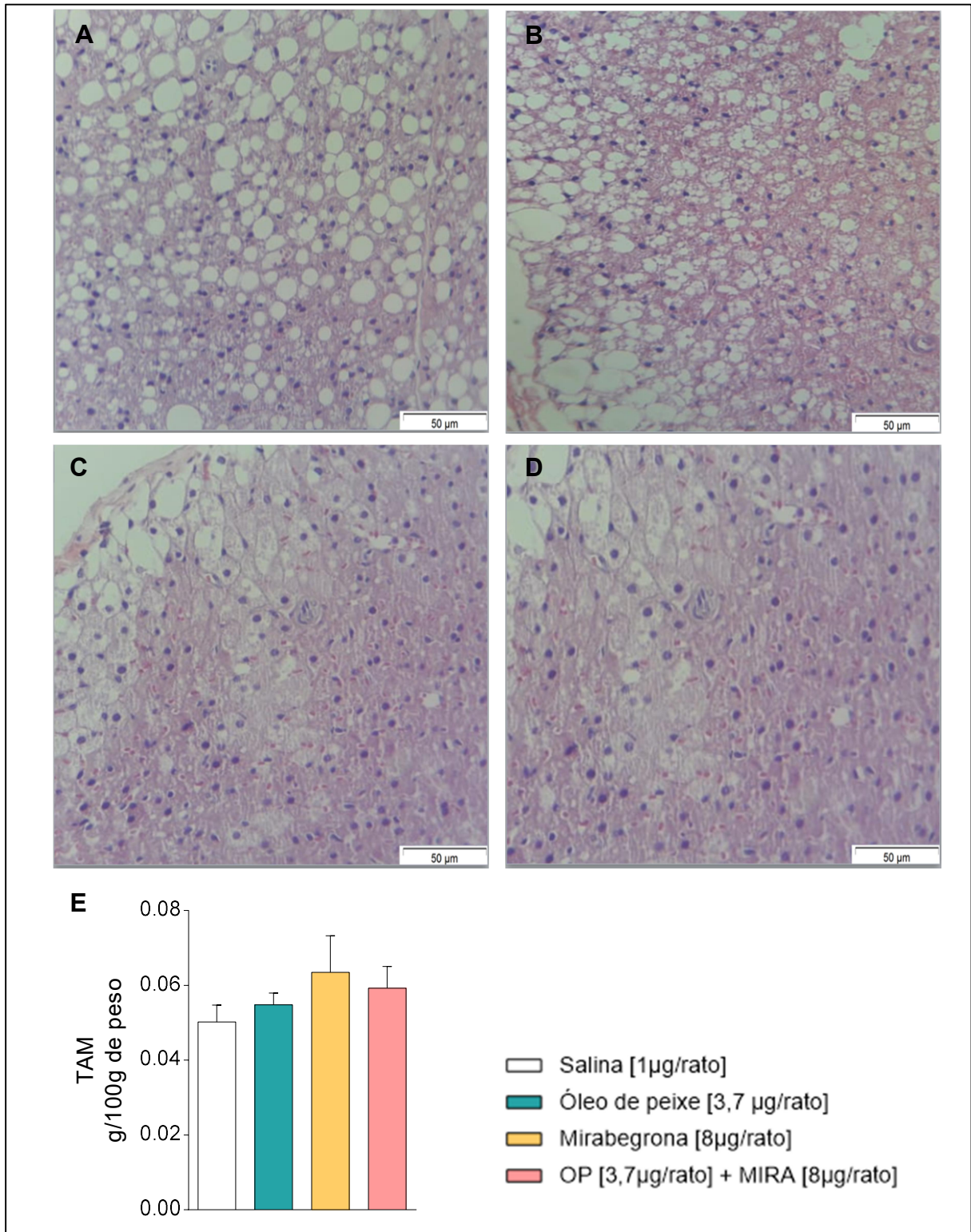
Os estoques de tecido adiposo branco epididimal dos grupos MIRA e OP + MIRA apresentaram-se reduzidos em relação ao tratamento com salina (**Figura 23J**). Os aspectos histológicos observados configuram-se distintos entre os grupos tratados. Enquanto, no grupo salina, os adipócitos obedecem a sua forma esférica característica, núcleo restrito à periferia e apresentando uma grande gotícula lipídica (**Figura 23A**), nos demais grupos há redução da área das gotículas lipídicas em comparação ao grupo salina, (**Figura 23I**). Além disso, a frequência de distribuição da área dos adipócitos segue uma ordem decrescente entre os tratamentos onde, para o grupo salina, a maior parte está entre 1250 e 2750 μm^2 (**Figura 23E**), para o grupo OP, a frequência é maior entre 500 e 1000 μm^2 (**Figura 23F**), para o grupo MIRA, esta entre 400 e 800 μm^2 (**Figura 23G**), e para o grupo OP+MIRA esta entre 400 e 800 μm^2 (**Figura 23H**).

Figura 21: Características histológicas do fígado dos animais após 8 dias de tratamento via intracerebroventricular. Coloração com hematoxilina e eosina.



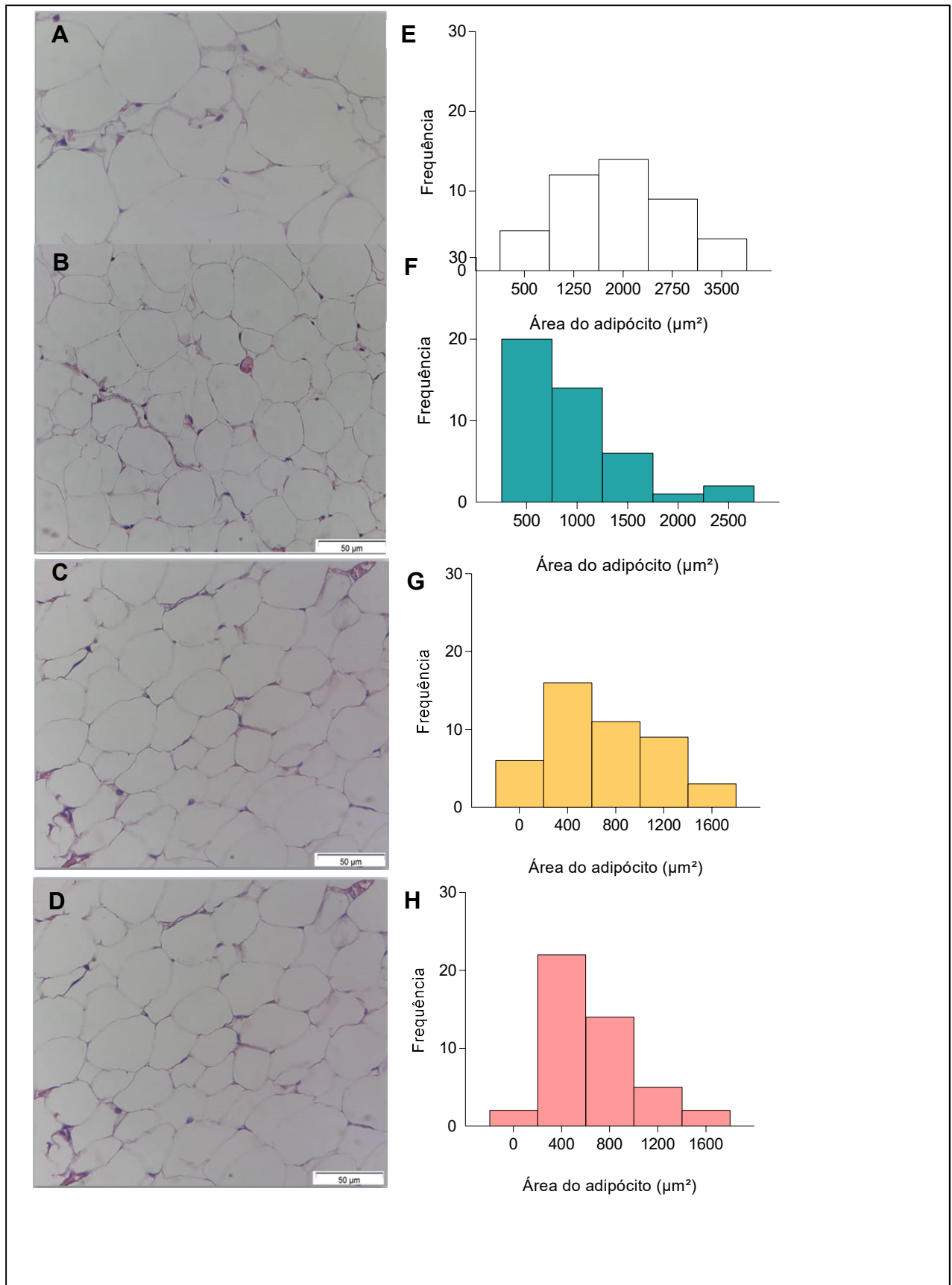
A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Avaliação dos estoques de Fígado no protocolo de 8 dias. . Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. Pós teste de Dunnett.

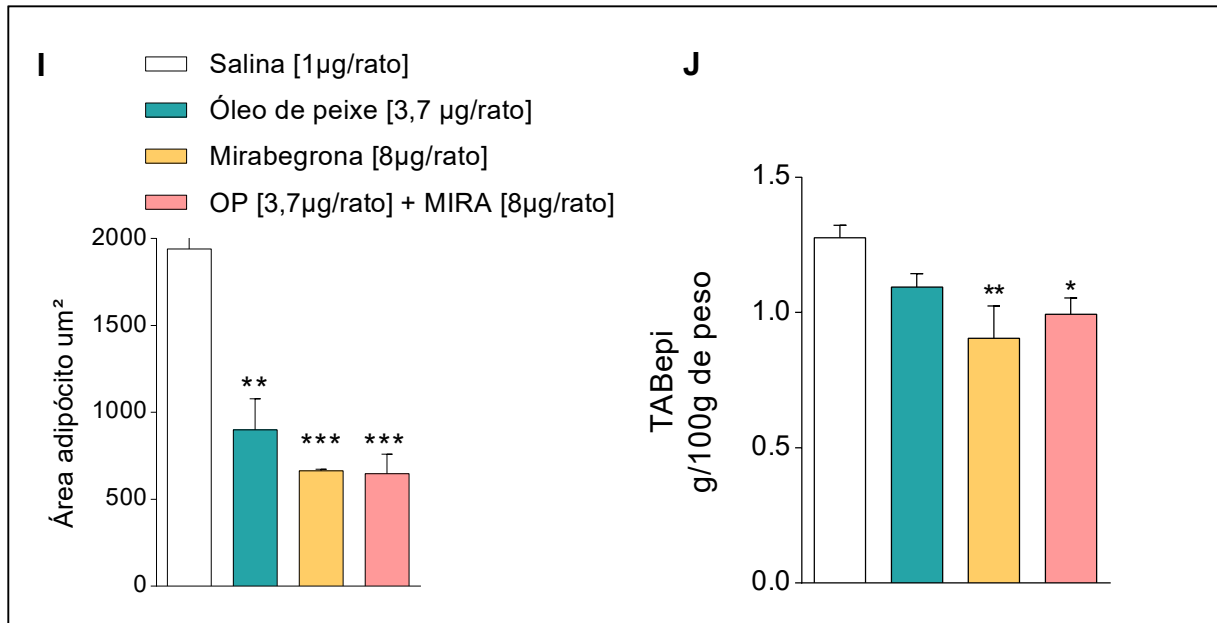
Figura 22: Características histológicas do tecido adiposo marrom dos animais após 8 dias de tratamento via intracerebroventricular. Coloração com hematoxilina e eosina.



A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Avaliação dos estoques de Tecido adiposo marrom no protocolo de 8 dias. . Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. Pós teste de Dunnett.

Figura 23: Características histológicas e avaliação dos estoques do tecido adiposo branco epididimal dos animais após 8 dias de tratamento via intracerebroventricular. Coloração com hematoxilina e eosina





A. Grupo salina, **B.** Grupo óleo de peixe, **C.** Grupo mirabegrona, **D.** Grupo óleo de peixe + mirabegrona. **E.** Frequência adipócitos grupo salina, **F.** Frequência adipócitos grupo OP, **G.** Frequência adipócitos grupo MIRA, **H.** Frequência adipócitos grupo OP + MIRA, **I.** Área dos adipócitos, **J.** Peso do TABepi para os diferentes tratamentos. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 4-5$ animais por grupo. Pós teste de Dunnett. * DS tratamento vs salina, onde $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$. Legenda: TABepi=Tecido adiposo branco epididimal.

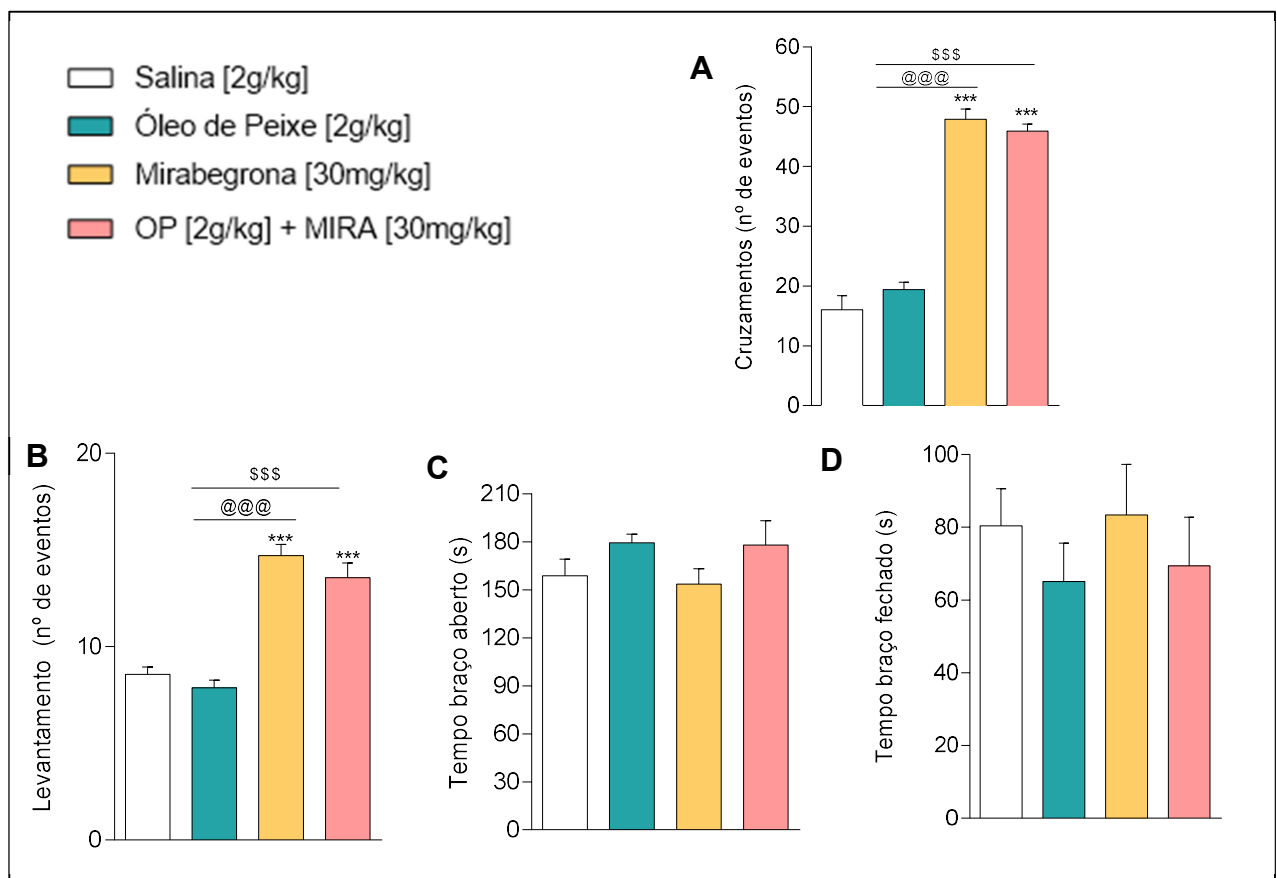
5.8 Avaliação da atividade locomotora: Teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado

A fim de observar a hiperatividade dos animais, em resposta ao tratamento, os mesmos foram avaliados quando expostos a um ambiente com contexto neutro (campo aberto) ou quando expostos a um ambiente ameaçador (labirinto em cruz elevado). No campo aberto foi contada a quantidade de cruzamentos entre um quadrante e outro, a contagem foi a partir da movimentação de 3 ou 4 patas do animal para um quadrante distinto, e o número de vezes que o animal ficava em pé sobre suas 2 patas traseiras (levantamento). A mobilidade dos animais do grupo MIRA e OP+MIRA, tanto para cruzamento quanto para levantamento, aumenta significativamente em relação aos outros grupos, já entre os grupos controle e óleo de peixe não há diferença significativa (**Figura 24A-B**).

O teste labirinto em cruz elevado demonstra a relação de conflito entre a tendência natural de explorar um novo ambiente e sua relutância em se expor em território aberto no qual o risco de quedas e predadores é maior, nesse sentido comparamos o tempo de permanência nos braços abertos e fechados dos animais,

como consequência, podemos analisar a atividade motora dos animais para desenvolver a mesma tarefa. Os gráficos **24C-D** demonstram que o tempo de permanência dos animais foi maior no braço aberto, e que não houve diferença significativa de permanência entre os grupos nos braços abertos e fechados.

Figura 24: Efeito da administração oral de óleo de peixe e/ou mirabegrona sobre a atividade locomotora avaliada em animais.



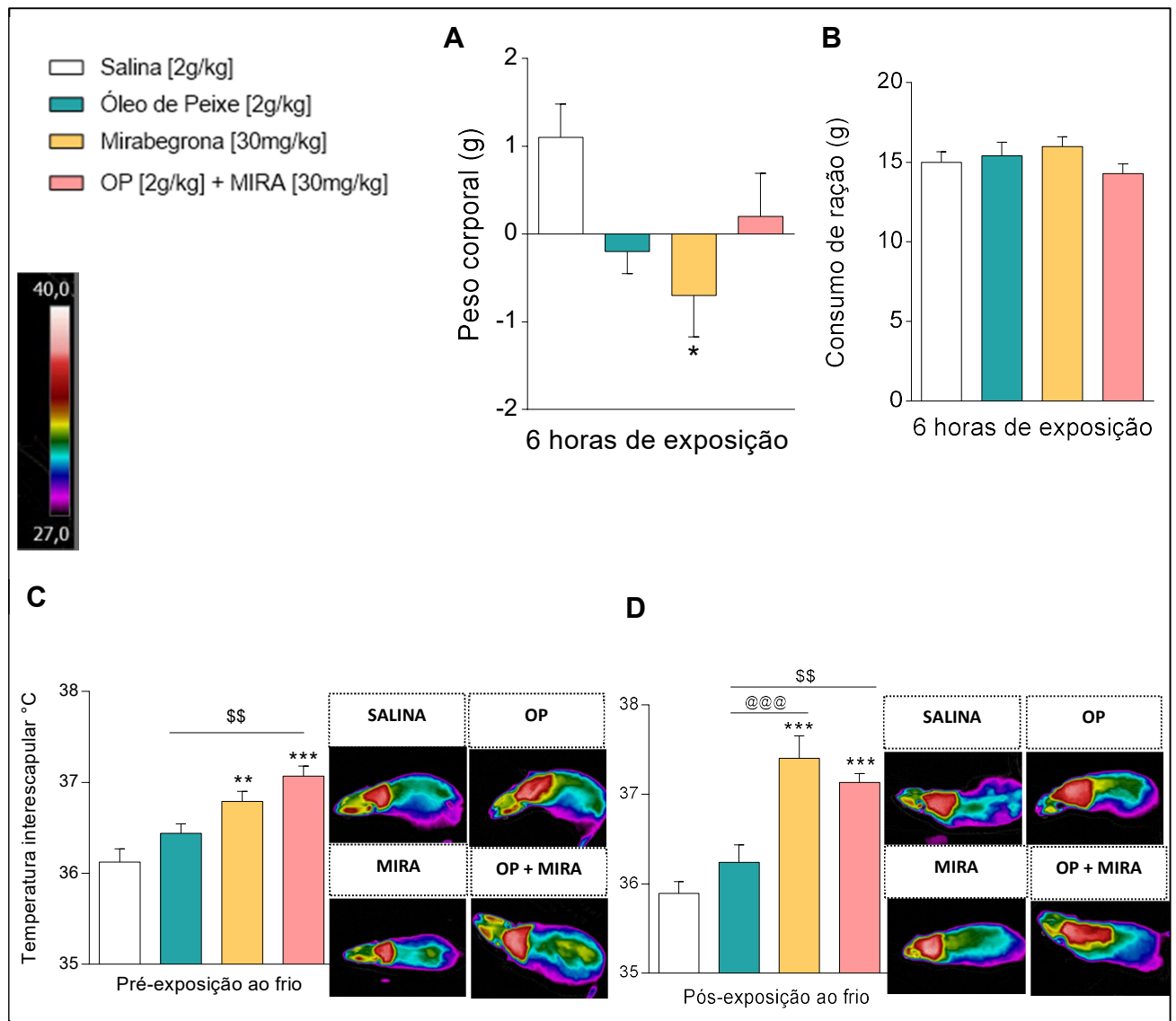
A, Atividade horizontal em campo aberto avaliando o número de cruzamentos entra os quadrantes **B**, Atividade horizontal em campo aberto avaliando o número de levantamentos sobre as patas trazeiras dos animais **C**, Atividade locomotora em labirinto em cruz elevado (tempo braço aberto). **D**, Atividade locomotora em labirinto em cruz elevado (tempo braço fechado). Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 9-10 animais por grupo. Pós teste de Tukey. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde * $p < 0,05$, ** $< 0,001$, *** $p < 0,0001$.

5.9 Influência da temperatura ambiente sobre as respostas metabólicas

Considerando que fatores ambientais como, por exemplo, as temperaturas, influenciam o comportamento, estresse e bem-estar, bem como as adaptações

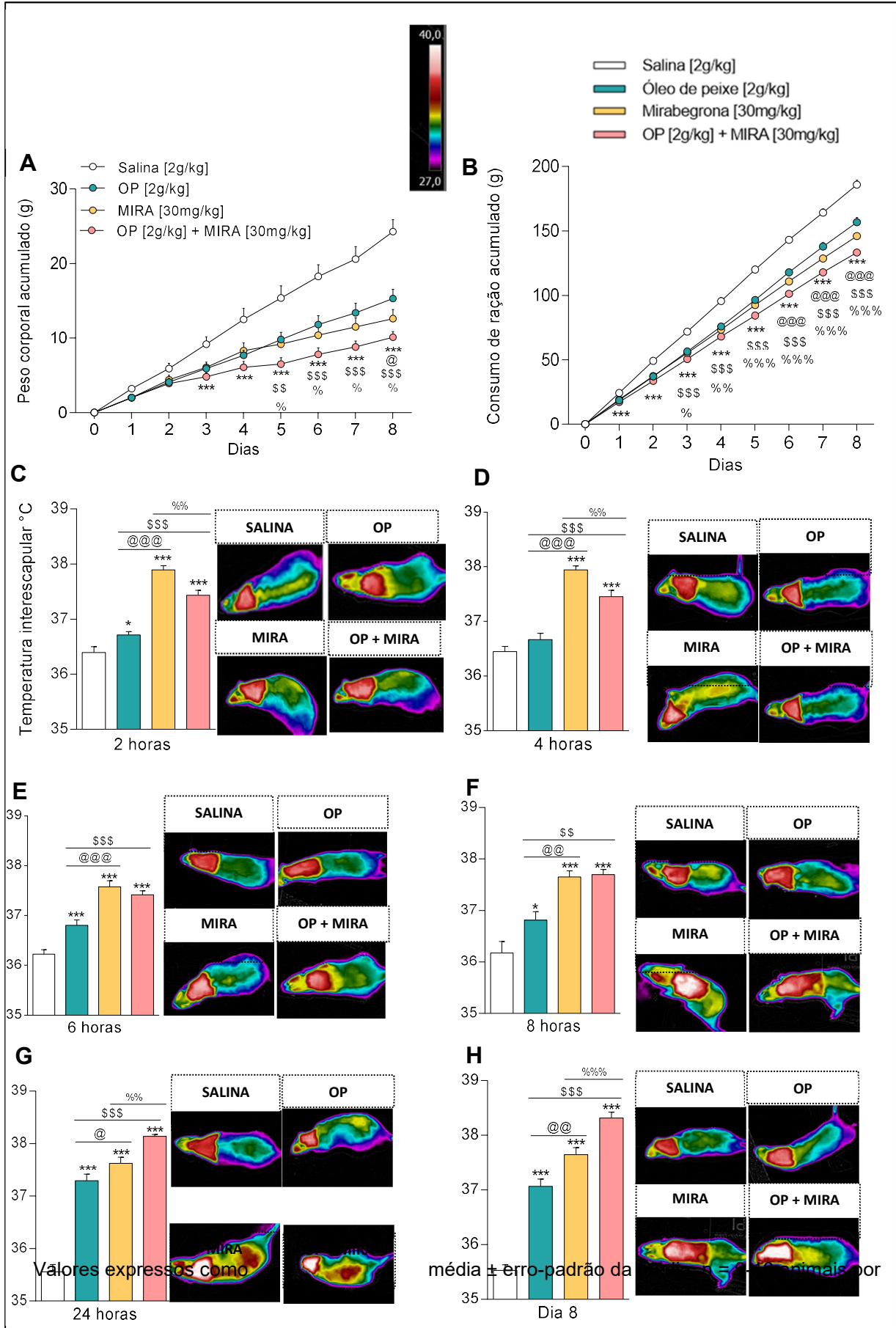
sofridas pelas espécies vivas, avaliou-se as variações de temperatura produzidas pelos animais fora da sua zona de conforto térmico, ou seja, quando expostos ao frio (4-10°C) ou quando expostos ao calor (27-30°C). O protocolo seguiu-se com exposição em um período de 6 horas, em relação ao peso e consumo durante esse período, não houve variações significativas, com exceção do peso dos animais do grupo MIRA em relação ao grupo salina (**Figura 25**). Foram registradas fotos da região interescapular dos animais antes da exposição ao frio (40 min após o tratamento), os grupos MIRA e OP+MIRA tiveram temperaturas significativamente maiores que os grupos salina e OP (**Figura 25C**), de modo semelhante após o período de exposição, os grupos MIRA e OP+MIRA tiveram temperaturas maiores em relação aos demais tratamentos (**Figura 25D**). Os grupos, salina, OP e OP+MIRA mantiveram temperaturas semelhantes antes e após a exposição já o grupo MIRA apresentou suas temperaturas aumentadas. No protocolo de exposição ao calor (**Figura 26**) os animais foram previamente adaptados ao ambiente e nos parâmetros observados o grupo associado OP+MIRA houve redução no ganho de peso corporal e do consumo de ração significativamente menor em relação aos outros grupos (**Gráfico 26A-B**). A partir de 6 horas o grupo OP aumentou sua temperatura significativamente em relação ao grupo salina (**Gráfico 26E-H**) entre 2 e 6 horas o grupo MIRA manteve sua temperatura significativamente maior que os outros grupos (**Gráfico 26C-D-E**), já em 24 horas e no 8° dia a associação entre OP+MIRA teve temperatura significativamente maior que os demais grupos (**Gráfico 26G-H**).

Figura 25: Efeito da exposição ao frio sobre a termorregulação produzidas por animais expostos por um tempo de 6 horas ao frio intenso.



A. variação do peso dos animais durante a exposição ao frio. **B.** consumo dos animais durante a exposição ao frio. **C.** temperatura interescapular dos animais antes da exposição ao frio. **D.** temperatura interescapular dos animais pós-exposição ao frio. Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, $n = 9-10$ animais por grupo. Pós teste de Tukey. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Figura 26: Efeito da exposição ao calor sobre peso, consumo e termorregulação produzidas por animais expostos por um período de 8 dias ao calor excessivo.



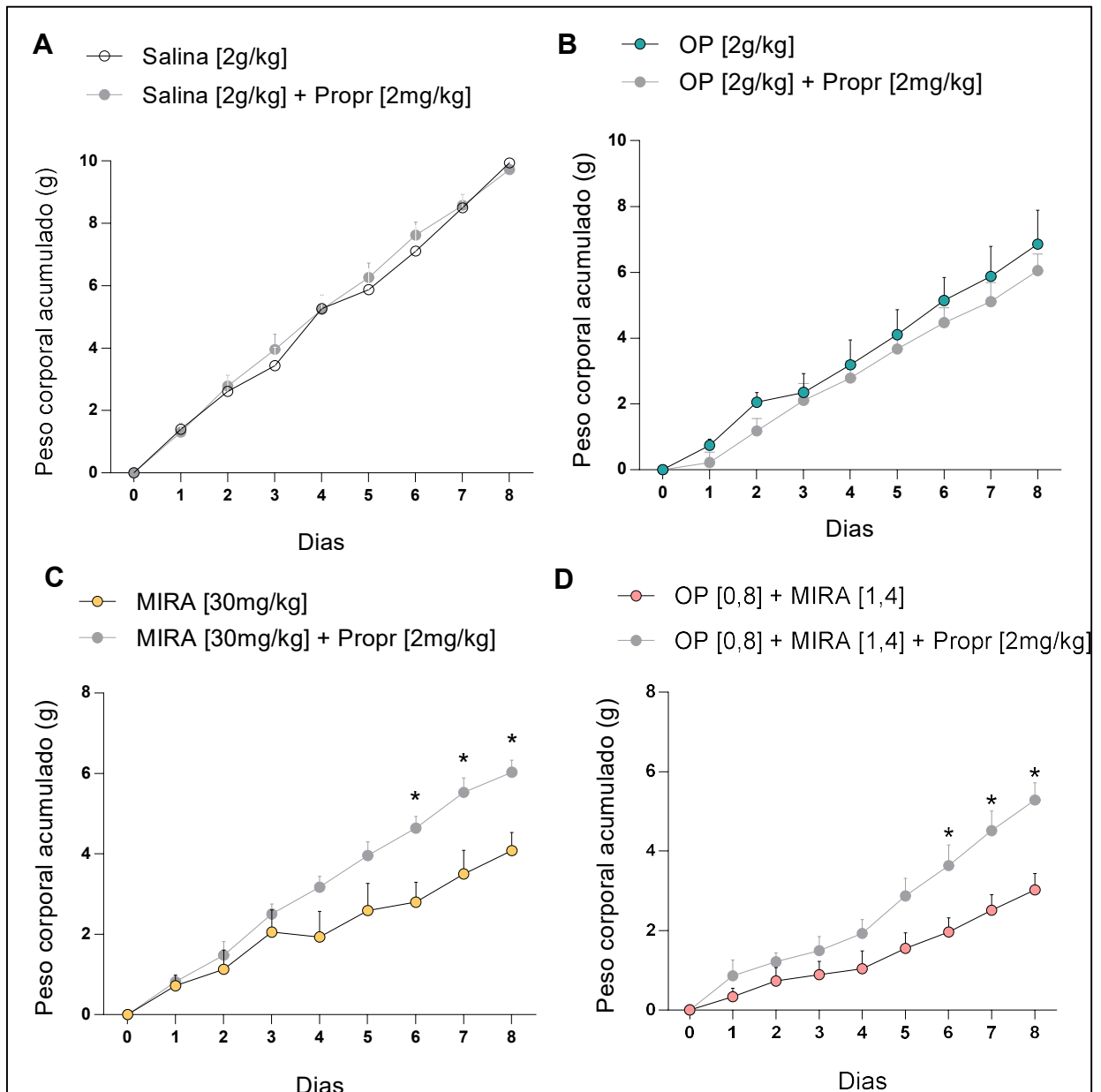
grupo. Pós teste de Tukey. * DS tratamento vs salina, @ DS OP vs MIRA, \$ DS OP vs OP+MIRA, % DS MIRA vs OP+MIRA, onde * $p < 0,05$, ** $< 0,001$, *** $p < 0,0001$.

5.10 Avaliação da administração da Mirabegrona e/ou Óleo de peixe em associação com o propranolol sobre o ganho de peso corporal e consumo de ração

A termogênese em TAM e TAB é regulada principalmente pelo sistema nervoso simpático, os agentes bloqueadores desse sistema são fármacos capazes de inibir a transmissão adrenérgica, em qualquer ponto, desde o sistema nervoso central até a célula efetora encontrada na periferia. Esses compostos podem ser classificados de acordo com o local onde ocorre a inibição do sistema simpático. Sendo assim, existem compostos que agem essencialmente no SNC, os agonistas dos receptores alfa-2, os bloqueadores dos receptores adrenérgicos nos gânglios (ganglioplérgicos) e neurônios pós-ganglionares, os que bloqueiam o fluxo simpático na periferia, e finalmente os antagonistas dos receptores beta, que agem tanto no SNC como na periferia.

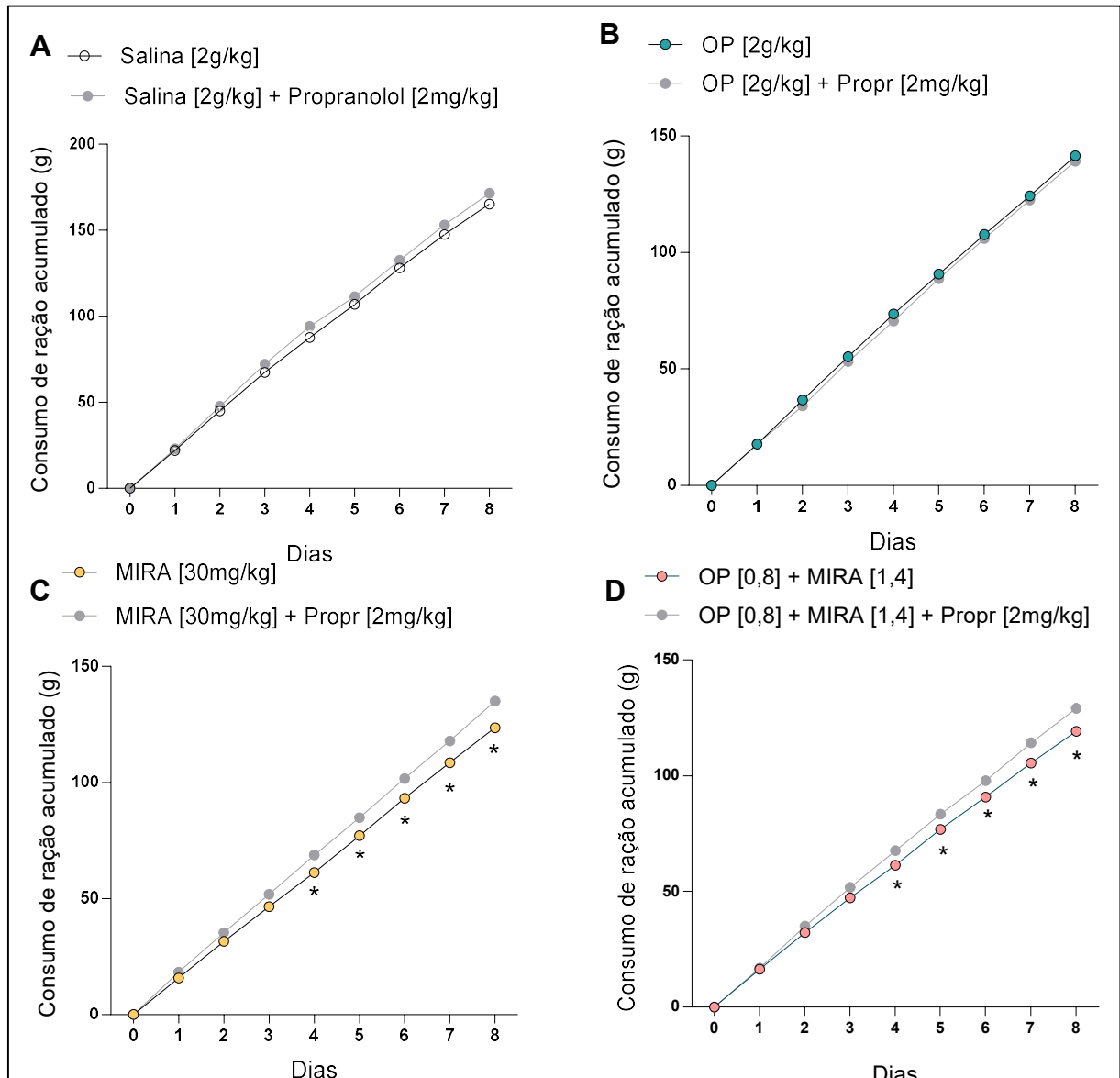
O propranolol é o protótipo da classe dos beta-bloqueadores e é inespecífico para os subtipos de receptores beta. Sendo assim em um primeiro momento buscamos avaliar a influência do sistema simpático no tratamento com OP e MIRA através do bloqueio utilizando essa droga. Os resultados para o ganho de peso e consumo acumulado demonstraram que propranolol administrado sistematicamente reduz a resposta à MIRA e a associação OP + MIRA (**Gráfico 27C-D**) e (**Gráfico 28C-D**) porém não demonstrou interferir no efeito do tratamento com salina e OP (**Gráfico 27A-B**) e (**Gráfico 28A-B**)

Figura 27: Efeito da administração da mirabegrona e/ou do óleo de peixe associado ao propranolol sobre o ganho de peso corporal acumulado em animais tratados por um período de 8 dias.



A. Efeito da administração oral de salina (2g/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg) administrado via intraperitoneal. **B.** Efeito da administração oral de OP (2g/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg). **C.** Efeito da administração oral de MIRA (30 mg/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg). **D.** Efeito da administração oral de salina (2g/kg) em relação a sua associação com OP+MIRA (2mg/kg). Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 7-8 animais por grupo. Pós teste de Dunnett. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Figura 28: Efeito da administração da mirabegrona e/ou do óleo de peixe associado ao propranolol sobre o ganho de consumo acumulado em animais tratados por um período de 8 dias.

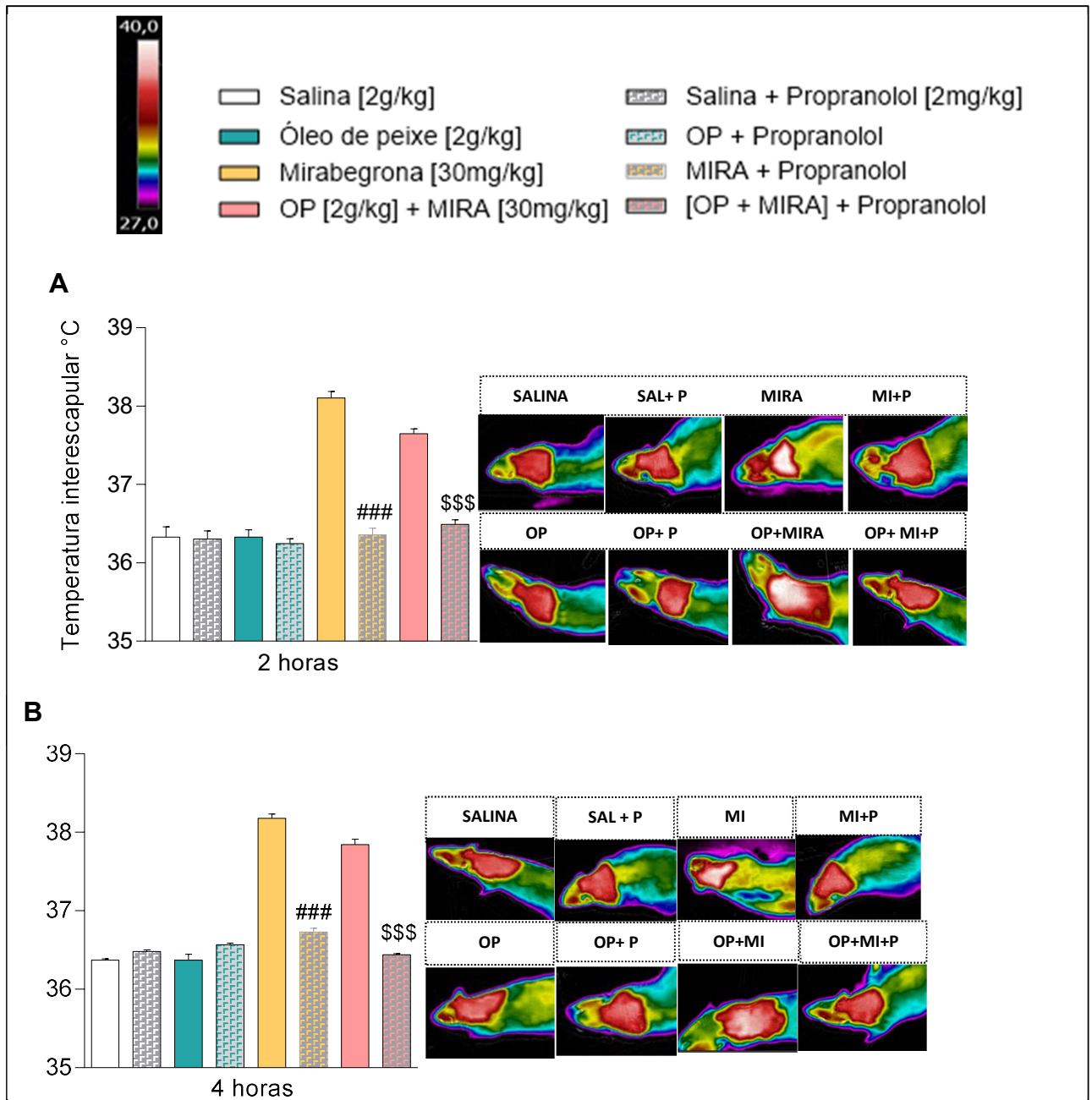


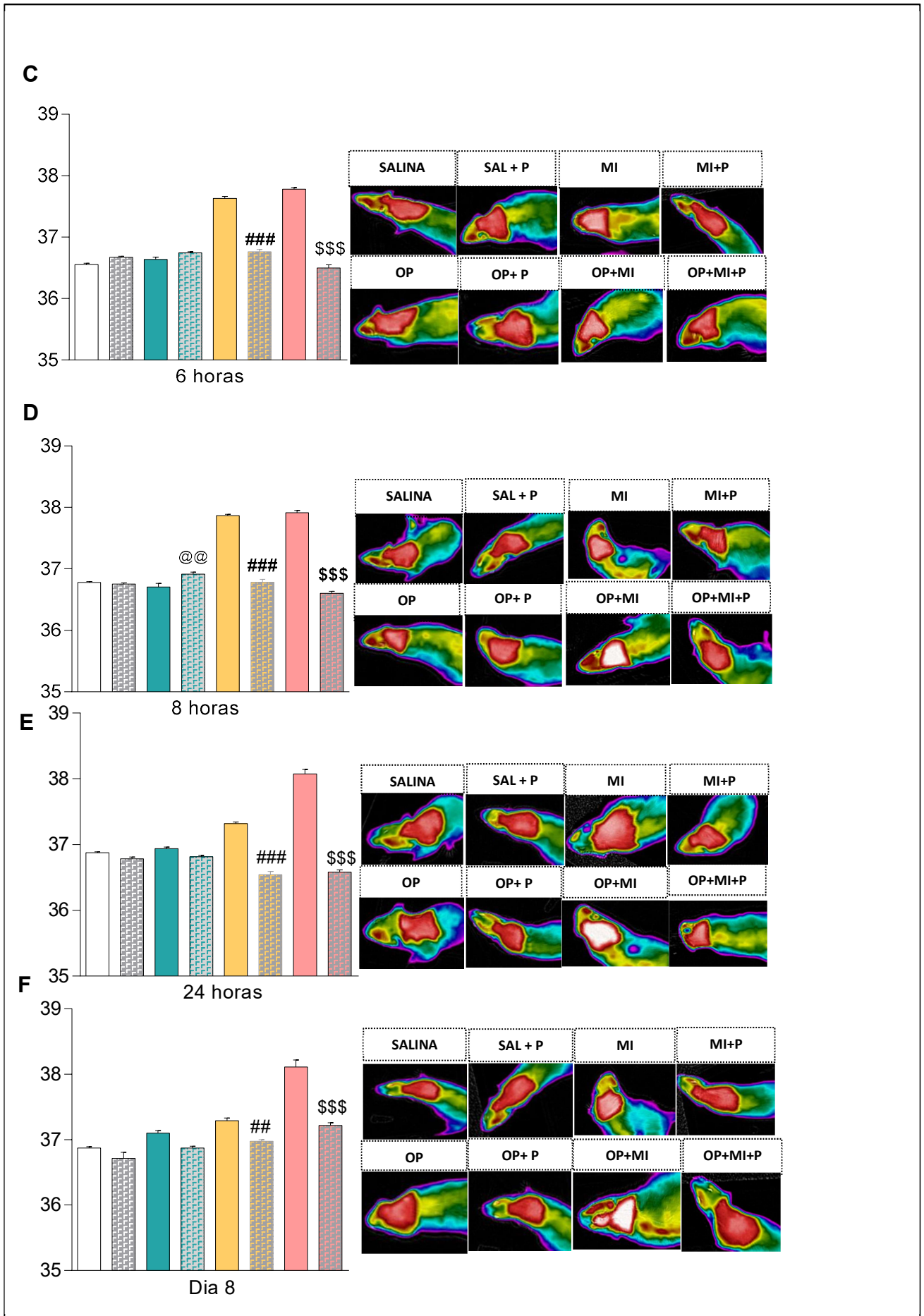
A. Efeito da administração oral de salina (2g/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg) administrado via intraperitoneal. **B.** Efeito da administração oral de OP (2g/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg). **C.** Efeito da administração oral de MIRA (30 mg/kg) em relação a sua associação com propranolol (2mg/kg). **D.** Efeito da administração oral de salina (2g/kg) em relação a sua associação com OP+MIRA (2mg/kg). Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 7-8 animais por grupo. Pós teste de Dunnett. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $< 0,001$, *** $p < 0,000$.

Para estudar a influência do propranolol sobre a termogênese facultativa foi capturada fotos térmicas da região interescapular dos animais nos tempos 2, 4, 6, 8, 24 horas e no 8º (oitavo) dia (**Figura 29**), em todos os tempos foi possível observar a inibição dos efeitos do tratamento com MIRA e OP+ MIRA ao ser administrado juntamente com o propranolol, pois há significativa redução da temperatura

interescapular registrada em relação aos tratamentos isolados. Para os grupos salina e OP não foi observado diferenças significativas quando administradas juntamente com o propranolol.

Figura 29: Efeito da administração intraperitoneal de propranolol sobre as alterações na temperatura interescapular induzida pelo tratamento com OP e / ou MIRA.

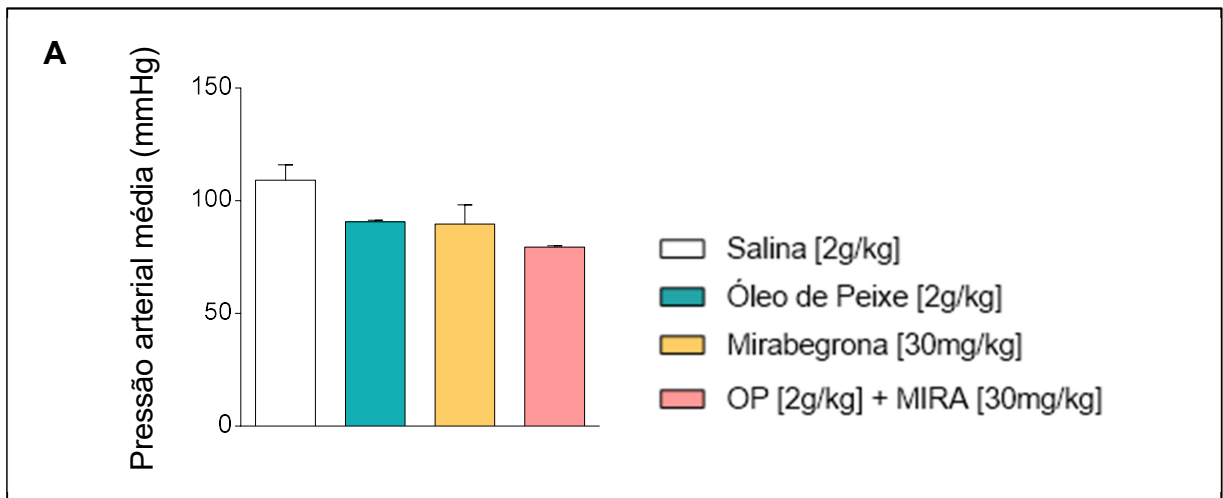




Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 7-8 animais por grupo. Pós teste de Tukey. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,000$. * DS salina vs salina + PROP, @ DS OP vs OP+PROP, # DS MIRA vs MIRA + PROP, \$ DS OP+MIRA vs OP+MIRA + PROP, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

5.11 Avaliação da pressão arterial média

Figura 30: Pressão arterial média, por medida indireta, dos quatro grupos tratados e os respectivos valores após tratamento com o β -bloqueador (propranolol).



Valores expressos como média \pm erro-padrão da média, n = 3-4 animais por grupo. Pós teste de Dunnett. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,000$. * DS tratamento vs salina, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,000$.

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos com OP e MIRA, sobre a pressão arterial média, foi realizado protocolo de plestimografia de calda após 8 dias de tratamento por gavagem (Salina, OP, MIRA e OP+MIRA), com isso foi constatado a inexistência de diferença significativa entre os valores de pressão arterial média dos diferentes grupos (**Figura 30A**).

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliado a associação entre óleo de peixe, que contém ligantes do PPAR, e a mirabegrona, um agonista pleno dos receptores β 3-adrenérgicos, sobre o balanço energético. Os principais resultados apontam para um sinergismo não competitivo, no qual as duas substâncias estimulam receptores distintos, mas que contribuem para um mesmo efeito. A administração crônica por via oral revelou que a associação do tratamento com OP + MIRA foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal, o consumo de ração acumulado e elevar a temperatura interescapular dos animais de forma significativa em relação a seus tratamentos isolados. Ainda para este tratamento observou-se aumento significativo da expressão de receptores β -3 adrenérgicos, UCP1 e LPL no tecido adiposo epididimal e redução do fator adipogênico PPAR γ . O tratamento crônico de OP + MIRA por via intracerebroventricular foi capaz de promover redução significativa no consumo de ração e aumento significativo da temperatura interescapular em relação aos tratamentos OP e MIRA isolados.

No estudo dose-resposta para o tratamento por via oral, as doses de 2.0 g/kg de OP e 30mg/kg de MIRA, foram capazes de promover redução significativamente maior do ganho de peso corporal e consumo de ração acumulado em relação ao tratamento com salina. Ao longo dos 8 dias de tratamento foi observado redução do ganho peso corporal e consumo acumulado dos grupos OP, MIRA e OP+MIRA em relação ao grupo salina, do mesmo modo o grupo de tratamento associado (OP+MIRA) teve redução significativamente maior que seus tratamentos isolados. As alterações de peso promovem remodelamento na morfologia e função dos adipócitos brancos, podendo expandir o tamanho do adipócito (hipertrofia) e o número de adipócitos (hiperplasia) para armazenar um excedente de energia (PARLEE S.D., et al., 2014). No entanto o TAB pode ser remodelado sob várias condições fisiológicas, farmacológicas e nutricionais e expressar um fenótipo mais oxidativo semelhante ao TAM, incluindo a presença de UCP1 (LEE, MOTTILLO e GRANNEMAN, 2014).

O tratamento por via oral com MIRA e OP+MIRA apresentou redução da massa total de tecido adiposo branco significativamente maior que o grupo salina e convenientemente redução significativamente maior, para os três tratamentos em relação ao grupo salina, da área média dos adipócitos. A frequência de distribuição

da área dos adipócitos do grupo salina foi maior entre 1400-2600 μm^2 , em relação aos demais tratamentos, onde para o OP a maior frequência estava entre 700-1200 μm^2 , para a MIRA a maior frequência estava entre 800 μm^2 e para o tratamento OP+MIRA a maior frequência estava entre 600-900 μm^2 . Esses dados sugerem que, a redução do ganho de peso corporal, consumo de ração, massa gordura epididimal bem como da área dos adipócitos, podem ser decorrentes do aumento da lipase lipoprotéica (LPL), a qual demonstrou-se significativamente aumentada no grupo OP+MIRA, a LPL recruta os lipídios necessários para a combustão mitocondrial nos adipócitos (GOMEZ, CALVO, OBREGON, 2008), sugerindo que a LPL poderia contribuir para o aumento do gasto energético ou mobilização lipídica em nosso modelo. A lipólise, tal qual a termogênese facultativa, é controlada pela sinalização adrenérgica (HAMPTON, MELVIN and ANDREWS, 2013). O gene do receptor ADRB3 apresentou padrão de expressão significativamente aumentado para o tratamento OP+MIRA em relação aos demais tratamentos. A ativação desses receptores, que estão acoplados à proteína Gs estimulatória, resulta em elevação dos níveis de cAMP intracelular e ativação da proteína cinase dependente de cAMP (PKA), esta é responsável pela expressão de UCP1 em adipócitos (COLLINS, SHNAIDMAN and WANG, 2010), desse modo o aumento da expressão de ADRB3 no tratamento OP+MIRA foi capaz de aumentar a transcrição do gene UCP1 de forma semelhante para este tratamento.

O adipócito integra informações importantes sobre as necessidades metabólicas, a fim de equilibrar armazenamento e gasto de energia (HAN et al., 2017), durante a sinalização β -3 adrenérgica aumentada, há amplificação de cAMP e conseqüentemente de PKA e AMPK, o que gera um ambiente favorável à expressão de UCP1 que através da disponibilização de ácidos graxos pela LPL, desloca este equilíbrio para um ambiente favorável à termogênese adaptativa (ROBIDOUX et al., 2005). O AMPK modula o metabolismo lipídico, promovendo oxidação de ácidos graxos, reduzindo o acúmulo de lipídeos e inibindo a diferenciação de adipócitos, isso ocorre mediante modulação negativa de fatores adipogênicos críticos, como o PPAR γ , que regulam a diferenciação e modificam a morfologia de adipócitos (SEO et al., 2015; JIANG et al., 2019).

Entre as isoformas existentes, o PPAR γ é principalmente ativado por AG livre e expresso predominantemente no tecido adiposo (SIKDER et al., 2018). O aumento da sua expressão esta relacionada a um maior acúmulo de lipídeos, sendo um

regulador primário da adipogênese, um processo pelo qual os pré-adipócitos precursores se diferenciam em adipócitos totalmente maduros, durante esse processo os pré-adipócitos sofrem uma parada no crescimento e iniciam o acúmulo de lipídeos (MARFELLA et al., 2009; CRISTANCHO and LAZAR, 2011; HAN et al., 2017). Sua expressão aumentada ocorre quando há aumento da massa adiposa, obesidade, resistência à insulina e graus variados de esteatose (KRISHNAN et al., 2009). De fato a expressão de PPAR γ estava significativamente reduzida nos três tratamentos comparado ao grupo salina, o que pode estar relacionado à redução da adiposidade, tendo em vista a redução da massa da gordura epididimal bem como do peso corporal acumulado, que pode ser atribuída ao aumento da dissipação de energia.

O tratamento isolado com OP não foi capaz de promover redução significativa da massa de tecido adiposo, porém promoveu redução da área dos adipócitos em relação ao tratamento com salina. O óleo de peixe rico em AGPI n-3 é capaz de reduzir a proteína Mlx, um coativador hetero dimérico da proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos (ChREBP) no fígado de ratos, e também suprimem a atividade do fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1(SREBP1c) ambos são fatores de transcrição que induz genes para a lipogênese *de novo* em resposta ao aumento de glicose e insulina respectivamente (DENTIN et al., 2005; Jump D.B, 2008), além de ser um ligante do PPAR γ , resultando em captação de lipídeos séricos e regulação da expressão de genes envolvidos no processo de oxidação lipídica e aumento da biogênese mitocondrial o que resulta em adipogênese e aumento do gasto energético (LAPLANTE et al., 2007; LEE, MOTTILLO e GRANNEMAN, 2014). Curiosamente a expressão de PPAR γ estava reduzida no tratamento com OP, isso pode ser resultado de um ajuste neuroendócrino mediante redução da área dos adipócitos do TABepi dos animais tratados com OP resultado de um aumento da β -oxidação por ativação de PPAR α , tanto isolado como em associação com MIRA.

É relatado que o óleo de peixe atua na expressão de outros reguladores da termogênese, como o gene ativador da morte celular CIDE-A (Cidea), proliferador de peroxissoma - receptor ativado coativador gama 1 alfa (Pgc1 α) e domínio PR - contendo 16 (Prdm16) (KIM et al., 2016). PPAR α é altamente expresso em TAM e participa da expressão do gene *Prdm16* o que estimula a biogênese mitocondrial, e sua expressão e atividade aumentada fornecem uma densidade muito alta de

mitocôndrias que são encontradas em células de gordura marrom e bege (HONDARES et al., 2011). Além disso, a deleção de *Prdm16* de TAB resulta em perda de habilidade de “escurecimento” nos depósitos subcutâneos após injeção de um agonista β 3-adrenérgico (SEALE, 2008; SPIEGELMAN, 2010). Apesar da origem embriológica distinta do TAM e TAB, pode haver expressão de quantidades não insignificantes de UCP1 em depósitos de TAB, seja em resposta á estimulação β -adrenérgica ou em resposta á estimulação por agonistas PPARs. A base para essa expressão “ectópica” distinta é a presença de quantidades relevantes do gene *Prdm16* no TAB subcutâneo, e de forma menos expressiva no epididimal (SEALE et al., 2008; SEALE P. et al., 201; SUZUKI et al.,2000).

Ahmadian H. et al., 2013 presumiram que embora os agonistas PPAR α induzam a expressão de um “programa genético” termogênico no TAB, o tratamento com seus agonistas plenos, as tiazolidinediona (TZD) favoreçam o surgimento de células bege associada a um aumento do consumo de oxigênio (indicador de termogênese) o que seria potencializado diante da estimulação β 3-adrenérgica em tratamento duplo com o agonista PPAR α . Semelhante aos dados obtidos, a administração de OP foi capaz de, quando administrado em associação com a MIRA, promover redução do ganho de peso e consumo e aumento da temperatura interescapular, significativamente maior que quando administrado isoladamente, além de regular positivamente a expressão de genes relacionados à termogênese facultativa. A intervenção dietética é uma abordagem considerada segura para modular a termogênese nos tecidos marrom/bege em comparação com a ativação direcionada do receptor β 3-adrenérgico, pois, intervenções farmacológicas aumentam o risco de efeitos colaterais (TANIA et al., 2016).

A seletividade da membrana hematoencefálica pode impedir que muitos fármacos administrados sistemicamente alcancem níveis terapêuticos no SNC e exerçam seus efeitos através da ativação direta de receptores centrais (SLAVC et al., 2018). A via intracerebroventricular (ICV) permitiu a administração das substâncias em estudo no terceiro ventrículo cerebral, nesse protocolo demonstrou-se que a administração crônica por 8 dias de OP e MIRA reduziu o ganho de peso corporal e o consumo de ração acumulado e promoveu aumento da temperatura interescapular dos animais em relação ao grupo salina, e quando administrado associado (OP+MIRA) houve menor consumo de ração acumulado em relação a seus tratamentos isolados. Além disso os tratamentos com MIRA e OP+MIRA

apresentaram redução da massa total de tecido adiposo branco significativamente maior que o grupo salina acompanhada de redução significativamente maior, para os três tratamentos em relação ao grupo salina, da área média dos adipócitos. A frequência de distribuição da área dos adipócitos do grupo salina foi maior entre 1250-2750 μm^2 , o que foi maior que os demais tratamentos, onde para o OP a maior frequência estava entre 500-1000 μm^2 , para a MIRA a maior frequência estava entre 400-800 μm^2 e para o tratamento OP+MIRA a maior frequência estava entre 400-800 μm^2 . Esses dados sugerem que, a redução do ganho de peso corporal, consumo de ração, da massa gordura epididimal bem como da área dos adipócitos, podem ser decorrentes da ativação, nos adipócitos, de receptores $\beta 3$ -AR e do aumento da expressão de UCP1 e da termogênese facultativa, com possível aumento na lipólise.

O hipotálamo, através de seus núcleos hipotalâmicos, regula o balanço energético periférico e a termogênese através do SNA, isso envolve vários núcleos hipotalâmicos. O estímulo de termogênese e gasto energético para TAM e TAB ocorrem principalmente pela via simpática, e o receptor mais envolvido nesse processo é o receptor $\beta 3$ -adrenérgico, sendo essa sinalização em adipócitos necessária para ativar a lipólise e a termogênese nos adipócitos branco e marrom respectivamente (BARTNESS; LIU; SHRESTHA; RYU, 2014); a administração direta no SNC repercutiu no aumento da temperatura interescapular dos animais tratados com MIRA e a associação entre OP+MIRA também promoveu aumento da temperatura interescapular significativamente maior que o grupo salina e OP. Além da associação com MIRA o tratamento isolado com OP promoveu aumento da temperatura interescapular dos animais, essa elevação pode ser decorrente da ação direta do OP no núcleo paraventricular, os neurônios desse núcleo são diretamente ativados pelo fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21), sendo esse capaz de promover estimulação simpática central o que resulta em perda de peso e aumento do gasto energético, indicando que o FGF21 central estimula o impulso simpático no TAM e o escurecimento do TAB, o que leva um aumento da termogênese (COSLUN. et al. 2008; DOURIS et al., 2010; OWEN et al., 2014).

A secreção de FGF21, que é um fator hormonal expresso e liberado pelas células marrons e beges (WU et al., 2012), é mediada por um receptor acoplado á proteína G (GPR120) que se liga a ácidos graxos insaturados de cadeia longa e seus derivados (ULVEN et al., 2015). Dados obtidos de amostras de TAM

interescapular e TAB epididimal de animais expostos ao frio (4°C) detectaram aumento da transcrição de GPR120 nesses depósitos quando comparados com as amostras de animais expostos a condições de termoneutralidade (29°C), essa expressão foi observada após as primeiras 24 horas, além disso, houve aumento na indução da expressão de FGF21 além do aumento da expressão de UCP1 em TAM (TANIA et al., 2016). Por ser agonista dos receptores GPR120, o OP, pode promover maior ativação destes receptores que podem estar aumentados em resposta ao frio, de fato o tratamento com OP+MIRA promoveu aumento da temperatura interescapular significativamente maior que o grupo salina, esse aumento pode ser resultado do envolvimento duplo do agonista dos receptores GPR120 que podem estar aumentados e promovendo maior liberação de FGF21 que é responsável por promover maior estímulo simpático para o TAM, juntamente com a ativação β 3-adrenérgica.

A zona de termoneutralidade é uma faixa de temperatura ambiente na qual o animal não sofre estresse pelo frio ou pelo calor, acima da temperatura crítica superior são afetados parâmetros aparentemente não somente relacionados à regulação da temperatura, como por exemplo, a obesidade, tendo em vista essas alterações foi demonstrado que em condições de temperatura crítica superior ocorre a ativação de uma resposta regulatória pelo sistema de termorregulação a fim de alcançar a homeostase térmica (GORDON et al., 2012). Quesada-lopez et al (2016). Demonstraram que acima da temperatura crítica superior, houve regulação negativa da expressão de genes envolvidos na termogênese (UCP1, FGF21, GPR120) em TAM e TAB tal condição foi revertida pela administração de agonista simpático que resultou no aumento desses genes (UCP1, FGF21, GPR120) em TAM e TAB. Visto que a atividade do TAM e TAB tem grande impacto sobre o gasto energético e que estes podem modular-se diante das mudanças na temperatura ambiente nossos dados nos mostram que o tratamento com OP e MIRA promoveram aumento de temperatura interescapular mesmo em temperatura crítica superior, se opondo aos estímulos fisiológicos de adaptação ao meio, e ainda a associação dos tratamentos promove aumento da temperatura significativamente maior que os tratamentos isolados, dando um indício que essas substâncias possuem efeito regulador positivo sobre vias termogênicas.

Durante a tensão provocada pelo teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado, ocorre elevação da temperatura central mediada pela termogênese em TAM (VIANNA & CARRIVE, 2012), assim podemos deduzir quem em situação de estresse ocorre maior ativação do sistema de luta e fuga dos animais, em nossos resultados podemos demonstrar que a utilização de MIRA e da associação de OP+MIRA potencializa a atividade locomotora dos animais provavelmente por estimular a via simpática, sem comprometer a capacidade exploratória desses animais. Desse modo diante do uso de antagonista simpático, o propranolol, a resposta termogênica estaria reduzida (WANG et al., 2006), de fato em nossos resultados a temperatura interescapular dos animais tratados com propranolol foi inferior ao tratamentos com MIRA e OP+MIRA, indicando que o aumento da temperatura está diretamente ligada a estimulação simpática e que esta estimulação é potencializada quando o tratamento é associado ao OP. Também foi possível observar redução do ganho de peso nos animais tratados com MIRA e OP+MIRA em relação aos tratados com o propranolol. Estudos não clínicos mostram que a exposição a altas concentrações de mirabegrona, promove estimulação modesta dos receptores β_1 adrenérgicos com potencial de alterar a pressão arterial média (MARCEL G. et al., 2017). Para explorar o envolvimento dos distintos subtipos de receptores β adrenérgicos para as doses utilizadas de OP e MIRA, foi verificado a pressão arterial dos animais tratados por um período de 8 dias para os quatro tratamentos (Salina, OP, MIRA e OP+MIRA), observou-se não alteração significativa da pressão arterial média entre os grupos, o que sugere que as doses testadas exercem seus efeitos reduzindo o ganho de peso corporal, consumo de ração acumulado, aumento da temperatura interescapular, redução da massa total dos adipócitos brancos bem como da área média dos adipócitos, através da estimulação do receptor β_3 adrenérgico e do PPAR, com pouca ou nenhuma estimulação dos demais receptores simpáticos, o que reduz riscos cardiovasculares.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a administração simultânea de OP e MIRA é responsável por co-estimular vias responsáveis pela expressão de um fenótipo termogênico. Através do tratamento periférico foi possível identificar genes envolvidos nas vias de lipólise, β -oxidação, e ativação β 3-adrenérgica e também infraregulação de PPAR γ o que expressou um remodelamento do tecido adiposo branco epididimal traduzido nas diferenças de frequência de área dos adipócitos. A administração da associação OP+MIRA por via oral apresentou resultados mais significativos, em relação aos demais tratamentos, que por via intracerebroventricular.

Em resumo, os presentes resultados suportam a utilidade de terapias combinadas utilizando agonistas do receptor β 3-adrenérgico e do óleo de peixe para futuras estratégias terapêuticas para prevenir e/ou tratar a desordens metabólicas associadas a um balanço energético positivo.

REFERÊNCIAS

- AHMADIAN H.; et al. PPAR γ signaling and metabolismo: the good, the bad and the future. **Nat Med**. v. 9, n. 5, p. 557-66, 2013.
- AUBOEUF, D.; et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**. V. 46, p. 1319-1327, 1997.
- BARGUT T. C.; et al. Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice. **Food Funct**. v. 7, n. 3, p. 1468–1476, 2016.
- BARQUISSAU, V.; et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. **Molecular Metabolism**. v. 5, n. 5, p. 352–365, 2016.
- BARTNESS, T. J.; et al. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Front Neuroendocrinol**, v, 35, n. 4, p, 473-93, 2014.
- BARTNESS, T.; SONG, C. K. Brain-adipose tissue neural crosstalk. **Physio Behav**, v, 91, n.4, p. 343-51, 2007.
- BERBÉE, J. F. P.; et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. **Nature Communications**. v. 6, n. 6356, P. 1-11, 2015.
- BRAY, G. A.; BELLANGER, T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. **Endocrine**. v. 29, n. 1, p. 109–117, 2006.
- BRUINSTROOP, E.; FLIERS, E.; KALSBECK, A. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolismo via the autonomic nervous system. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 28, n. 5, p. 673- 84, 2014.
- CALMASINI, F. B.; et al. Long-term treatment with the beta-3 adrenoceptor agonist, mirabegron ameliorates detrusor overactivity and restores cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in obese mice. **NeuroUrol Urodyn**. v. 36, n. 6, p. 1511-1518, 2017.
- CÂNDIDO, T. Z. **Caracterização farmacológica do agonista beta-3 adrenérgico, mirabegron em corpo cavernoso de rato e próstata de coelho e humano**. 2015. 85f. Dissertação (mestrado em farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2015.
- CAO, E.; et al. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. **Neuron**, v. 77, n. 4, p. 667–79, 2013.
- CEDIKOVA, M.; et al Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. **Stem Cells Int**. v. 2016, p. 11, 2016.

CHEN, L.; ZHANG, Y. Determination of Mirabegron in rat plasma by UPLC–MS/MS after oral and intravenous administration. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 65, n. 2, p. 141-148, Feb. 2019.

CHERNOGUBOVA, E.; CANNON, B.; BENGTSSON, T. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via β_3 -adrenoceptors through a cAMP, PKA and PI3-Kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p.269-280, 2004.

COSKUN, T.; et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. **Endocrinology** v. 149, n. 12, p. 6018–6027, 2008.

CRESCENZO, R.; et al. Polyunsaturated fatty acids stimulate de novo lipogenesis and improve glucose homeostasis during refeeding with high fat diet. **Front Physiol.** v. 23, n. 8, p. 178, 2017.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 12, n. 11, p. 722–734, 2011.

CRISTINA, C.; et al. Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. **Redox Biol**, v. 12, p. 854-63, 2017.

CYPESS, A. M.; et al. Activation of human brown adipose tissue by a β_3 -adrenergic receptor agonist. **Cell Metab.** v. 6, n. 21, p. 33-8, 2015.

CYPESS, A. M.; et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1509-1517, 2009.

DAVIS, E.; LOIACONO, R; SUMMERS, R. J. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. **Br J Pharmacol.** v. 154, n. 3, p. 584-97, 2008.

DENIS, R. G. A.; et al. Central orchestration of peripheral nutrient partitioning and substrate utilization: implications for the metabolic syndrome. **Diabete Metab.** v. 40, n. 3, p. 191–197, 2014.

DENTIN, R.; et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. **J Clin Invest.** v. 115, n. 10, p. 2843-2854, 2005.

DOURIS, N.; et al. Central fibroblast growth factor 21 browns white fat via sympathetic action in male mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 7, p. 2470–2481, 2015.

FENZL, A.; KIEFER, F. W. Brown fat biology and thermogenesis. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 19, n. 1, p. 25-37, 2014.

FERNÁNDEZ, L. M.; et al., Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, n. 121, v. Pt A, p. 24-41, 2015.

FITZGERALD, P. A. Adrenal medula & paraganglia. In: Gardner, D. G.; Shoback, D. **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. San Francisco: TheMcGraw-Hill Companies, p. 429-432. 2007.

GORDON, C. J. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. **Journal of thermal biology**. v. 37, n. 8, p. 654- 685.

GRYGIEL-GORNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. **Nutrition J**, v. 13, p. 17–27. 2014.

GUAN, H. P.; et al. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. **Genes Dev**, v. 19, n. 4, p. 453-61, 2005.

HAMPTON, M.; MELVIN, R. G.; ANDREWS M. T. Transcriptomic Analysis of Brown Adipose Tissue across the Physiological Extremes of Natural Hibernation. **Plos One**. v. 8, n. 12, p. e85157, 2013.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**. v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.

HELPERN, C. H.; et al. Expanding applications of deep brain stimulation: a potential therapeutic role in obesity and addiction management. **Acta Neurochir**, v, 153, n. 12, p. 2293-306, 2011.

HONDARES, E.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. **J Biol Chem**. v. 286, n. 50, p. 43112-22, 2011.

IITSUKA, H.; et al. Pharmacokinetics of Mirabegron, a β 3-Adrenoceptor Agonist for Treatment of Overactive Bladder, in Healthy East Asian Subjects. **Clin Ther**, v. 37, n. 5, p. 1031-44, 2015.

LAPLANTE, M.; et al. Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR {gamma} agonism in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol**, v. 292, p. R1408-R1417, 2007.

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

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Curr Opin Lipidol**. v. 19, n.3, p. 242-247, 2008.

KAJIMURA S.; SEALE, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional control of brown fat development. **Cell metab**. v. 11, n. 4, p. 257-62, 2010.

KAWABATA, F.; et al. Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 73, n. 12, p. 2690–2697, 2009.

KAWADA, T.; et al. Fish (Bonito) oil supplementation enhances the expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of rat. **J Agric Food Chem.** v. 46, n. 4, p. 1225–1227, 1998.

KIM, H. J.; TAKAHASHI, M.; EZAKI, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. **J Biol Chem.** v. 274, n. 36, p. 25892–25898, 1999.

KIM, K. M.; et al. The effect of Xanthigen on the expression of brown adipose tissue assessed by ¹⁸F-FDG PET. **Yonsei Med J.** v. 57, n. 4, p. 1038–1041, 2016.

KIM, M.; et al. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. **Sci Rep.** v. 5, n. 18013, p. 1-12, 2015.

KIMURA, R.; et al. DHA attenuates postprandial hyperlipidemia via activating PPAR α in intestinal epithelial cells. **J Lipid Res.** v. 54, n. 12, p. 3258–3268, 2013.

KONTUREK, P. C.; et al. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. **J Physio Phamacol,** v. 56, n. 6, p. 5-25, 2005.

KRISHNAN, J.; et al. Activation of a HIF1 α -PPAR- γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. **Cell Metab.** v. 9, n. 6, p. 512–524, 2009.

LEE, Y.; MOTTILLO, E. P.; GRANNEMAN J. G. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1842, n. 3, p. 358–369, 2014.

LÓPEZ, M.; et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. **Nat Med.** v. 16, n. 9, p. 1001-8, 2010.

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

LAPLANTE, M.; et al. Nutraceutical effects of fucoxanthin for obesity and diabetes therapy: a review. **J Oleo Sci.** v. 64, n. 2, p. 125-132, 2015.

MARFELLA, R.; et al. Myocardial lipid accumulation in patients with pressure-overloaded heart and metabolic syndrome. **J Lipid Res,** v. 50, p. 2314-2323, 2009.

MATSUMOTO T.; KIUCHI S.; MURASE T. Synergistic activation of thermogenic adipocytes by a combination of PPAR γ activation, SMAD3 inhibition and adrenergic receptor activation ameliorates metabolic abnormalities in rodents. **Diabetologia.** p. 1-13, 2019.

MUND, R. A.; FRISHMAN, W. H. Brown adipose tissue thermogenesis: β 3 adrenoreceptors as a potential target for the treatment of obesity in humans. **Cardiol Rev.** v. 21, n.6, p. 265-9, 2013.

OHNO, H.; et al. PPAR agonist induce a White-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. **Cell Metab**, v. 15, n. 3, p. 395-404, 2013.

OWEN, B. M.; et al. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. **Cell Metab**. v. 20, n. 4, p. 670–677, 2014.

PARLEE, S. D.; et al. Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. **Methods Enzymol**. v. 537, p. 93–122, 2014.

PETROVIC, N.; et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 10, p. 7153–7164, 2010.

PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H.; SARASWATHI, V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. **J Nutr Biochem**. v. 22, n. 22, p. 101–108, 2011.

QUESADA-LÓPEZ, T.; et al. The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. **Nature Communications**. v. 7, n. 13479, 1-17, 2016.

RICQUIER, D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. **Biochimie**, p. 134:3-8, 2016.

ROBIDOUX, J., W. et al. Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38 MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. **Mol Cell Biol**. v. 25, n. 13, p. 5466– 5479, 2005.

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

SEALE, P.; et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous White adipose tissue in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 1, p. 96-105, 2011.

SEO, M., et al. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation byregulation of MAPK signaling. **J Nutrition Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1308-16, 2015.

SHABALINA, I. G.; et al. UCP1 in brite/beige adipose mitochondria is functionally thermogenic. **Cell Rep**. v. 5, n. 5, p. 1196-203, 2013.

SHAN, T.; et al. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. **J Lipid Res**. v. 54, n. 8, p. 2214–2224, 2013.

SIKDER, K., et al. High Fat Diet Upregulates Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR- γ . **Cell Physiol Biochem**, v. 48, n. 3, p. 1317-31, 2018.

SILVA, C. P. V. **Efeitos do mirabegron, um agonista β_3 adrenérgico seletivo, nas respostas cardiometabólicas de camundongos obesos**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2018.

SILVA, C. P. V. **Efeitos do mirabegron, um agonista β_3 adrenérgico seletivo, nas respostas cardiometabólicas de camundongos obesos**. 2018, Tese (Doutorado em Ciências da Motricidade). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Rio Claro, São Paulo.

SLAVC, I.; et al. Best practices for the use of intracerebrocentricular drug delivery devices. **Mol Genet Metab**. v. 124, n. 3, p. 184-88, 2018.

SONG, N. J.; et al. Induction of thermogenic adipocytes: molecular targets and thermogenic small molecules. **Exp Mol Med**. v. 49, n. 7, p. e353, 2017.

SUI, W.; et al. Bladder drug mirabegron exacerbates atherosclerosis through activation of brown fat-mediated lipolysis. **PNAS**. v. 116, n. 22, 10937-10942, 2019.

SUZUKI, A.; et al. Alteration in expression profiles of a series of diabetes-related genes in db/db mice following treatment with thiazolidinediones. **Jpn J Pharmacol**. v. 84, n. 2, p. p. 113–123, 2000.

TAKUSAGAWA, S.; et al. Absorption, metabolism and excretion of [(14)C] mirabegron (YM178), a potent and selective β_3 -adrenoceptor agonist, after oral administration to healthy male volunteers. **Drug Metab Dispos**. v. 40, n. 4, p. 815-24, 2012.

TORRES, N.; CHABARDÈS, S.; BENABID, A. L. Rationale for hypothalamus-deep brain stimulation in food intake disorders and obesity. **Adv Tech Stand Neurosurg**. V. 36, p. 17-30, 2011.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans**. v. 33, n. Pt 5, p. 1078-81, 2005.

TYAGI, P.; TYAGI, V. Mirabegron, a β_3 -adrenoceptor agonist for the potential treatment of urinary frequency, urinary incontinence or urgency associated with overactive bladder. **IDrugs**. v. 13, n. 10, p. 713-22, 2010.

ULVEN, T.; CHRISTIANSEN, E. Dietary fatty acids and their potential for controlling metabolic diseases through activation of FFA4/GPR120. **Annu Rev Nutr**. v. 35, p. 239–263, p. 2015.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 18, n. 2, p. 158-68, 2007.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, p. 366-442, 2012.

WU, Q.; CLARK, M. S.; PALMITER, R. D. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. **Nature**. v. 483, p. 594–597, 2012

XIE, Y.; DORSKY, R. L. Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. **Development**. v. 1, n. 144, p. 1588-1599, 2017.

YAKABI, K.; et al. Rikkunshito and 5-HT_{2C} receptor antagonist improve cisplatin-induced anorexia via hypothalamic ghrelin interaction. **Regulatory Peptides**. v. 161, n.1-3, p. 97-105, 2010.

YE, L.; Et al. Fat cells directly sense temperature to active thermogenesis. **PNAS**. v. 110, n. 30, p. 12480-5, 2013.

YUNO, K.; et al. Effect of mirabegron on plasma gonadotropic and steroidal hormone levels in rats after two weeks of oral administration. **J Toxicol Sci**. v. 39, n. 3, p. 507-14, 2014.

ZHANG, W.; CLINE, M. A.; GILBERT, E. R. Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. **Nutrition & Metabolism**. v. 11, n. 27, p. 1-12, 2014.

ZHENG, K. Q; et al. Association between cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and variations in lipid levels in patients with coronary heart disease. **Chin Med J**, v. 117, n. 9, p. 1288-92, 2004.