

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LUCAS LIMA DA SILVA**

**Avaliação da expressão gênica de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos submetidos à dieta de cafeteria**

Porto Alegre

2021

**LUCAS LIMA DA SILVA**

**Avaliação da expressão gênica de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos submetidos à dieta de cafeteria**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Farmacêutico.

Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira  
Orientadora

Porto Alegre  
2021

**LUCAS LIMA DA SILVA**

**Avaliação da expressão gênica de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos submetidos à dieta de cafeteria**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi julgado adequado para a obtenção de créditos da disciplina de TCC do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

Orientadora:

Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira, HCPA-UFRGS.

Doutora pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS - Brasil.

Banca Examinadora:

Dra. Letícia de Almeida Brondani, HCPA-UFRGS.

Doutora pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS - Brasil.

Ma. Mayara Souza de Oliveira, HCPA-UFRGS.

Mestra pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS - Brasil.

Porto Alegre

2021

Aos meus queridos pais,  
João Pedro e Terezinha,  
que sempre fizeram de  
tudo por mim e sua família.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, João Pedro (*in memoriam*) e Terezinha, por todo o seu amor e dedicação. Sempre fizeram parte da minha trajetória, com todo o seu apoio e motivação. Se não fosse por vocês, seu filho não teria chegado até aqui e com um futuro pela frente. Sempre amarei vocês.

Agradecer também aos meus irmãos, sempre manteremos essa união e amor incondicional. Muita gratidão por todo o apoio que recebi de vocês.

Agradecer aos meus amigos e colegas de faculdade, que compartilharam comigo toda essa trajetória que não foi fácil para chegarmos até a nossa tão sonhada formatura.

Agradecer à minha orientadora, com quem aprendi bastante no laboratório sobre biologia molecular e seus temas relacionados, foram muitos ensinamentos e bons momentos compartilhados.

Agradecer ao grupo do laboratório, que me recebeu muito bem, tivemos muitos encontros e reuniões compartilhadas, onde aprendi bastante com cada um de vocês e sempre dispostos a ajudar e a esclarecer dúvidas.

Agradecer ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por onde passei e aprendi demais, desde a iniciação científica, estágio e agora pela última etapa que foi o TCC.

Agradecer à Faculdade de Farmácia, por compartilhar toda essa bagagem de conhecimento que adquiri ao longo desses anos na graduação, ao seu corpo docente e funcionários. Muito obrigado por me tornar um farmacêutico com uma visão ampla e capacidade técnico-científica.

Agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me proporcionado um ensino de qualidade, aos professores, à infraestrutura, às pesquisas em que participei e todos os demais fatores que me fizeram chegar até aqui. Obrigado pelo conhecimento adquirido.

## **Apresentação**

O presente trabalho foi elaborado na forma de artigo científico de acordo com as normas da revista “*Archives of Endocrinology and Metabolism*”, na qualidade de “Artigo Original”, apresentadas em anexo.

**Avaliação da expressão gênica de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos submetidos à dieta de cafeteria**

Lucas Lima da Silva<sup>1,2</sup>, Guilherme Coutinho Kullmann Duarte<sup>3</sup>, Mariana Aubin<sup>1</sup>, Daisy Crispim<sup>\*1,3</sup>

1 – Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2 – Curso de Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3 – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\* Autor Correspondente: Dra. Daisy Crispim. Rua Ramiro Barcelos, 2350; Centro de Pesquisa Experimental; 4º andar. CEP: 90035-003. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: dcmoreira@hcpa.edu.br.

Palavras-chaves: obesidade, gene *Ucp2*, expressão gênica, dieta de cafeteria, tecido adiposo.

Identificador ORCID:

Lucas Lima da Silva (<https://orcid.org/0000-0001-6302-8500>).

Guilherme Coutinho Kullmann Duarte (<https://orcid.org/0000-0003-3678-4639>).

Mariana Aubin (<https://orcid.org/0000-0003-1200-0334>).

Daisy Crispim (<https://orcid.org/0000-0001-5095-9269>).

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** A obesidade é uma doença crônica multifatorial decorrente do desequilíbrio crônico entre a ingestão de calorias e o gasto energético. A proteína desacopladora 2 (UCP2) pertence a uma família de proteínas presentes na membrana mitocondrial interna e tem expressão tecidual ampla. A UCP2 atua na regulação do gasto energético, metabolismo dos ácidos graxos livres e inflamação e na diminuição do estresse oxidativo, os quais são mecanismos envolvidos na obesidade. Entretanto, ainda não é claro se a expressão de *UCP2* no tecido adiposo varia de acordo com a presença de obesidade. Dessa forma, comparamos a expressão de *Ucp2* no tecido adiposo visceral (TAV) de camundongos C57BL/6 submetidos à dieta de cafeteria (CAF), como um modelo de obesidade, com camundongos expostos à dieta padrão (DP).

**Métodos:** Camundongos C57BL/6 machos foram divididos em dois grupos experimentais de dieta (CAF: n = 20, e DP: n = 20). Após 16 semanas de seguimento, amostras de TAV foram coletadas e a expressão de *Ucp2* foi avaliada por RT-qPCR. Também foram avaliados diversos parâmetros antropométricos e laboratoriais.

**Resultados:** A expressão de *Ucp2* foi aumentada no TAV dos camundongos do grupo CAF comparado ao grupo DP ( $5,44 \pm 0,64$  vs.  $1,00 \pm 0,05$  *n-fold changes*, respectivamente;  $p < 0,001$ ). Além disso, a expressão de *Ucp2* se correlacionou positivamente com peso corporal, índice de Lee,  $\Delta$ -peso, parâmetros glicêmicos, níveis séricos de insulina e índice de resistência à insulina ao final do seguimento.

**Conclusões:** A expressão de *Ucp2* está aumentada no TAV de camundongos com obesidade induzida por CAF.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial e de etiologia complexa, decorrente do desequilíbrio crônico entre a ingestão de calorias e o gasto energético. Cerca de 650 milhões de adultos em todo o mundo tinham obesidade em 2016. Além disso, mais 124 milhões de crianças e adolescentes apresentavam obesidade (1). A obesidade tem como definição o peso corporal desproporcional para a altura com um acúmulo excessivo de tecido adiposo que geralmente é acompanhado por inflamação sistêmica crônica de baixo grau, assim como uma série de anormalidades metabólicas, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e disfunção imunológica. A obesidade está associada ao desenvolvimento de algumas comorbidades, dentre elas resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e diversos cânceres (2, 3).

A patogênese da obesidade é influenciada pela complexa interação entre fatores de risco biológicos (genéticos e epigenéticos) e ambientais, contudo não é completamente compreendida (4). O tecido adiposo é o principal depósito de armazenamento lipídico em nosso corpo e auxilia na secreção de adipocinas e citocinas sistemicamente. Pesquisas anteriores estabeleceram que a obesidade instiga uma reação inflamatória mais complexa e intensa no tecido adiposo branco visceral do que no subcutâneo (3, 5). Um dos muitos fatores que levam a essa condição é a alteração da proteína desacopladora 2 (UCP2). A UCP2 faz parte da família de proteínas mitocondriais presentes na membrana mitocondrial interna e é expressa em muitos tecidos e tipos de células, por exemplo, tecido adiposo, músculo esquelético, fígado, rins e macrófagos (6).

A UCP2 atua desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, dissipando o gradiente de prótons gerado através da membrana interna mitocondrial, diminuindo assim a produção de ATP. Desempenha um papel importante na regulação do gasto de energia e do metabolismo de ácidos graxos livres, na diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria, na regulação da secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, metabolismo da glicose e atividade neuronal, sendo todos esses processos envolvidos na patogênese da obesidade e/ou DM2 (7-9).

Dados de vários estudos sugerem que níveis mais elevados de expressão da *UCP2* podem aumentar o gasto de energia, reduzindo, portanto, o risco de obesidade (7-11). Além disso, alguns estudos demonstraram alterações na expressão de *Ucp2* no tecido hepático e adiposo em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (12-15); entretanto, os dados ainda não são conclusivos. Dentre os fatores ambientais, o principal fator impulsionador para o ganho de peso é a

dieta. A dieta de cafeteria (CAF) pode ser usada para investigar os efeitos do consumo excessivo de alimentos produzidos industrialmente e altamente processados, que são característicos da sociedade ocidental, sendo um modelo de obesidade exógena e que provoca uma disbiose acentuada (16). Ainda, induz hiperfagia, síndrome metabólica e aumento na adiposidade melhor do que outras dietas (17, 18).

Até o momento, nenhum estudo avaliou a expressão de *Ucp2* em tecido adiposo visceral de camundongos submetidos a um modelo de obesidade induzida por CAF. Portanto, no presente estudo, comparamos a expressão de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos C57BL/6 submetidos à dieta CAF com aqueles expostos à dieta padrão. Também avaliamos a correlação entre a expressão de *Ucp2* com parâmetros antropométricos e laboratoriais desses camundongos.

## **METODOLOGIA**

### **Grupos experimentais**

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (45 dias de idade;  $\pm 22$  g) neste estudo experimental. Esses animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em alojamento específico, dois camundongos/caixa de alojamento com piso revestido de serragem e enriquecidos com tubos de papelão, sendo mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  com umidade controlada (40-60%) e sistema de exaustão de ar. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do HCPA e seguiram os procedimentos estabelecidos para o uso científico de animais regulamentados (protocolo GPPG-HCPA 2017-0251).

Os camundongos machos C57BL/6 foram dispostos aleatoriamente em dois grupos: um grupo foi exposto à dieta experimental CAF (CAF;  $n = 20$ ) e outro à dieta padrão (DP;  $n = 20$ ) e seguidos por 16 semanas. Camundongos dos dois grupos tiveram seu peso e glicemia monitorados até o final das 16 semanas. O grupo DP recebeu ração padrão e água *ad libitum* e foi mantido em sala separada do grupo CAF para evitar interferências relacionadas ao cheiro dos alimentos oferecidos.

## Composição da dieta

A CAF foi adaptada de Estadella, *et al.* (19) e consiste em uma composição hipercalórica, derivada de carboidratos altamente processados e de ácidos graxos saturados predominantes quando comparada às dietas de ração padrão. A CAF também é muito palatável e contém alimentos com alto teor de energia e sódio aumentado. A oferta semanal por caixa habitacional consistia em leite condensado (350 mL), Coca-Cola (700 mL), salsicha (175 g), biscoitos (87,5 g) e ração padrão adicional (87,5 g) para prevenção de deficiências nutricionais e água *ad libitum*.

A nutrição foi composta por carboidratos (55%), lipídios (34,1%; sendo 24% de ácidos graxos saturados), proteínas (10,9%), sódio (2.850 mg) e colesterol (206 mg), perfazendo um total de 4,3 kcal/g. Os alimentos constituintes da CAF foram distribuídos livremente aos animais e substituídos a cada dois dias por alimentos e bebidas novos e frescos. O grupo DP recebeu apenas ração padrão para roedores Nuvilab CR-1 (NUVITAL<sup>®</sup>), composta de carboidratos (65,9%), proteínas (24,2%), lipídios (9,9%) e outros constituintes (fibras e vitaminas), perfazendo um total de 2,93 kcal/g (informações do fabricante), que era, assim como a água, oferecida *ad libitum*.

O consumo de alimentos foi monitorado a cada dois dias por 15 semanas para caracterizar cuidadosamente a ingestão de alimentos em ambos os grupos. As dietas de ambos os grupos foram pesadas no momento da oferta, sendo realizada a avaliação da quantidade ingerida pela diferença entre o ofertado e o consumido. Os animais foram individualmente pesados uma vez por semana. O cálculo da variação de peso foi feito através do peso final menos o peso inicial.

## Monitoramento do peso e cálculo do índice de Lee para camundongos

Os animais foram individualmente pesados uma vez por semana. O cálculo da variação de peso ( $\Delta$ -peso) foi feito através do peso final menos o peso inicial. O índice de Lee ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) é considerado um indicador se o roedor é saudável ou tem obesidade. Foi usado para estabelecer uma comparação do índice de massa corporal entre os camundongos dos grupos DP e CAF. Ao final do experimento, o peso corporal (g) e o comprimento do nariz ao ânus (cm) dos animais foram pesados e medidos, respectivamente, para determinar o índice de Lee. Este índice, adaptado de Moura, *et al.* (20), corresponde à razão entre a raiz cúbica do peso corporal final (g) e o comprimento corporal final (cm) dos animais multiplicado por 1000, equivalendo ao índice de massa corporal em humanos.

## **Monitoramento da glicose sanguínea, Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e cálculo do índice de resistência à insulina**

A glicemia capilar foi mensurada por meio da coleta de sangue por punção com agulha 30G na veia safena da perna do camundongo, previamente raspada para melhor acesso e visualização, utilizando-se o Glicosímetro FreeStyle<sup>®</sup> Optium Neo H (Abbott, Chicago, IL, USA), em volume de 0,6 µL. Esse monitoramento foi realizado mensalmente com jejum de 6 h, sem restrição de acesso à água.

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado na última semana do experimento, com os camundongos em jejum de 6 h, sem restrição hídrica. Os níveis de glicose sanguínea foram avaliados nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min pós-ingestão de solução de glicose (2 g/kg), introduzida diretamente no estômago de camundongos por sonda (gavagem). O sangue foi coletado por punção com agulha 30G em veia safena, onde ambas as pernas foram raspadas para melhor visualização, nos tempos 0 (coleta sem solução de glicose), 15, 30, 60, 90 e 120 min (após solução de glicose) utilizando-se o Glicosímetro FreeStyle<sup>®</sup> Optium Neo H (Abbott, Chicago, IL, USA), em volume de 0,6 µL.

Os níveis de insulina foram analisados usando um kit de imunoenensaio ELISA específico para insulina de roedores (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A resistência à insulina (RI) foi estimada de acordo com o índice do modelo de avaliação da homeostase (HOMA) usando a seguinte fórmula: insulina sérica em jejum (µg/L) × glicose plasmática em jejum (mg/dL) / 405.

### **Coleta das amostras**

Após 16 semanas da dieta experimental as amostras foram coletadas, onde os animais permaneceram em jejum noturno de 6 h na UEA do HCPA e a eutanásia foi realizada por meio de coleta de sangue por punção cardíaca, em tubos de coleta com gel separador, com os camundongos devidamente anestesiados com o anestésico inalatório isoflurano. O soro obtido na coleta foi separado após a formação do coágulo sanguíneo por centrifugação a  $2.000 \times g$  por 10 min a 15°C e armazenado a -80°C.

O tecido adiposo visceral foi coletado e imediatamente lavado em tampão de fosfato (PBS) (pH 7,4; gelado), seco e armazenado em tubos de 2 mL contendo *RNA later* (solução de estabilização de RNA, Invitrogen<sup>™</sup>, USA), os quais foram previamente identificados com o

número correspondente ao camundongo, tipo de amostra e de qual grupo o mesmo pertencia. Além disso, foi realizada a retirada de tecido adiposo subcutâneo, bem como de outros órgãos relacionados à obesidade e RI/DM2 (fígado, rins, pâncreas e músculo). Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C até a realização das análises subsequentes.

### **Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído a partir  $\pm$  60 mg de tecido adiposo visceral utilizando-se o kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®, Life Technologies™, USA), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi armazenado a -80°C até a realização das técnicas moleculares. A concentração e a pureza de cada amostra de RNA foi avaliada por espectrofotometria utilizando o NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™, USA). Foram consideradas adequadas às amostras com a absorvância em 260/280 entre 1,9 a 2,1. A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa utilizando o kit SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Invitrogen™, USA), a partir de 100 ng de RNA purificado, conforme o protocolo informado pelo fabricante.

### **Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)**

Os *primers* para o gene *Ucp2* foram desenhados utilizando a sequência do gene *Ucp2* murino e o *software* Primer Express™ 3.0 (Applied Biosystems™, USA), sendo projetados para atingir dois éxons consecutivos de um gene para evitar a amplificação de qualquer DNA genômico contaminante. O reconhecimento da sequência de interesse para o gene alvo foi feito com o acesso à biblioteca gênica pertencente à National Center for Biotechnology Information (NCBI) na parte de Nucleotide procurando a sequência de RNA mensageiro (mRNA) para a espécie *Mus musculus*. Para a conferência da especificidade dos *primers* envolvidos e buscando similaridade entre sequências biológicas, houve a avaliação no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências de *primers* para *Ucp2* e para o gene de referência *Ciclofilina* são as seguintes: *Ucp2* F: 5'-GCCTCTGGAAAGGGACTTCTC-3', *Ucp2* R: 5'-ACCAGCTCAGCACAGTTGACA-3'; *Ciclofilina* F: 5'-GGGTTCCCTCCTTTCACAGAA-3', e *Ciclofilina* R: 5'-GATGCCAGGACCTGTATGCT-3'.

## Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O cDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Os experimentos de qPCR foram realizados monitorando em tempo real o aumento da fluorescência do corante SYBR<sup>®</sup>Green e usando-se *primers* específicos para o gene *Ucp2* e o gene de referência (*Ciclofilina*).

As reações de qPCR foram realizadas usando 5 µL de PowerUp<sup>™</sup> SYBR<sup>™</sup> Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>, USA), 0,5 µL de *primer forward* e *primer reverse* para cada gene e 0,5 µL de cDNA, em um volume total de 10 µL. A expressão relativa do RNA mensageiro (mRNA) foi realizada por quantificação relativa usando-se o método  $\Delta\Delta Cq$  e expressa em relação a uma amostra calibradora. Esse método calcula mudanças na expressão gênica como diferença de *n-fold* entre a amostra experimental e um calibrador externo.

Os ensaios de validação foram realizados pela amplificação do gene alvo (*Ucp2*) e do gene de referência (*Ciclofilina*), separadamente, utilizando diluições seriadas de um *pool* de amostras de cDNA. Como um requisito deste método, o gene alvo e de referência exibiram eficiências de amplificação iguais (eficiência de 90% a 110%) em todos os experimentos.

Em seguida, o cDNA foi amplificado por qPCR no ViiA<sup>™</sup> 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>, USA). Cada amostra foi testada em triplicata e três controles negativos foram incluídos em cada experimento. Um *pool* de cDNA das amostras foi utilizado como calibrador da reação. A especificidade quantitativa da qPCR foi determinada usando as análises de curva de dissociação e todos os *primers* geraram *amplicons* que produziram um único pico agudo durante as análises.

## Análise estatística

As variáveis são descritas como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A normalidade da distribuição de cada variável foi avaliada usando os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e as variáveis não normais foram transformadas para escala logarítmica antes das análises. O teste t de Student foi utilizado para comparar o peso, tamanho, índice de Lee, níveis de insulina, índice HOMA e expressão de *Ucp2* entre os grupos CAF e DP. O modelo de Equações de Estimativas Generalizadas (EEG) foi utilizado para comparar o peso, medidas de glicose e TOTG entre os grupos ao longo do tempo de seguimento (longitudinal). Além disso, as correlações entre

parâmetros antropométricos, perfil glicêmico e resistência à insulina e a expressão de *Ucp2* foram verificadas usando-se correlação de Pearson. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas no SPSS, versão 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

### Descrição da amostra em relação ao ganho de peso, parâmetros glicêmicos e de resistência à insulina

Não houve diferença de idade e peso corporal entre os grupos no início do experimento (**Tabela 1**). Após as 16 semanas de seguimento, os camundongos alimentados com CAF ganharam significativamente mais peso do que o grupo DP ( $p < 0,001$ ; **Tabela 1** e **Figura 1A**) e tiveram um maior  $\Delta$ -peso ( $p < 0,001$ ; **Tabela 1** e **Figura 1B**). Foi observado também que o grupo CAF apresentou um maior tamanho ao final do experimento em relação ao grupo DP ( $p < 0,001$ ; **Tabela 1**). Os camundongos alimentados com CAF também apresentaram um maior índice de Lee comparados ao grupo DP (**Tabela 1**), evidenciando o efeito obesogênico da CAF.

Os níveis de glicose em jejum foram similares entre os grupos no início do experimento; entretanto, após o 1º mês de seguimento, os níveis glicêmicos já se mostraram significativamente aumentados no grupo CAF comparado ao grupo DP e essa diferença entre os grupos foi aumentando com o tempo (**Figura 2**). Dessa forma, no final das 16 semanas, o grupo CAF apresentou uma diferença maior na glicemia do que o grupo DP ( $220,5 \pm 7,34$  mg/dL vs.  $149,8 \pm 6,11$  mg/dL;  $p < 0,001$ ; **Figura 2**). De acordo com estes dados, os valores de glicose durante o TOTG foram aumentados no grupo CAF nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min após ingestão de glicose (**Figura 3A**). Além disso, o grupo CAF exibiu intolerância à glicose como demonstrado com o aumento na área sob a curva (ASC) calculada com os dados do TOTG (**Figura 3B**). Os níveis de insulina e a RI (HOMA-IR) foram maiores no grupo CAF do que no grupo DP (valores de  $p < 0,001$ ; **Figura 4A** e **4B**). Portanto, esses dados mostraram que a CAF causa um comprometimento no metabolismo da glicose.

## **Avaliação da expressão de *Ucp2* no tecido adiposo branco visceral e correlação com parâmetros antropométricos, perfil glicêmico e resistência à insulina**

A expressão de *Ucp2* foi aumentada cerca de 5x no tecido adiposo branco visceral do grupo CAF em comparação com o grupo DP ( $5,44 \pm 0,64$  vs.  $1,00 \pm 0,05$  *n-fold changes*;  $p < 0,001$ ; **Figura 5**).

A expressão de *Ucp2* se correlacionou positivamente com o peso corporal final ( $r = 0,831$ ;  $p < 0,001$ ), glicemia final ( $r = 0,571$ ;  $p = 0,011$ ), TOTG inicial ( $r = 0,716$ ;  $p \leq 0,001$ ) e final ( $r = 0,697$ ;  $p \leq 0,001$ ), tamanho final ( $r = 0,809$ ;  $p < 0,001$ ), índice de Lee ( $r = 0,661$ ;  $p = 0,002$ ),  $\Delta$ -peso ( $r = 0,824$ ;  $p < 0,001$ ), níveis séricos de insulina ( $r = 0,699$ ;  $p = 0,003$ ) e HOMA-IR ( $r = 0,711$ ;  $p = 0,002$ ). Não houve correlação significativa entre a expressão de *Ucp2* e o peso corporal inicial ( $r = 0,182$ ;  $p = 0,455$ ), glicemia inicial ( $r = 0,009$ ;  $p = 0,972$ ) e tamanho inicial ( $r = 0,153$ ;  $p = 0,634$ ).

## **DISCUSSÃO**

A obesidade representa atualmente um desafio global urgente, uma vez que vem tendo um aumento na sua prevalência com o passar dos anos. Esta epidemia de obesidade traz uma série de consequências aos sistemas de saúde, além de morbidade e mortalidade aumentadas para os indivíduos afetados. Dessa forma, a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da obesidade pode resultar em caminhos que possam prevenir, manejar e tratar essa desordem (21, 22). Nesse contexto, a UCP2 é uma proteína mitocondrial que atua na regulação do gasto energético, metabolismo dos ácidos graxos livres e inflamação e na diminuição do estresse oxidativo, os quais são mecanismos envolvidos na obesidade (6, 23-25). Entretanto, ainda não é claro se a expressão de *UCP2* no tecido adiposo branco varia de acordo com a presença de obesidade. Sendo assim, neste estudo, comparamos a expressão de *Ucp2* no tecido adiposo visceral de camundongos C57BL/6 submetidos à dieta CAF, como um modelo de obesidade, com camundongos expostos à DP (controles). A expressão de *Ucp2* foi aumentada no tecido adiposo visceral dos camundongos submetidos à CAF. Além disso, a expressão desse gene correlacionou-se positivamente com parâmetros antropométricos, perfil glicêmico e RI.

A expressão aumentada de *Ucp2* no tecido adiposo visceral dos camundongos com obesidade está de acordo com o observado em diferentes estudos que reportaram um aumento similar na expressão desse gene em tecido adiposo branco (TAB) em modelos murinos de obesidade (26-29). Margareto *et al.* (26) demonstraram que a administração de um antagonista do

neuropeptídeo Y, envolvido no aumento da ingestão de alimentos e inibindo a lipólise, foi capaz de diminuir a gordura corporal e aumentar a temperatura corporal, o que se correlacionou com a expressão aumentada de *Ucp2* no TAV após a CAF. Os autores sugeriram com um possível mecanismo desse antagonista o favorecimento do gasto de energia e a dissipação de calor provavelmente por promover a expressão de *Ucp2* em TAB, o que induziria a elevação da temperatura corporal (26).

Dependendo do tecido, os níveis de expressão de UCPs são regulados por diferentes fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) e PPAR- $\alpha$ , que também estão envolvidos na homeostase energética e na regulação do metabolismo lipídico. Castrejón-Tellez *et al.* (27) mostraram um aumento da expressão de *Ucp2* no TAV de ratos que receberam uma dieta com teor adicional de açúcar comparado com o grupo controle. Nos ratos tratados também foi observada uma expressão aumentada de PPAR- $\gamma$  e PPAR- $\alpha$  comparado ao grupo controle (27). Entretanto, o aumento de *Ucp2*, PPAR- $\gamma$  e PPAR- $\alpha$  não foi explicado. Kelly *et al.* (30) relataram que a ativação de PPAR- $\gamma$  induziu a expressão de *Ucp2* no tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos, enquanto que seu aumento crônico e intenso fez com que o TAM assumisse um fenótipo semelhante ao TAB com níveis aumentados de *Ucp2*. A ativação do PPAR- $\alpha$  em camundongos foi suficiente para induzir a expressão de *Ucp2* no fígado (30). Interessantemente, descobriu-se que o uso de agonistas seletivos de PPAR- $\gamma$  aumentam a sensibilidade à insulina no tecido adiposo, bem como acarretam um aumento da expressão de *UCP2* em adipócitos humanos (31).

O aumento de *Ucp2* parece estar acompanhado de um aumento nos níveis de leptina (expressão de mRNA e proteína), além de um maior índice de adiposidade e peso, mas que pode estar associado à diminuição de ácidos graxos não-esterificados e por lipólise mediada por leptina em tecido adiposo após o exercício físico (28). De fato, UCP2 promove a oxidação mitocondrial de ácidos graxos, enquanto limita o catabolismo mitocondrial do piruvato (32). A UCP2 atua na diminuição da formação de radicais livres e dano tecidual oxidativo (33-35); portanto, o seu aumento observado no presente estudo, pode ser uma resposta adaptativa. Além disso, sabe-se que a UCP2 tem um papel na secreção de insulina estimulada pela glicose, regulando-a negativamente nas células- $\beta$  pancreáticas (10, 36, 37). Nosso estudo demonstrou que a *Ucp2* se correlaciona positivamente com os níveis de insulina e RI, assim como os níveis de glicose. Dados da literatura demonstram que a UCP2 é expressa e funcionalmente ativa nos tecidos centrais e periféricos envolvidos no metabolismo da glicose e dos lipídios, estando envolvida no sistema da melanocortina e nas funções das células- $\beta$  pancreáticas para controlar as espécies reativas de

oxigênio (EROs) em associação com o metabolismo lipídico. Este princípio mecanístico, juntamente com o papel fundamental das EROs intracelular na promoção do disparo neuronal que ocorre no sistema da melanocortina, necessário para o metabolismo periférico da glicose, e consequente liberação de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas, pode explicar como a atividade da UCP2 pode prejudicar o metabolismo da glicose em virtude do metabolismo lipídico. Assim, durante os períodos de supernutrição, quando a UCP2 está envolvida com substratos de ácidos graxos disponíveis, a produção de EROs subsequente será diminuída, prejudicando a função neuronal. Portanto, se a UCP2 estiver ativa nas células- $\beta$  pancreáticas em circunstâncias semelhantes durante um período de bastante oferta nutricional, a produção de EROs será reduzida e a liberação de insulina das células- $\beta$  pancreáticas desencadeada por glicose será prejudicada (38).

O desenvolvimento de uma inflamação crônica de baixo grau originada do tecido adiposo em indivíduos com obesidade é amplamente reconhecida por induzir RI. Numerosas células imunes, incluindo macrófagos, expressam *UCP2* e sua implicação funcional na atividade das células imunes foi demonstrada em uma ampla variedade de doenças. Esse gene controla a ativação das células imunes por meio da modulação das vias proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e da produção de EROs mitocondriais. Em vários modelos de infecção, inflamação e autoimunidade, um impacto regulatório da *UCP2* foi demonstrado por sua implicação direta na produção de citocinas, óxido nítrico e na migração celular (39). Em um estudo de caso-controle, a morte encefálica foi associada ao aumento da expressão de *UCP2* no pâncreas humano. Foi sugerido que a *Ucp2* tem um efeito pró-apoptótico em células- $\beta$  pancreáticas de ratos expostas a citocinas pró-inflamatórias, por meio da regulação da via intrínseca da apoptose. Esses resultados parecem indicar que a *UCP2* é ativada em um ambiente pró-inflamatório. Além disso, os achados sugerem que o bloqueio de *Ucp2* impede parcialmente a ativação induzida por citocinas da via intrínseca de morte celular em células INS-1E, mas os mecanismos envolvidos neste efeito protetor ainda precisariam ser caracterizados (40).

Em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica demonstrou-se o aumento de massa corporal, aumento de triglicérides no fígado, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina gravemente prejudicadas, aumento na produção de EROs hepática e aumento nos marcadores pró-inflamatórios em comparação com o grupo controle. Essa produção excessiva de EROs resulta em dano oxidativo, disfunção mitocondrial e sinalização deficiente da insulina, todos prejudiciais à regulação metabólica e no desenvolvimento de esteato-hepatite (41). De acordo com esses resultados, observamos em nosso estudo correlações positivas entre a expressão de *Ucp2* e

outras características metabólicas, incluindo peso corporal final, tamanho final, TOTG inicial e final, índice de Lee e  $\Delta$ -peso.

Apesar de os papéis fisiológicos relatados para UCP2 ainda estarem em debate, alguns relatos mostraram sua participação na prevenção da formação de radicais livres e na oxidação de ácidos graxos. Eles também estão envolvidos na regulação metabólica de doenças como diabetes mellitus e obesidade. Além disso, foi demonstrado que a UCP2 é regulada positivamente em resposta a diferentes estados patológicos, como RI, inflamação, estresse oxidativo e altos níveis de ácidos graxos livres, que são todas características de obesidade. Em conclusão, visto que a obesidade é um estado inflamatório crônico de baixo grau e a expressão alterada de *Ucp2* está relacionada aos parâmetros desencadeadores da desregulação metabólica que promove esta doença, estudos posteriores deverão ser realizados a fim de analisar a expressão desse gene em outros tecidos de camundongos com obesidade induzida por CAF, além de verificar a interação com o metabolismo da glicose e lipídico, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo celular.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. (2021). Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed: 9th October, 2021.
2. González-Muniesa, P., Martínez-González, M. A., Hu, F. B., Després, J. P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

3. Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *320*(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00379.2020>
4. Rohde, K., Keller, M., la Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., & Böttcher, Y. (2019). Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*, *92*, 37–50. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2018.10.007>
5. Goossens, G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, *10*(3), 207–215. <https://doi.org/10.1159/000471488>
6. Sreedhar, A., & Zhao, Y. (2017). Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. *Mitochondrion*, *34*, 135–140. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2017.03.005>
7. Brondani, L. A., Assmann, T. S., de Souza, B. M., Bouças, A. P., Canani, L. H., & Crispim, D. (2014). Meta-analysis reveals the association of common variants in the Uncoupling Protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096411>
8. Brondani, L. A., de Souza, B. M., Assmann, T. S., Bouças, A. P., Bauer, A. C., Canani, L. H., & Crispim, D. (2014). Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: Case-control study and meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, *41*(8). <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3371-7>
9. de Oliveira, M. S., Sachs Nique, P., Crispim, D., & de Souza, B. M. (2020). The association of uncoupling proteins 1, 2, and 3 with weight loss variability after bariatric surgery: a systematic review. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, *16*(11). <https://doi.org/10.1016/j.soard.2020.06.015>
10. Li, J., Jiang, R., Cong, X., & Zhao, Y. (2019). UCP2 gene polymorphisms in obesity and diabetes, and the role of UCP2 in cancer. *FEBS Letters*, *593*(18), 2525–2534. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13546>
11. de Souza, B. M., Brondani, L. A., Bouças, A. P., Sortica, D. A., Kramer, C. K., Canani, L. H., Leitão, C. B., & Crispim, D. (2013). Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T Polymorphisms and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: Case-Control Study and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054259>
12. Chen, G., Li, H., Zhao, Y., Zhu, H., Cai, E., Gao, Y., Liu, S., Yang, H., & Zhang, L. (2017). Saponins from stems and leaves of *Panax ginseng* prevent obesity via regulating thermogenesis, lipogenesis and lipolysis in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology*, *106*, 393–403. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.06.012>

13. Rameshreddy, P., Uddandrao, V. V. S., Brahmanaidu, P., Vadivukkarasi, S., Ravindarnaik, R., Suresh, P., Swapna, K., Kalaivani, A., Parvathi, P., Tamilmani, P., & Saravanan, G. (2017). Obesity-alleviating potential of asiatic acid and its effects on ACC1, UCP2, and CPT1 mRNA expression in high fat diet-induced obese Sprague–Dawley rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2017 442:1, 442(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/S11010-017-3199-2>
14. Chun, Y. S., Ku, S. K., Kim, J. K., Park, S., Cho, I., & Lee, N. J. (2018). Hepatoprotective and anti-obesity effects of Korean blue honeysuckle extracts in high fat diet-fed mice. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 22(4), 39–54. <https://doi.org/10.20463/JENB.2018.0029>
15. Sung, Y. Y., Kim, D. S., Kim, S. H., & Kim, H. K. (2018). Aqueous and ethanolic extracts of welsh onion, *Allium fistulosum*, attenuate high-fat diet-induced obesity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2018 18:1, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12906-018-2152-6>
16. Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., Silveira, A. K., Rabelo, T. K., Gelain, D. P., & Moreira, J. C. F. (2017). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity* 2018 42:3, 42(3), 525–534. <https://doi.org/10.1038/IJO.2017.225>
17. Buyukdere, Y., Gulec, A., & Akyol, A. (2019). Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*, 7(4), e6656. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6656>
18. Lanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 122, 92–119. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.11.003>
19. Estadella, D., Oyama, L. M., Dâmaso, A. R., Ribeiro, E. B., & Oller Do Nascimento, C. M. (2004). Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20(2), 218–224. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2003.10.008>
20. de Moura, R. F., Ribeiro, C., de Oliveira, J. A., Stevanato, E., & de Mello, M. A. R. (2009). Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *British Journal of Nutrition*, 101(8). <https://doi.org/10.1017/S0007114508066774>
21. Malik, V. S., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2013). Global obesity: Trends, risk factors and policy implications. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.199>

22. Ritter, A., Kreis, N. N., Louwen, F., & Yuan, J. (2020). Obesity and covid-19: Molecular mechanisms linking both pandemics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165793>
23. Hagen, T., & Vidal-Puig, A. (2002). Mitochondrial uncoupling proteins in human physiology and disease. *Minerva Medica*, 93(1).
24. Erlanson-Albertsson, C. (2003). The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01159.x>
25. Brand, M. D., & Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. In *Cell Metabolism* (Vol. 2, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.002>
26. Margareto, J., Rivero, I., Monge, A., Aldana, I., Marti, A., & Martnez, J. A. (2002). Changes in UCP2, PPAR $\gamma$ 2, and C/EBP $\alpha$  gene expression induced by a neuropeptide Y (NPY) related receptor antagonist in overweight rats. *Nutritional Neuroscience*, 5(1). <https://doi.org/10.1080/10284150290007065>
27. Castrejón-Tellez, V., Rodríguez-Pérez, J. M., Pérez-Torres, I., Pérez-Hernández, N., Cruz-Lagunas, A., Guarner-Lans, V., Vargas-Alarcón, G., & Rubio-Ruiz, M. E. (2016). The effect of resveratrol and quercetin treatment on PPAR mediated uncoupling protein (UCP-) 1, 2, and 3 expression in visceral white adipose tissue from metabolic syndrome rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071069>
28. de Queiroz, K. B., Guimarães, J. B., Coimbra, C. C., Rodovalho, G. V., Carneiro, C. M., Evangelista, E. A., & Guerra-Sá, R. (2014). Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids*, 49(1). <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3854-7>
29. Cocci, P., Moruzzi, M., Martinelli, I., Maggi, F., Micioni Di Bonaventura, M. V., Cifani, C., Mosconi, G., Tayebati, S. K., Damiano, S., Lupidi, G., Amantini, C., Tomassoni, D., & Palermo, F. A. (2021). Tart cherry (*Prunus cerasus* L.) dietary supplement modulates visceral adipose tissue CB1 mRNA levels along with other adipogenesis-related genes in rat models of diet-induced obesity. *European Journal of Nutrition*, 60(5). <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02459-y>
30. Kelly, L. J., Vicario, P. P., Thompson, G. M., Candelore, M. R., Doebber, T. W., Ventre, J., Wu, M. S., Meurer, R., Forrest, M. J., Conner, M. W., Cascieri, M. A., & Moller, D. E. (1998). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Mediate in Vivo Regulation of Uncoupling Protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) Gene Expression. *Endocrinology*, 139(12). <https://doi.org/10.1210/en.139.12.4920>

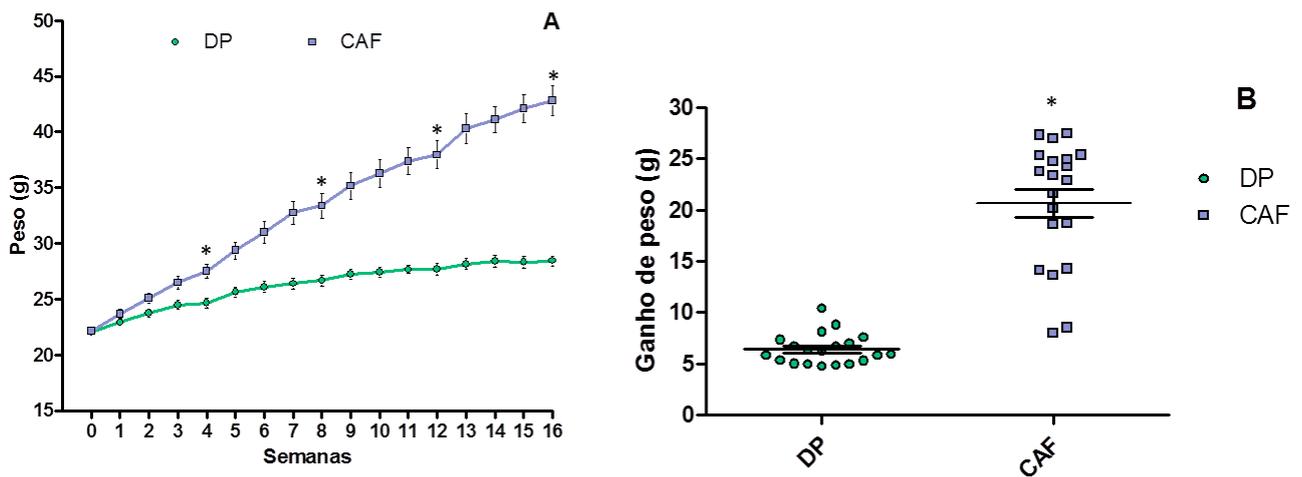
31. Rieusset, J., Auwerx, J., & Vidal, H. (1999). Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(1). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1657>
32. Donadelli, M., Dando, I., Fiorini, C., & Palmieri, M. (2014). UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 71, Issue 7). <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1407-0>
33. Mailloux, R. J., & Harper, M. E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 51, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.022>
34. Ruiz-Ramírez, A., Chávez-Salgado, M., Peñeda-Flores, J. A., Zapata, E., Masso, F., & El-Hafidi, M. (2011). High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00631.2010>
35. Allister, E. M., Robson-Doucette, C. A., Prentice, K. J., Hardy, A. B., Sultan, S., Gaisano, H. Y., Kong, D., Gilon, P., Herrera, P. L., Lowell, B. B., & Wheeler, M. B. (2013). UCP2 regulates the glucagon response to fasting and starvation. *Diabetes*, 62(5). <https://doi.org/10.2337/db12-0981>
36. Ježek, P., OlejáR, T., Smolková, K., Ježek, J., Dlasková, A., Plecítá-Hlavatá, L., Zelenka, J., špaček, T., Engstová, H., Reguera, D. P., & Jabůrek, M. (2015). Antioxidant and Regulatory Role of Mitochondrial Uncoupling Protein UCP2 in Pancreatic  $\beta$ -cells. In *Physiological Research* (Vol. 64, Issue 2).
37. Liu, J., Li, J., Li, W. J., & Wang, C. M. (2013). The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/585897>
38. Diano, S., & Horvath, T. L. (2012). Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.08.003>
39. Emre, Y., & Nübel, T. (2010). Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.014>
40. Brondani, L. A., Rech, T. H., Boelter, G., Bauer, A. C., Leitão, C. B., Eizirik, D. L., & Crispim, D. (2017). UCP2 expression is increased in pancreas from brain-dead donors and involved in cytokine-induced  $\beta$  cells apoptosis. *Transplantation*, 101(3). <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001292>

41. Nyamandi, V. Z., Johnsen, V. L., Hughey, C. C., Hittel, D. S., Khan, A., Newell, C., & Shearer, J. (2014). Enhanced stem cell engraftment and modulation of hepatic reactive oxygen species production in diet-induced obesity. *Obesity*, 22(3). <https://doi.org/10.1002/oby.20580>

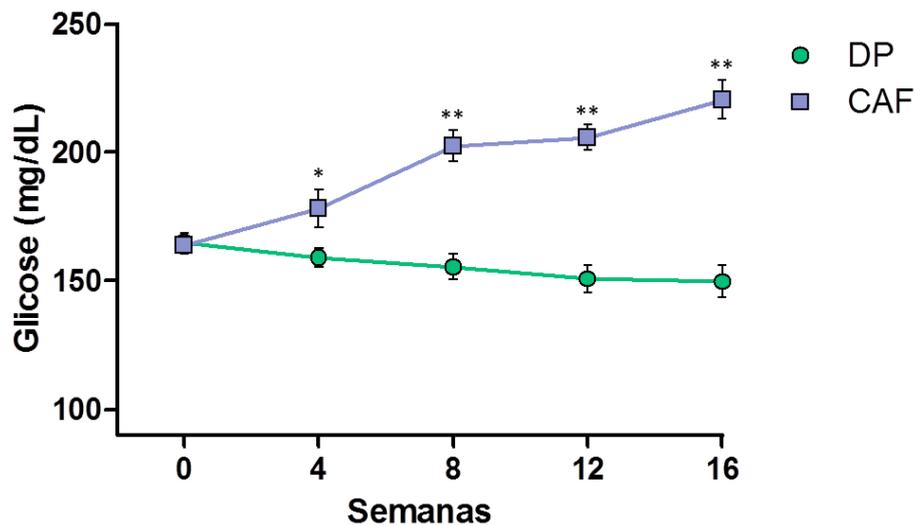
**Tabela 1.** Parâmetros antropométricos.

Análises	Grupo dieta padrão (DP)	Grupo dieta de cafeteria (CAF)	Valor p
Peso Inicial (g)	22,19 ± 0,42 (g)	22,15 ± 0,49 (g)	0,954
Peso Final (g)	29,55 ± 0,59 (g)	42,63 ± 1,57 (g)	< 0,001
Ganho de Peso (g) Δ (16ª semana - Inicial)	7,35 ± 1,40 (g)	20,78 ± 5,85 (g)	< 0,001
Tamanho Final (cm)	8,64 ± 0,25 (cm)	9,31 ± 0,23 (cm)	< 0,001
<i>Lee Index</i> (g/cm <sup>3</sup> )	357,8 ± 8,64 (g/cm <sup>3</sup> )	374,5 ± 9,43 (g/cm <sup>3</sup> )	0,001

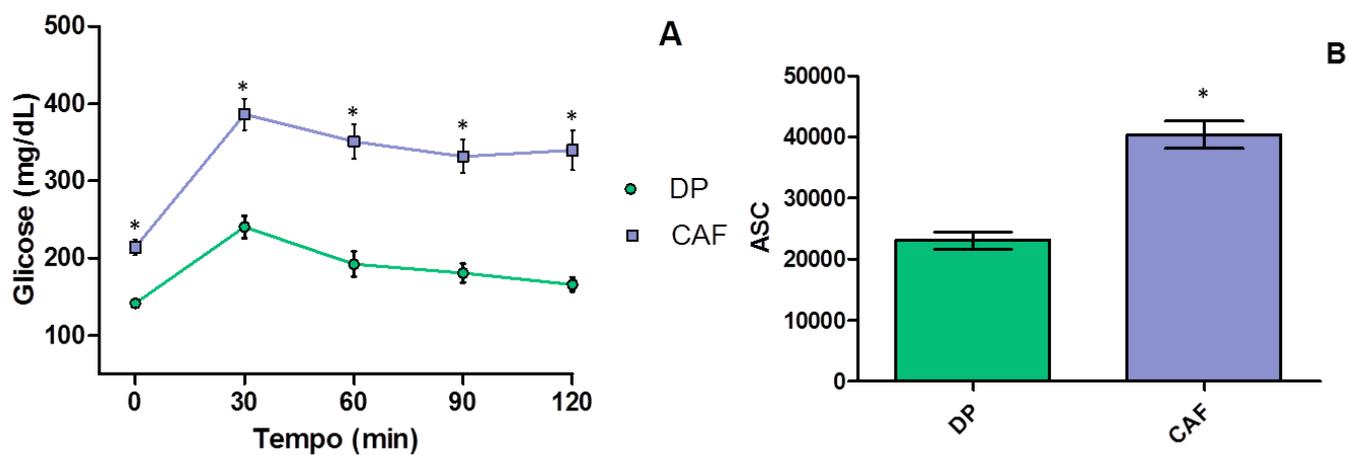
Dados estão demonstrados por média ± erro padrão da média. Valor p foi calculado usando teste t de Student ou modelo de Equações de Estimativas Generalizadas. Somente valores p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.



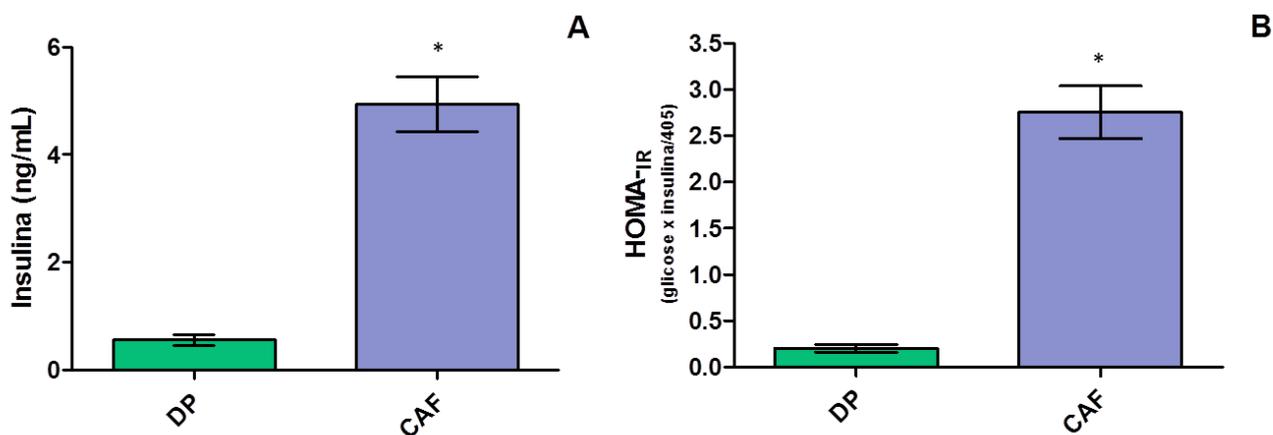
**Figura 1.** Variação de peso e ganho de peso ao longo das 16 semanas. Dados estão demonstrados por média  $\pm$  erro padrão da média. Valor p foi calculado usando o modelo de Equações de Estimativas Generalizadas (A) ou teste t de Student (B). \* $p < 0,001$ ; DP: dieta padrão e CAF: dieta de cafeteria.



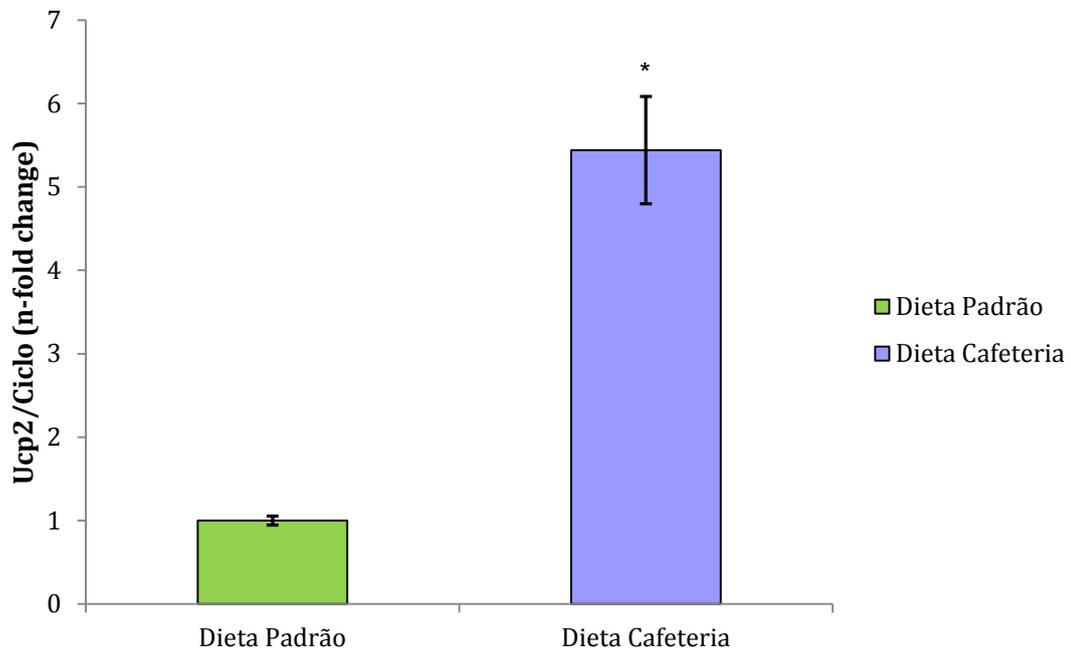
**Figura 2.** Variação das medidas de glicose ao longo das 16 semanas. Dados estão demonstrados por média  $\pm$  erro padrão da média. Valor p foi calculado usando o modelo de Equações de Estimativas Generalizadas. \* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,001$ ; DP: dieta padrão e CAF: dieta de cafeteria.



**Figura 3.** Níveis de glicose durante o teste oral de tolerância à glicose ao longo de 120 minutos e a área sob a curva calculada após esse teste. Dados estão demonstrados por média  $\pm$  erro padrão da média. Valor p foi calculado usando o modelo de Equações de Estimativas Generalizadas. \* $p < 0,001$ ; DP: dieta padrão e CAF: dieta de cafeteria.



**Figura 4.** Níveis séricos de insulina e o índice de resistência à insulina - HOMA-IR. Dados estão demonstrados por média  $\pm$  erro padrão da média. Valor p foi calculado usando teste t de Student. \* $p < 0,001$ ; DP: dieta padrão e CAF: dieta de cafeteria.



**Figura 5.** Expressão relativa de *Ucp2* entre os grupos DP vs. CAF. Dados estão demonstrados por média  $\pm$  erro padrão da média do *n-fold change* em relação à dieta padrão. Valor p foi calculado usando teste t de Student e a variável transformada para escala logarítmica. \* $p < 0,001$ ; DP: dieta padrão e CAF: dieta de cafeteria.

## ANEXO I

Normas da revista ao qual será submetido o artigo original.

**Revista:** “*Archives of Endocrinology and Metabolism*”.

### MANUSCRIPT PREPARATION

#### **Manuscript Category**

AE&M strongly encourages authors that manuscripts meet the quality standards established by the guidelines for health research production – Enhancing the Quality and Transparency of Health Research Network (EQUATOR) (<https://www.equator-network.org/>). EQUATOR is a directory that provides guidelines with the aim of improving the reliability of published health research literature by promoting transparent and accurate reporting.

**Original Article:** articles that report the results of original, clinical or laboratory research. The original article must contain 3,600 words in the main text, six figures and tables, and have up to 60 references.

**Review Article:** articles that present a critical and comprehensive review of the literature on current issues in the field of endocrinology and metabolism in the clinical or basic fields. All review articles are preferably submitted upon invitation from the AE&M and are subject to peer review. Articles in this category are ordered by the editors to authors with proven experience in the field of knowledge, or when the proposal directed by the authors in prior contact receives the approval of the editorial board. Manuscripts must contain 4,000 words, four figures or tables and up to 100 references.

**Brief Communication:** consists of original data of sufficient importance to justify immediate publication. It is a succinct description of the confirmatory or negative results of a focused, simple, and objective trial. Objectivity and perspicuity increase the likelihood that a manuscript will be accepted for publication as a Brief Communication. The main text must contain 1,500 words, 30 references and two illustrations (tables, figures or one of each).

Guidelines or Consensus: Consensus or guidelines proposed by professional societies, task forces, and other associations related to Endocrinology and Metabolism, may be published by AE&M. All manuscripts will be peer-reviewed, must be modifiable in response to criticism, and will be published only if they meet the journal's editorial standards. The manuscript must contain 3,600 words in the main text, six figures and tables and up to 60 references.

Case report: Brief communication used to present case reports, or isolated case, of clinical or scientific importance. These reports must be concise and objective. They must contain data from isolated patients or families that substantially add knowledge to the etiology, pathogenesis and natural history of the condition described. The case report must contain up to 2,000 words, four figures and tables and up to 30 references.

Letter to the Editor: Letters should be brief comments related to specific points, in agreement or disagreement, with the published work, and can be presented in response to articles published in AE&M in the previous 3 editions. Original published data related to the published article are encouraged. Letters must contain 500 words and five complete references. Figures and tables cannot be included.

AE&M recommends the World Health Organization (WHO) and ICMJE clinical trial registration policies, recognizing the importance of these initiatives for the international registration and dissemination of open access clinical trial information. Thus, only clinical research articles that have received an identification number in one of the Clinical Trials Registry validated by the criteria established by WHO and by ICMJE (Brazilian Registry of Clinical Trials – REBEC – <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/> or <http://apps.who.int/trialsearch/default.aspx>) will be accepted. The registration identification number must be entered in the “Methods” section.

Randomized trials should follow CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org>). This statement provides an evidence-based approach to improving the quality of clinical trial reporting. All manuscripts describing a clinical trial must include the CONSORT Flow Diagram showing the number of participants in each intervention group, as well as a detailed description of how many patients were excluded at each phase of the data analysis. All clinical trials must be registered and made available on an open-access website. The clinical trial protocol (including the complete statistical analysis plan) must be submitted with the manuscript (<https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6215-11-9>).

As per the ICMJE recommendation, adopted by AE&M, clinical trials must contain a data sharing statement. The sharing statement must indicate: individual patient data; a data dictionary that defines each field in the dataset and the supporting documentation (e.g., statistical/analytical code); what will be made available for access; when, where and how the data is available (inform the data repository access link); types of analysis allowed; and whether there are restrictions on the use of the data. If the data cannot be shared, the reason for not sharing must be explained. For sample data sharing statements that meet ICMJE requirements, go to: [http://www.icmje.org/news-and-editorials/data\\_sharing\\_june\\_2017.pdf](http://www.icmje.org/news-and-editorials/data_sharing_june_2017.pdf)

**Research Data:** To enable the reproducibility and reproduction of the data, AE&M encourages the deposit and sharing of research data that support the publication of the article. Data Repository is a storage space for researchers to deposit their data-sets associated with their research. AE&M encourages authors who, before choosing a data repository for deposit, to consult at their institution which repository is most relevant to their research. AE&M requests that authors use FAIRsharing and re3data.org to search for a suitable repository.

Authors must select a data repository that issues a persistent identifier, preferably a DOI – Digital Object Identifier, and has established a robust preservation plan that ensures that data is preserved forever. Examples of data repositories: Dryad, Figshare, Harvard Dataverse, Mendeley Data, Open Science Framework e Zenodo.

## **Manuscript Preparation**

The manuscript must be sent in a Microsoft Office Word file, with mandatory page layout on A4 paper (210 × 297 mm) and 2 cm margins on all sides, font Times New Roman or Arial, size 12 and 1.5 pt. spacing between lines.

All manuscripts must include a cover letter stating the importance and relevance of the manuscript. This letter should also contain the following information: whether or not there is a conflict of interest, whether the manuscript is original and has not been published elsewhere, nor is it being considered for publication elsewhere, and also include the ethics committee number (human or animal). In the case of research carried out in Brazil, the cover letter must contain the CAAE registration number generated on the Brazil platform.

Manuscripts submitted without complying with all of these items will be put on hold until completion.

AE&M uses blind review, which means that the identity of authors must be omitted from reviewers. In order to facilitate the submission process, the journal recommends that authors prepare their manuscripts in separate files as described below:

The Cover Page should be structured as follows:

The title of the article must be in English and be concise and informative.

Short title of 40 characters maximum for page titles.

Full names of authors with their respective academic degrees.

Each author's affiliation must contain the following information: university, department, city, zip code, country, email and ORCID (all authors must have the ORCID identifier – Open Researcher and Contributor ID – <https://orcid.org/> sign in).

A corresponding author must be indicated.

It is mandatory that each author attests to have participated sufficiently in the work to assume responsibility for a significant portion of the content of the manuscript. Each of the authors must specify their contributions to the work. The corresponding author or author who submitted the work will indicate, during the submission process, the guarantee and accuracy of the integrity of all data reported in the manuscript.

AE&M recommends that authorship be based on the criteria of the ICMJE. Unrestricted co-authoring is allowed. Authorship credit should be based only on substantial contributions to:

Substantial contributions to the conception or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data for the work; and

Elaboration of the work or critical review of important intellectual content;

Final approval of the version to be published; and

Consent to be responsible for all aspects of the work, ensuring that issues relating to the accuracy or integrity of any part of the work are properly investigated and resolved.

All collaborators who do not meet the authorship criteria must be listed in the Acknowledgments section, as well as the financial support from development agencies.

Keywords: three to five descriptors in English must be included. Descriptors can be found at the following addresses: <https://meshb.nlm.nih.gov/MeSHonDemand> or <https://meshb-prev.nlm.nih.gov/search>

## Manuscript Type

Manuscript Preparation: the body text should not contain any information such as the name or affiliation of the authors. And it must be structured as follows:

Abstract

Main text (article)

Tables, Graphics, Figures and/or Photographs. They must be cited in the main text in numerical order

Sponsorship

Acknowledgments

References

Abstract: original articles, briefs communications and case reports must present abstracts of no more than 250 words. The abstract must contain clear and objective information about the trial in a way that can be understood without consulting the text. The abstract must include four sections that reflect the section titles of the main text. All information reported in the abstract must be originated from the manuscript. Please, use complete sentences for all sections of the abstract.

Introduction: the main goal of the introduction is to stimulate the reader's interest in the article, offering a historical perspective and justifying its objectives.

Materials and Methods: must contain all the details of how the study was conducted, so that other investigators can evaluate and reproduce it. The origin of hormones, unusual chemicals, reagents and devices must be indicated. For modified methods, only new modifications should be described.

Results and Discussion: the Results section should briefly present the experimental data both in the text and in tables and/or figures. The repetition in the text of the results presented in the tables should be avoided. For more details on preparing tables and figures, see below. The Discussion should focus on the interpretation and meaning of the results, with concise and objective comments describing its relationship with other research in this area. In the Discussion, we must avoid repeating the data presented in Results. It may include suggestions to explain those data and must close with the conclusions.

Tables and Figures: Tables and Figures must be numbered according to the order in which they appear in the text, contain a title and be sent in separate files. Tables must not contain data already mentioned in the text. They must be open on the sides and have a completely white background. The abbreviations used in the tables must be mentioned in alphabetical order, in the footer, with the respective forms in full. For tables taken from other sources of information or adapted (with proper permission), the credit of the source must be informed at the end of each legend in parentheses. This credit must be complete with the bibliographic reference of the source or the copyright. Likewise, the abbreviations used in the figures must be explained in the captions. Only images in JPEG format will be accepted, with minimum resolution according to the type of image, for both black and white and color images: 1200 dpi for simple black and white graphics, 300 dpi for black and white photographs and 600 dpi for color photographs. AE&M requests that the authors file the original images in their possession, as if the images submitted online present any impediment to printing, we will contact you to send us these originals.

Photographs: AE&M prefer to publish photos of unmasked patients. We encourage authors to obtain permission from patients or their families, before submitting the manuscript, for possible publication of images. If the manuscript contains identifiable patient images or protected health information, authors must submit documented authorization from the patient, or parent, guardian or legal representative, before the material is distributed to AE&M editors, reviewers, and other staff.

To identify subjects, use a numerical designation (e.g., Patient 1); do not use the initials of the name.

Sponsorship: all sources of research support (if any), as well as the project number and the responsible institution, must be declared. The role of funding agencies in designing the study and collecting, analyzing and interpreting data and writing the manuscript should be stated in Acknowledgments.

Acknowledgments: All participants who have made substantial contributions to the manuscript (e.g., data collection, analysis, and assisting writing or editing), but who do not meet the authorship criteria, should be named with their specific contributions in Acknowledgments in the Manuscript. The conflict of interest statement must be included in this section. Even if the authors do not have a relevant conflict of interest to disclose, they must report it in the Acknowledgments section.

References: the references of printed and electronic documents must be standardized in accordance with the Vancouver style, prepared by the ICMJE. References must be in numerical order (in parentheses), according to the citation in the text, and listed in the same numerical order at the end of the manuscript, on a separate page.

AE&M encourages the use of the DOI, as it guarantees a permanent access link to the electronic article. For articles or texts published on the internet that do not contain the DOI, indicate the full URL address, as well as the access date on which they were accessed. Vancouver-style examples are available on the National Library of Medicine (NLM) website at Citing Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.

Example:

Article

Bein M, Yu OHY, Grandi SM, Frati FYE, Kandil I, Filion KB. Levothyroxine and the risk of adverse pregnancy outcomes in women with subclinical hypothyroidism: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 2021;27(1):34. doi: 10.1186/s12902-021-00699-5.

Unit of Measurement: Results should be expressed using the metric system. Temperature should be expressed in Celsius degrees and time of day using the 24-hour clock (e.g., 0800 h, 1500 h).

Standard abbreviations: All abbreviations in the text must be defined immediately after the first use of the abbreviation.

Molecular Genetic Description: Use standard terminology for polymorphic variants, providing the rs numbers for all reported variants. Assay details, such as PCR primer sequences, must be described briefly together with rs numbers. The pedigree charts must be drawn up in accordance with the published standard: Bennett RL, French KS, Resta RG, Doyle DL. Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2008 Oct;17(5):424-33. doi: 10.1007/s10897-008-9169-9.

Nomenclatures: For genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) – (<http://www.genenames.org/~V>).

For mutations follow the naming guidelines suggested by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

Provide and discuss the Hardy-Weinberg equilibrium data of the analyzed polymorphisms in the studied population. The calculation of Hardy-Weinberg equilibrium can help in discovering genotyping errors and their impact on analytical methods.

Provide the original frequencies of genotypes, alleles and haplotypes.

Whenever possible, the generic name of drugs should be mentioned. When a trade name is used, it must begin with a capital letter.

Acronyms should be used sparingly and fully explained when mentioned for the first time.

## **Peer Review Process**

AE&M adopts blind review for approved manuscripts, where the reviewers are aware of the names and affiliations of the authors, but the reports provided by them to the authors are anonymous. The feedback issued by the evaluators may consider the manuscript as accepted, rejected or requiring revisions, whether in form or content. The opinions issued by the evaluators are appreciated by the Editor-in-Chief, and a final feedback report is sent to the authors.

## Electronic Submission

Manuscripts must be submitted and filled online in the ScholarOne system – <https://mc04.manuscriptcentral.com/aem-scielo>, accompanied by:

Cover Letter.

Declaration of Studies Involving Animal Experimentation (if applicable).

The Manuscript.

Each document must be attached, separately, in the field indicated by the system.

To start the process, the subject responsible for the submission must previously register in the system as an author by creating/associating the ORCID register – <https://orcid.org/signin>. All authors must have their registration associated with an updated ORCID.

### **Important Considerations:**

The manuscript must be submitted to a spell checker. Editing services are recommended, such as: American Journal Experts – <http://www.journalexperts.com/index.php> or PaperCheck – <http://www.papercheck.com/>

All references must be cited in the text and listed at the end.

Concessions must be obtained if copyrighted material is used (including from the internet).