

RENNAN DE OLIVEIRA CAMINHOTTO

Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning* em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo*

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

São Paulo
2018

RENNAN DE OLIVEIRA CAMINHOTTO

**Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning*
em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo***

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fabio Bessa Lima

Versão corrigida

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira Caminhotto, Rennan
Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem browning em adipócitos/tecido adiposo: Estudos in vitro e in vivo / Rennan de Oliveira Caminhotto; orientador Fabio Bessa Lima. -- São Paulo, 2018.
62 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Adipócitos. 2. Tecido Adiposo. 3. Beta-hidroxiacetil-CoA. 4. Ucp1. 5. Mitocôndria. I. Bessa Lima, Fabio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Rennan de Oliveira Caminhotto

Titulo da Tese: Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning* em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo*

Orientador: Profº Drº Fabio Bessa Lima

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **102** nas fls. **24** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Fábio Bessa Lima**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito do Beta-hidroxibutirato na função mitocondrial de adipócitos brancos isolados*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rennan de Oliveira Caminhotto**, Especialista de Laboratório **Sandra Andreotti**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.11.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 24 de novembro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



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

Cabele Universitária "Armário de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - CEP 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: ceua@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização metabólica de um perfil de cetose experimental induzida por suplementação in vivo*", registrado sob o protocolo nº **18/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/03/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Fabio Bessa Lima**
- Departamento: Fisiologia e Biofísica
- Membros da Equipe: *Ayumi Cristina Medeiros Komino (iniciação científica), Rennan de Oliveira Caminhoto (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria de CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Metabolic profiling of an experimental ketosis profile induced by supplementation in vivo*", protocol nº **18/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/8/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Fabio Bessa Lima**
- Team members: *Ayumi Cristina Medeiros Komino (Undergraduate Student), Rennan de Oliveira Caminhoto (Graduate Student)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Norvegicus</i>	Wistar	Macho/Male	8 semanas/weeks	22

São Paulo, 08 de março de 2016.

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

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP

À minha esposa e filhos.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof^o Fabio por todos esses anos em que me permitiu trabalhar em seu laboratório. Sou muito grato por ter sido seu aluno.

Agradeço a todos os companheiros de laboratório, antigos e atuais, e de modo especial nossa técnica, Sandra, que me acompanhou pacientemente desde a iniciação científica.

Agradeço ao Prof^o Marcelo Christoffolete que me permitiu utilizar seu laboratório durante o doutorado. Sou muito grato por tudo que pude aprender.

Agradeço a meus pais que sempre me auxiliaram e proporcionaram os meios necessários para que eu chegasse até este momento.

Agradeço minha esposa por todo amor, ajuda e cuidado com os nossos filhos.

Agradeço, por fim, a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todos os auxílios concedidos, da iniciação científica ao doutorado (processo FAPESP/CAPES 14/10705-4).

"Assim é que as enseadas serenas estão para além das vagas montuosas, que lá cospem o náufrago aferrado à sua tábua. Sem o impulso da tormenta, o náufrago pereceria no mar alto. Foi a tempestade que o salvou."

(Camilo Castelo Branco)

"Não lutem contra o sofrimento, mas contra a falta de sentido."

(Olavo de Carvalho)

RESUMO

Caminhotto RO. Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning* em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo* [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Em animais, dietas cetogênicas induzem o *browning* de tecidos adiposos brancos, fenômeno caracterizado pelo aumento de adipócitos capazes de expressar a proteína desacopladora 1 (UCP1) e outros marcadores de gordura marrom em meio à gordura branca. Estudo anterior demonstrou que o β -hidroxibutirato (β HB), principal corpo cetônico, aumenta marcadores do processo de *browning* em adipócitos brancos (*in vitro*) após 24 horas de incubação. No entanto, as doses testadas foram supra-fisiológicas (50 mM) ou apenas encontradas durante a cetoacidose (25 mM). As dietas cetogênicas aumentam a cetonemia em torno de 1-3 mM. O jejum prolongado pode aumentá-lo para 4-7 mM. Uma vez que poderia ser provocada *in vivo* através de intervenções dietéticas, estudamos o impacto de concentrações fisiológicas de β HB no metabolismo e marcadores de *browning* em adipócitos brancos / tecido adiposo em diferentes modelos: adipócitos isolados de ratos Wistar, células 3T3-L1 e *in vivo*, através da suplementação de sais de β HB em ratos Wistar. Demostramos que o β HB: não induz o aparecimento de diferentes marcadores de *browning* (tais como o incremento: da capacidade oxidativa, da atividade de citrato sintase e de genes relacionados ao *browning*) em adipócitos isolados após 24 ou 48 horas de tratamento; não exerce efeito permissivo no *browning* induzido por agonismo β -adrenérgico. Além disso, os adipócitos 3T3-L1 diferenciados com β HB (4 mM) tiveram diminuição de 52% na expressão de *Ucp1*, resultado que foi reproduzido no tecido adiposo inguinal subcutâneo de ratos Wistar após a ingestão de sais DL- β HB, onde a expressão gênica de *Ucp1* foi indetectável. Em conclusão, embora as causas de *browning* do tecido adiposo branco induzido por dietas cetogênicas permaneçam inconclusivas, nosso estudo demonstra a incapacidade de, em concentrações fisiológicas, os corpos cetônicos serem, por si, responsáveis por esse fenômeno. Pelo contrário, em algumas situações, o β HB pode prejudicar a expressão da *Ucp1*.

Palavras-chave: Adipócitos. β -hidroxibutirato. *Ucp1*. Mitocôndria.

ABSTRACT

Caminhotto RO. Physiological concentrations of ketone bodies do not induce browning of white adipocytes/adipose tissue: in vitro and in vivo studies. [PhD thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

In animals, ketogenic diets induce browning of white adipose tissue, a phenomenon characterized by the increase of adipocytes capable of expressing the uncoupling protein 1 (UCP1) and other markers of brown fat in among white fat. A previous study demonstrated that β -hydroxybutyrate (β HB), the major ketone body, increases markers of the browning process in white adipocytes (in vitro) after 24 hours of incubation. However, the doses tested were supraphysiological (50 mM) or only found during ketoacidosis (25 mM). Ketogenic diets increase ketonemia by about 1-3 mM. Prolonged fasting can increase it to 4-7 mM. Since it could be elicited in vivo through dietary interventions, we studied the impact of physiological concentrations of β HB on metabolism and browning markers on white adipocytes/adipose tissue in different models: adipocytes isolated from Wistar rats, 3T3-L1 cells and in vivo, through the supplementation of β HB salts in Wistar rats. We demonstrate that β HB does not increase any browning markers (such as: oxidative capacity, citrate synthase activity, and browning related genes expression) in isolated adipocytes after 24 or 48 hours of treatment; does not exert a permissive effect on browning induced by β -adrenergic agonism. In addition, 3T3-L1 adipocytes differentiated with β HB (4 mM) had a 52% decrease in *Ucp1* expression, a result that was reproduced in the subcutaneous inguinal adipose tissue of Wistar rats after ingestion of DL- β HB salts, where *Ucp1* expression was undetectable. In conclusion, although the causes of browning of white adipose tissue during ketogenic diets remain inconclusive, our study demonstrates the inability, in physiological concentrations, of ketone bodies themselves to be responsible for this phenomenon. In contrast, in some situations, β HB may impair the expression of *Ucp1*.

Keywords: Adipocytes. β -hydroxybutyrate. *Ucp1*. Mitochondria.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Programação termogênica de adipócitos	13
1.2 Corpos cetônicos e <i>browning</i>	16
2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	20
3. METODOLOGIA I – Experimentos em adipócitos isolados.....	21
3.1 Descrição dos experimentos.....	21
3.2. Obtenção de Adipócitos Isolados.....	21
3.2.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica	22
3.2.2 Tratamento dos adipócitos isolados.....	23
3.3 Ensaio de oxidação em adipócitos isolados.....	23
3.4 Ensaio de atividade enzimática – Citrato Sintase	24
3.5 Análise da expressão gênica	24
3.5.1 Extração de RNA.....	24
3.5.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa	25
3.5.3 PCR quantitativo (real time).....	25
3.5.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo ($\Delta\Delta CT$).....	27
3.6 Análise estatística	27
4. METODOLOGIA II – Experimentos em células 3T3-L1	28
4.1 Descrição dos experimentos.....	28
4.2 Cultivo, tratamento e diferenciação de células 3T3-L1.....	28
4.3 Análise da expressão gênica	29
4.3.1 Extração de RNA.....	29
4.3.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa	29
4.3.3 PCR quantitativo (real time).....	30
4.4 Análise estatística	30
5. METODOLOGIA III – Experimentos <i>in vivo</i>	31
5.1 Descrição dos experimentos.....	31
5.2 Padronização do modelo experimental	31
5.2.1 Indução aguda de cetose através da ingestão de sais de βHB	31
5.2.1 Administração contínua e de longo prazo de sais de βHB	31
5.3. Obtenção de Adipócitos Isolados.....	32
5.3.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica	32
5.4 Ensaio de atividade enzimática – Citrato Sintase	32

5.5	Análise da expressão gênica	32
5.6	Análise do conteúdo proteico - <i>Western blotting</i>	33
5.7	Análise estatística	33
6.	RESULTADOS.....	34
6.1	Concentrações fisiológicas de β HB não induzem o browning em adipócitos isolados	34
6.2	β HB diminui a expressão de <i>Ucp1</i> em adipócitos 3T3-L1	38
6.3	A administração oral de sais de β HB induz aumento de cetonemia	39
6.4	Suplementação crônica com sais de β HB mantém a cetonemia elevada em diferentes momentos do dia.....	40
6.5	Os sais de β HB alteram a evolução ponderal dos animais.....	41
6.6	Caracterizações metabólicas do modelo de suplementação com sais de β HB: Consumo alimentar e parâmetros bioquímicos	42
6.7	Efeitos da suplementação crônica de sais de β HB nos tecidos adiposos: Diminuição de massa adiposa e volume celular	43
6.7.1	<i>A cetonemia é inversamente correlacionada ao volume dos adipócitos e ao % corporal de massa adiposa</i>	44
6.8	Efeito da ingestão de sais β HB em marcadores de <i>browning</i> em diferentes tecidos adiposos	46
7.	DISCUSSÃO	49
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE I – CITOTOXICIDADE NOS MODELOS <i>IN VITRO</i>	60
1.1.	<i>Metodologia estudos in vitro</i>	60
1.1.1	<i>Teste de viabilidade celular (XTT ensaio colorimétrico)</i>	60
1.2	<i>Resultados</i>	61
1.2.1	<i>Viabilidade celular de adipócitos isolados</i>	61
1.2.2	<i>Viabilidade celular de células 3T3-L1</i>	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Programação termogênica de adipócitos

Os tecidos adiposos brancos são importantes reguladores dos níveis de energia sistêmicos. Constituídos, sobretudo, de células adiposas, podem estocar ou liberar energia na forma de ácidos graxos de acordo com demandas sistêmicas, através de controle hormonal. Todavia, suas características de tecido 'armazenador de energia' podem ser maleavelmente alteradas e tornar tecidos adiposos sítios de relativa dissipação energética (Wang et al., 2016; Sidossis et al., 2015).

Duas principais classes de adipócitos são encontradas em mamíferos: brancos e marrons. Enquanto aqueles são considerados as unidades funcionais do tecido adiposo branco, estes são tipos celulares encontrados majoritariamente em tecidos adiposos marrons e possuem grande taxa de utilização de substratos energéticos (como glicose e ácidos graxos) para produção de calor em resposta a diversos estímulos. A atividade termogênica das células adiposas marrons depende, em grande parte, da proteína desacopladora 1 (UCP1, do inglês *uncoupling protein 1*). Quando ativada, a UCP1 catalisa um vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, o que desacopla a respiração oxidativa da síntese de ATP; a energia derivada da oxidação do substrato é então dissipada como calor. Assim, a presença de UCP1 em adipócitos reflete sua capacidade termogênica. (Wang et al., 2016; Fedorenko et al., 2012)

O fenômeno do aumento do número de adipócitos capazes de expressar a UCP1 em meio aos tecidos de gordura branca pôde ser descrito pela caracterização de células adiposas específicas chamadas de adipócitos beges. Essas células se assemelham, por seu fenótipo, aos outros adipócitos brancos e têm baixa expressão de UCP1. No entanto, sob o estímulo apropriado, bem como a gordura marrom clássica, os adipócitos beges respondem com alta expressão (gênica e proteica) de UCP1, acompanhado de aumento da respiração celular, desenvolvendo assim características termogênicas e de maior gasto energético (Wu, et al., 2012). Este fenômeno tem sido denominado

de *browning* (isto é, o desenvolvimento de características termogênicas, que são predominantes no tecido marrom [do inglês, *brown*]) (Harms & Seale, 2013; Wu et al., 2013). Dados sugerem heterogeneidade na origem dessas células adiposas, o que pode variar principalmente de acordo com o coxim adiposo estudado. Por exemplo: aproximadamente 10% dos adipócitos beges positivos para UCP1 na gordura branca subcutânea inguinal são provenientes de precursores do músculo liso que expressam *Myh11*. Por outro lado, um subconjunto de adipócitos beges, presentes nos depósitos subcutâneos anteriores e tecidos adiposos perigonadais, se origina de células positivas para *Myf5*, (Sanchez-Gurmaches et al., 2012) enquanto a maioria dos adipócitos beges da subcutânea inguinal deriva de precursores negativos para *Myf5* (Kajimura, 2015). Tal multiplicidade de origem não é uma característica compartilhada entre células beges e marrons, que são, por sua vez, derivadas de precursor melhor estabelecido.

Todavia, apesar da origem mesenquimal distinta, adipócitos marrons e beges dividem muitas características bioquímicas e morfológicas. 1) eles possuem gotas multiloculares (diferentemente das gotas uniloculares dos adipócitos brancos) e inúmeras mitocôndrias. 2) eles expressam genes relacionados com programação termogênica como: *Ucp1*, da já citada UCP1; *Cidea* (do inglês *cell death-inducing DFFA-like effector A*), de uma proteína associada a gotícula lipídica que promove sua fusão e crescimento, processos essenciais na diferenciação de novos adipócitos bem como para facilitar a hidrólise e a esterificação do triacilglicerol em células metabolicamente ativas (Barneda et al., 2015); *Ppargc1a*, gene da proteína PGC1 α (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*), um coativador transcricional que desempenha um papel central em uma rede reguladora que governa a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial e função respiratória, bem como da programação termogênica própria do tecido adiposo marrom e bege (Scarpulla et al., 2010); *Prdm16* (do inglês *PR domain containing 16*), um fator de transcrição que regula a programação termogênica de ambos tipos de células adiposas. Apesar de ser dispensável para o desenvolvimento embrionário do tecido adiposo marrom, é necessário para suprimir a expressão de genes próprios de gordura branca

nesse tecido, permitindo assim o aparecimento do fenótipo termogênico na fase pós-natal (Harms et al., 2014). Além de seu papel crítico na determinação e manutenção do fenótipo dos adipócitos marrons, o PRDM16 é necessário para o *browning* induzido por estímulos externos do tecido adiposo branco (isto é, desenvolvimento de adipócitos bege) (Kajimura, 2015). 3) eles tem a capacidade de responder a diversos estímulos termogênicos, como o estímulo β -adrenérgico (Wang et al., 2016).

O principal mecanismo de ativação da programação termogênica e da termogênese em adipócitos, o estímulo β -adrenérgico, ocorre quando as catecolaminas se ligam aos seus receptores β -adrenérgicos, presentes nas membranas das células de gordura, e ativam a enzima amplificadora de sinal adenilato ciclase, através de uma proteína G estimulatória (Gs), o que gera aumento substancial do segundo mensageiro AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). Por sua vez, o AMPc se liga a subunidades reguladoras da PKA (proteína quinase A), que, tornando-se ativa, fosforila diversos alvos, incluindo a enzima HSL (lipase hormônio sensível) e perilipinas, tendo por efeito a hidrólise de triacilglicerol intracelular, processo conhecido como lipólise. A liberação de ácidos graxos, particularmente os de cadeia longa, através da hidrólise do triacilglicerol, ativa a UCP1 e aumenta seu efeito desacoplador, que em situações basais permanece inativo, ativando assim a termogênese propriamente dita. Por outro lado, os receptores β -adrenérgicos e a enzima PKA também podem ativar uma cascata de proteínas quinases que culminam com a ativação da MAP quinase p38 que fosforila reguladores transcricionais responsáveis pela biogênese mitocondrial, como o PGC1 α , que também impulsiona a transcrição do gene *Ucp1* (Bordicchia et al., 2012; Cao et al., 2001), o que aqui denominamos programação termogênica.

Em modelos animais, admite-se que a ativação do tecido adiposo marrom, um dos principais sítios de produção de calor, confere efeitos benéficos à adiposidade corporal e à sensibilidade à insulina (Bartelt & Heeren, 2014). No mesmo sentido, em modelos experimentais, a estimulação do aparecimento de adipócitos com características termogênicas em meio de coxins adiposos brancos parece estar relacionada aos mesmos efeitos

metabólicos benéficos da ativação do tecido marrom (Guerra et al., 1998; Rachid et al., 2015), embora este último continue a ser aceito como o território adiposo mais relevante para a termogênese (Shabalina et al., 2013). Ainda, apesar da menor contribuição termogênica quando comparada ao tecido marrom, o bloqueio do desenvolvimento do *browning* em tecidos adiposos brancos aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de disfunções metabólicas, como obesidade, intolerância à glicose e inflamação, enquanto diminui o gasto de energia e a absorção tecidual de glicose. Por outro lado, o transplante de gorduras reconhecidas por serem predispostas ao *browning* (como a gordura subcutânea inguinal) promove benefícios metabólicos sistêmicos (Cohen et al., 2014).

1.2 Corpos cetônicos e *browning*

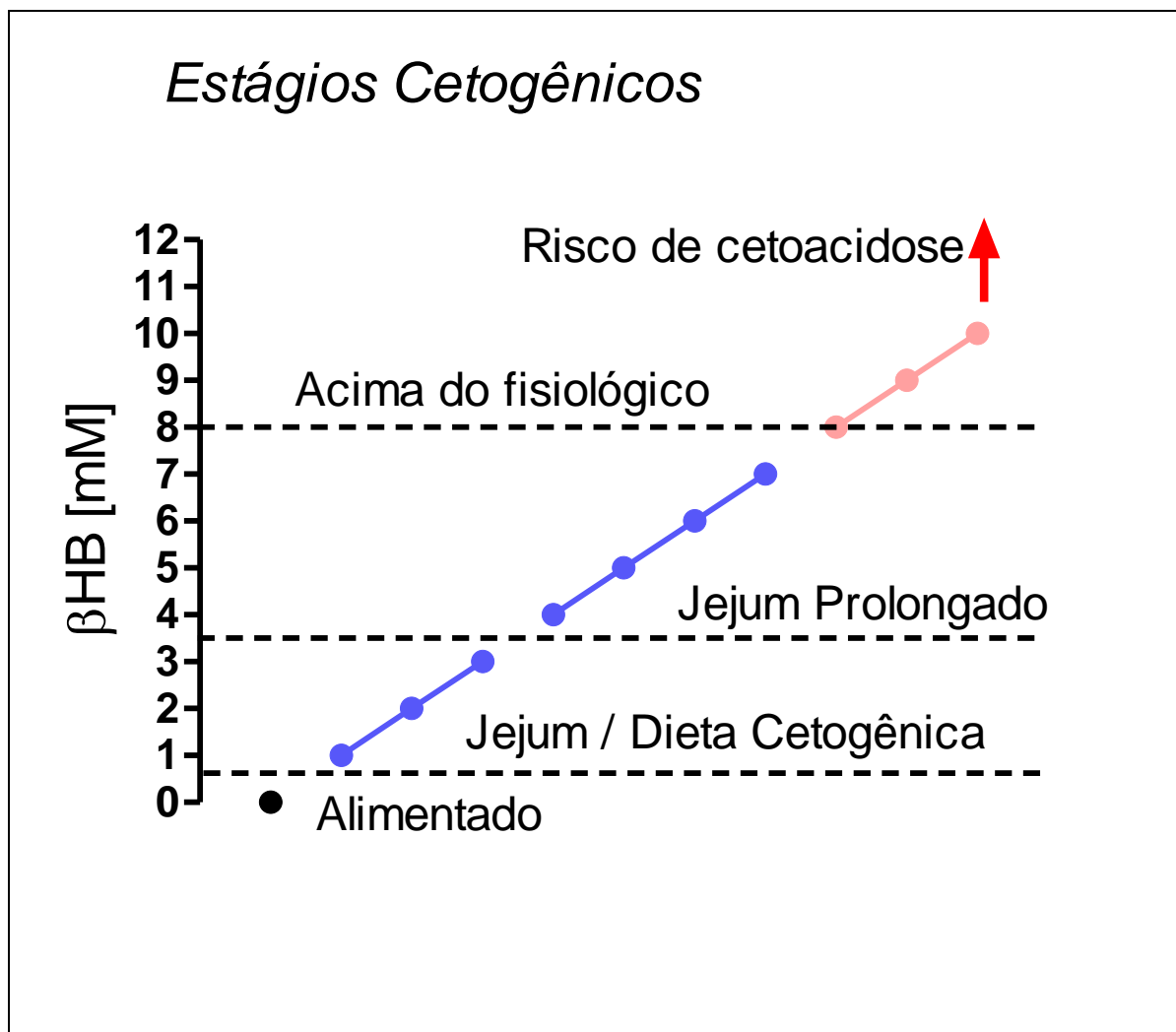
Os corpos cetônicos são pequenas moléculas derivadas do catabolismo hepático das gorduras que fornecem energia aos tecidos quando a glicose é escassa, como durante o jejum ou o exercício prolongado. Nessas situações, quando há depleção do glicogênio nas células hepáticas, os ácidos graxos mobilizados dos adipócitos são transportados para o fígado e lá são convertidos em corpos cetônicos, que são então distribuídos através da circulação sanguínea para tecidos metabolicamente ativos, como músculo ou cérebro, onde são metabolizados em acetil-CoA e eventualmente em ATP (Newman & Verdin, 2017).

O termo corpos cetônicos abrange três moléculas geradas durante a cetogênese: β -hidroxibutirato (β HB), acetoacetato e acetona. A maior parte dos corpos cetônicos está na forma de β HB. Quando a cetogênese é ativada, como durante o jejum, os níveis sanguíneos de β HB aumentam muito mais rapidamente do que o acetoacetato ou a acetona. Por isso, a mensuração de sua concentração é considerada o melhor indicativo de cetonemia (Newman & Verdin, 2017).

Em seres humanos, as concentrações séricas de β HB são normalmente baixas (<0.1 mM), mas começam a aumentar significativamente após 12-16

horas de jejum, alcançando 1-2 mM depois de dois dias de jejum e 6-8 mM em jejuns prolongados (no inglês, *starvation*). Nessas condições, os corpos cetônicos são os substratos energéticos mais abundantemente presentes na circulação, quando comparado à glicose (5mM) e ácidos graxos (0.7-1.2 mM) (Cahill, 2006; Newman & Verdin, 2017). Cabe ressaltar que tais concentrações são fisiológicas, isto é, não são normalmente relacionadas ao quadro de cetoacidose, como o presente em quadros de diabetes, onde a cetonemia pode atingir concentrações sanguíneas de até 25 mM, condição esta que resulta em grave acidose metabólica (Veech et al., 2001). A figura 1. ilustra as possíveis variações da cetonemia em situações fisiológicas.

Figura 1. Ilustração das possíveis variações na cetomenia.



Outras abordagens utilizadas para elevação da cetonemia são as dietas cetogênicas e a suplementação de corpos cetônicos exógenos. As dietas cetogênicas são caracterizadas pela extrema restrição de carboidratos e aumento de ingestão de gorduras, ao ponto de induzir a cetogênese hepática e presença de cetose, isto é, concentrações detectáveis de corpos cetônicos no plasma. O aumento da cetonemia induzida por tais dietas tende a se fixar em valores fisiológicos, algo entre 0,5 - 3 mM e é geralmente nomeada de 'cetose nutricional'. Em humanos, dietas cetogênicas possuem variada composição: 15-26% de proteínas e 69-80% de gorduras, mas sempre com intensa restrição de carboidratos (>20g dia, ~5% do consumo calórico total (Yancy et al., 2004; Hall et al., 2016). Já em modelos murinos, o percentual de gordura é chega a ser maior (~95% do valor calórico total) porque restrições proteicas também são necessárias (>5% do valor calórico total) para que se estimule mais eficazmente a cetogênese (Kennedy et al., 2007; Bielohudy et al., 2011). Por outro lado, a administração de corpos cetônicos exógenos tem sido uma alternativa para elevação experimental da cetonemia. Corpos cetônicos na forma de ésteres (cetonas associadas a outros substratos precursores de cetogênese) e sais minerais são utilizados eficazmente para mimetizar o aumento da cetonemia encontrada em situações fisiológicas (Stubbs et al., 2017).

Alguns estudos demonstram que dietas cetogênicas induzem à ativação da programação termogênica do tecido adiposo marrom e *browning* da gordura branca (Kennedy et al., 2007; Srivastava et al., 2013; Douris et al., 2017). Também, em animais, os ésteres de cetonas já foram amplamente estudados e os resultados sugerem que talvez a cetose, e não os outros componentes das dietas cetogênicas (como a razão de lipídios/carboidratos ingeridos), pode ser responsável pelo aumento de UCP1 nos tecidos adiposos, marrom e branco (Srivastava et al., 2012). Além disso, camundongos sem receptores β -adrenérgicos (- β 1, β 2 e β 3) alimentados com dieta cetogênica têm o processo de *browning* preservado, em contraste do ocorrido no tecido marrom que teve sua ativação interrompida pela falta de atividade β -adrenérgica do sistema nervoso simpático (Douris et al, 2017), o que sugere fortemente que, diferente da gordura marrom, fatores circulantes podem ser diretamente responsáveis

pela indução do *browning* em gorduras brancas que ocorrem durante as dietas cetogênicas.

De fato, os próprios corpos cetônicos, elementos circulantes mais notáveis durante a cetogênese, já foram demonstrados como metabólitos ativadores do *browning*, particularmente o β HB, capaz de diretamente induzir a expressão do gene *Ucp1* e *Cidea* em adipócitos cultivados (Carriere et al., 2014). No entanto, as concentrações testadas de β HB foram supra-fisiológicas ou encontradas apenas durante a cetoacidose (15 - 50 mM), enquanto os efeitos das concentrações fisiológicas permanecem desconhecidos.

Restrição calórica, dietas cetogênicas, jejum e exercício físico, são exemplos de situações em que a cetogênese é ativada e a cetose pode ser encontrada sem problemas relacionados à cetoacidose (Meidenbauer et al., 2014; Cahil, 2006). Por isso, uma vez que o estado de cetose pode ser provocado *in vivo* através de intervenções dietéticas, os efeitos das concentrações fisiológicas de corpos cetônicos nos adipócitos são importantes conhecimentos ausentes. Por essa razão, estudamos os efeitos de concentrações fisiológicas de β HB no metabolismo e marcadores de *browning* em adipócitos brancos e tecidos adiposos, *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Nosso objetivo foi o de testar a hipótese de que concentrações fisiológicas de β -hidroxibutirato (β HB) podem induzir o aparecimento de marcadores de *browning* em adipócitos brancos, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Para isso, três modelos foram utilizados: 1) adipócitos isolados; 2) células 3T3-L1; Modelo de suplementação de sais de β HB *in vivo*.

Este trabalho torna-se relevante na medida em que os dados apontam para a capacidade de programação termogênica de tecidos adiposos em humanos. Em humanos, o tecido adiposo marrom é o principal sítio de gasto energético via termogênese. Estima-se que, 50 gramas desse podem aumentar o gasto energético diário em 20%, enquanto 24% do aumento do metabolismo produzido pela administração de adrenalina pode ser atribuído a atividade deste tecido (Rothwell et al., 1983; Astrup et al., 1985). Todavia, estudos indicam que, em pessoas adultas, o tecido adiposo marrom é principalmente, se não inteiramente, composta de adipócitos semelhantes aos bebes, que são altamente recrutáveis em resposta a estímulos externos apropriados (Kajimura, 2015; Wang et al., 2016). Assim, nosso interesse pelo tema se dá na medida em que a identificação de compostos indutores de *browning* poderá ser útil na compreensão da programação termogênica dos adipócitos, bem como ser fonte de hipóteses que podem ser testadas em ensaios clínicos, principalmente por se tratar aqui de um composto orgânico e fisiológico, o qual sua suplementação já é uma possibilidade em seres humanos.

3. METODOLOGIA I – Experimentos em adipócitos isolados

3.1 Descrição dos experimentos

Estes experimentos tiveram por objetivos específicos verificar mudanças no fenótipo de células adiposas brancas após incubação com β HB. No experimento I, adipócitos das regiões epididimal e subcutânea foram incubados durante 24 horas com concentrações crescentes de β HB (0, 2.5, 5 e 10 mM, sendo esta última um exemplo de concentração não fisiológica); após a incubação as células tiveram sua capacidade metabólica (capacidade oxidativa e lipogênica) testada, além da mensuração da atividade da enzima mitocondrial citrato sintase. No experimento II, os adipócitos das regiões epididimal e subcutânea foram incubados durante 24 horas com concentrações crescentes de β HB (0, 2.5, 5 e 10 mM) e 5 mM durante 48 horas; após a incubação as células seguiram para análise da expressão de genes relacionados ao processo de *browning*. Por fim, no experimento III, os adipócitos das regiões epididimal e subcutânea foram incubados durante 24 horas com β HB (5mM), lavadas e incubadas com um agonista β -adrenérgico, o isoproterenol (0.1 μ M) a fim de verificarmos se o tratamento prévio com o corpo cetônico promoveria algum efeito permissivo na expressão de genes relacionados ao *browning* induzido pelo agonismo β -adrenérgico.

3.2. Obtenção de Adipócitos Isolados

Ratos Wistar machos SPF (Specific Pathogen Free) de (08 semanas) foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram acondicionados em duplas em caixas de polipropileno (46x24x20cm), sob condições de temperatura ambiente controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de iluminação claro/escuro 12/12 (período claro iniciado às 7:00) e exaustão de amônia controlada. Água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*. Após completarem 11-12 semanas - idade ideal para nosso trabalho porque nesta faixa etária os ratos já ultrapassaram a puberdade - os animais foram eutanasiados por decapitação, após serem anestesiados com Tiopental (4mg/100mg de p.c.). A retirada dos coxins adiposos- Epididimal

(EP) e Subcutâneo abdominal/inguinal (SC)- foi realizada mediante laparotomia mediana.

3.2.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica

Os adipócitos dos coxins epididimal (EP) e subcutâneo (SC) foram isolados mediante a técnica de digestão de tecido pela collagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, 1 g de tecido foi retirado, picado com tesoura em finos fragmentos incubados em 4,0 mL de tampão digestivo (D'MEM, HEPES 25 mM, BSA 4 %, collagenase tipo I [1.25 mg/mL- Worthington Biochemical Corporation- New Jersey, NY, USA], em pH 7.45) por cerca de 60 min a 37 °C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1 %, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37 °C. Para a determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 µL de suspensão celular em tampão EHB foram colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (1000 rpm por 1 min) em cada experimento. O volume total da suspensão corresponde a 100 % e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação nos fornece o “lipócrito” da amostra. Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico (aumento de 100x) e os diâmetros celulares mensurados através de análise computadorizada realizada pelo programa Motic Image Plus 2.0. Para tal, foram medidas 50 células. A partir do diâmetro celular médio e admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$(a) V = [(\pi/6) \times D^3]/1000, (b) N = (\text{lipócrito} \times 10^7) / V,$$

onde: **D** é o diâmetro médio de 50 adipócitos (µm), **N** é o número de células em 1 mL e **V** é o volume médio (Di Girolamo, et al., 1971). A divisão por 1000 em (a) visa expressar o volume em picolitros (pL).

Desse modo foi possível calcular a quantidade de células em todos os próximos ensaios.

3.2.2 Tratamento dos adipócitos isolados

Em suma, adipócitos isolados do tecido EP e SC (aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células) foram incubados em garrafas de cultura (25cm^2) com meio LGC (Low Glucose - 5mM) acrescido de 5% de soro bovino fetal e 100 U de Penicilina e 100 μg de Estreptomicina em estufa (5% de CO_2 e 37°C). Tais células foram incubadas com nas concentrações indicadas com βHB ((\pm)-*Sodium 3-hydroxybutyrate*, Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 24 ou 48 horas. Cada animal utilizado foi considerado $n=1$.

3.3 Ensaio de oxidação em adipócitos isolados

A capacidade oxidativa das células foi testada com a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetato (4 experimentos). Em suma, adipócitos isolados previamente tratados (segundo item 4.3) foram incubados em tampão Krebs / Ringer / Fosfato / BSA 1 % / glicose 1 mM, $\text{pH}=7,4$ a 37°C , saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, e pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17×100 mm contendo de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetato ou $\text{D}\text{-}[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -glicose (1850 Bq/tubo). Estes tubos foram vedados com tampa de borracha e foram enriquecidos individualmente de uma atmosfera com O_2/CO_2 (95%/5%) e incubados por 120 minutos em banho-maria a 37°C . Ao fim da incubação, foram adicionados 200 μL de H_2SO_4 e, em seguida, tubos contendo uma tira (2×4 cm) de papel filtro embebido em 200 μL de etanolamina foram emborcados aos tubos de reação- o conjunto foi selado com parafilme e mantido por 30 minutos a fim de adsorver o $^{14}\text{CO}_2$ liberado. O conjunto foi então desligado, e o tubo com papel preenchido com *cocktail* de cintilação (Universol, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA), e a radioatividade foi contada em beta-contador (MicroBetaTrilux, PerkinElmer, EUA). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot 10^{-6}$ células.

3.4 Ensaio de atividade enzimática – Citrato Sintase

A enzima citrato sintase está presente em mitocôndrias e catalisa a primeira reação do ciclo do ácido cítrico, entre acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato e CoA. Sua atividade foi medida segundo ALP et al., 1976: após tratamento, as células foram homogeneizadas em tampão de extração, contendo Tris base (50 mM), EDTA (1 mM) e pH 7,4. O sobrenadante foi utilizado para análise da atividade enzimática da citrato sintase. O tampão de ensaio consistiu de Tris base (100 mM), Acetil-CoA e DTNB (0,2 mM) – esse último adicionado para quantificar colorimetricamente a formação de CoA-SH (sulfidrina), resquício da formação de citrato via citrato sintase. Após a adição do substrato oxaloacetato à amostra, a atividade enzimática foi obtida através da inclinação da curva de absorbância (412nm) x tempo da fase inicial linear (não saturada) de reação. Nesta fase, a taxa de reação é correlacionada à concentração de enzima, uma vez que as concentrações de todas as variáveis estão controladas (concentração de substratos e, posteriormente, normalização por proteínas). As proteínas foram quantificadas pelo kit de ensaio protéico BCA™ (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, Estados Unidos) ou pelo método de Bradford Protein assay (Bio-Rad).

3.5 Análise da expressão gênica

3.5.1 Extração de RNA

Os adipócitos isolados foram homogeneizadas em Vórtex com trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, Life Technologies, PA, Estados Unidos), na proporção de 1 mL para cada 500 µL de células, e armazenados a -80 °C. A extração de RNA total foi realizada segundo as indicações do fabricante (separação das fases, precipitação do RNA). A lavagem e purificação do RNA dos adipócitos isolados foi feita através de coluna, seguindo o protocolo do kit PureLink RNA Mini kit® (Cat. No. 12183-018A, Ambion by Life Technologies). O RNA total foi quantificado utilizando espectrofotômetro Epoch (Biotek®) ou NanoDrop (Thermo Scientific).

3.5.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Para a síntese do cDNA nos experimentos *in vitro* de adipócitos isolados foi utilizado 2 µg de RNA. A amostra foi tratada com DNase através da incubação com 0,32 uL de uma solução DNase diluída (2 uL de DNase [1U/uL], 1 uL DNase Buffer [10X], 7 uL água RNase free), 1,68 uL de MgCl₂ 50 mM e água RNase free para um volume de 20 µL, por 30 min a 37 °C (período de ativação da enzima) e 10 min a 75 °C (período de inativação por desnaturação proteica) – etapa realizada com a finalidade de evitar uma possível amplificação de DNA genômico advindo de contaminação.

A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa através da incubação em termociclador do RNA tratado com o seguinte mix de reagentes (Tabela 1). Os tubos foram incubados a 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. As incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf®, Hamburg, HH, Alemanha). O material obtido (cDNA [20 ng/µL]) foi então mantido em freezer a -20°C até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

Tabela 1. Proporção de reagentes durante transcrição reversa

Mix RT	Volume em µL / amostra
Tampão da enzima transcriptase reversa (5x)	10 uL
Ditiotreitol (DTT) 0.1 M	5 uL
dNTPmix - 2,5 mM/Base	10 uL
Random Primer (50 ng/uL)	1,3 uL
H ₂ O RNase free	3,2 uL
Enzima transcriptase reversa (Superscript® III)	0,5 uL

3.5.3 PCR quantitativo (real time)

Para os experimentos *in vitro* de adipócitos isolados: Alíquotas de 1 µL de cDNA (40 ng) obtidas a partir da reação de RT foram adicionadas a uma mistura contendo 3,5 µL de H₂O RNase Free, 5 µL de TaqMan® Universal PCR

Master Mix (Applied Biosystems, código do produto: 4304437, São Paulo, SP, Brasil), 0,5 µL de TaqMan® *Gene Expression Assay Mix* 20x (ver tabela 2) contendo os dois primers para PCR e uma sonda MGB TaqMan® marcada com FAM e um mix pré-formulado (20x). A tabela 1 mostra a lista dos kits inventariados utilizados com seus respectivos números de catálogo. As reações de PCR foram realizadas em aparelho Step One Plus® *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A reação de PCR iniciou-se com um período de 2 minutos para ativação da AmpErase® UNG seguida de 10 minutos a 95°C para a ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Essa fase só ocorre no primeiro ciclo de reação. As etapas seguintes envolvem desnaturação da fita de cDNA a temperatura de 95°C por 15 segundos, seguida da fase de anelamento do *primer* e extensão da fita por 1 minuto na temperatura de 60°C. Essas 2 fases se repetiram a cada ciclo por 40 ciclos (até 60 para amostras do experimento in vivo).

Tabela 2. Lista de primers Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay

Gene	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
Beta-2 Microglobulina	B2m	Rn00560865_m1
Uncoupling protein 1	Ucp1	Rn00562126_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Ppargc1a	Rn01430718_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Pparg	Rn00440945_m1
Cell death-inducing DFFA-like effector a PR domain containing 16	Cidea	Rn04181355_m1
Adrenoceptor beta 2	Adrb2	Rn00560650_s1
Adrenoceptor beta 3	Adrb3	Rn00565393_m1

Fonte: <http://www.appliedbiosystems.com>

3.5.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo ($\Delta\Delta CT$)

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando um gene constitutivo como referência. A seguinte fórmula foi usada para calcular a quantidade relativa do gene alvo:

$$\Delta C_T = C_T(\text{alvo}) - C_T(\text{constitutivo})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{amostra}) - \Delta C_T(\text{controle})$$

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.6 Análise estatística

Para os experimentos envolvendo quatro grupos foi utilizado One-way ANOVA entre tratamentos vs respectivo ponto 0. Para os experimentos envolvendo dois grupos foi utilizado teste t de Student. Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). A significância foi fixada em $P < 0,05$. O software utilizado foi o Graph Prism 5.0® (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, Estados Unidos).

4. METODOLOGIA II – Experimentos em células 3T3-L1

4.1 Descrição dos experimentos

Estes experimentos tiveram por objetivos específicos verificar mudanças na expressão de genes relacionados ao *browning* em adipócitos 3T3-L1 diferenciadas na presença de β HB (4 mM). Este modelo permitiu um tratamento mais longo do que os realizados nos experimentos com células adiposas isoladas (8 dias de tratamento) e que interferiu nas células durante todo o processo de diferenciação em adipócitos. Estes experimentos foram realizados no laboratório e sob orientação do Prof^o Dr^o Marcelo Augusto Christoffolete, Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC).

4.2 Cultivo, tratamento e diferenciação de células 3T3-L1

Utilizamos o protocolo de Zebisch et al., 2012. Em suma, células 3T3-L1 não diferenciadas foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro, na concentração de $1,2 \times 10^6$ (aproximadamente 57% de confluência). A quantidade de células foi determinada por câmara de Neubauer, através da seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ}\text{células/mL} = (\text{n}^{\circ} \text{ de células} / \text{n}^{\circ} \text{ de quadrados}) \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

As células 3T3-L1 não diferenciadas foram então mantidas em cultura em DMEM (Gibco, high glucose [25 mM], piruvato de sódio [1 mM], NaHCO_3 [3.7g/L], 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, pH 7.4) filtrado e adicionado de 10% de *New Born Calf Serum* (NBCS) até a confluência - momento que passa a ser denominado 'dia 0'. No dia 0, as células foram tratadas, ou não, com β HB ((\pm) -*Sodium 3-hydroxybutyrate*, Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos). A diferenciação das células em adipócitos foi induzida no segundo dia, através do seguinte cocktail: DMEM, 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, [0,5 mM]), insulina (1 μ g/mL), rosiglitazona (2 μ M) e dexametasona (0,25 μ M). Após 48 horas, no quarto dia, as células tiveram metade do meio substituído por DMEM, 10% FBS com insulina (1 μ g/mL). Após 48 horas, no sexto dia, as células tiveram

novamente metade do meio substituído, desta vez por DMEM a 10% FBS sem insulina. No oitavo dia, as células já apresentavam evidentes características de adipócitos, e expressão de marcadores de diferenciação relativamente altos (como aP2 e PPAR γ). As células foram mantidas todo o tempo em incubadora à 37°C com umidade de 80% e 5% de CO₂. As células foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Axio, modelo Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha). Experimentos independentes foram considerados n=1, sempre realizados em triplicata.

4.3 Análise da expressão gênica

4.3.1 Extração de RNA

Os adipócitos 3T3-L1 foram homogeneizadas em Vórtex com trizol (Trizol[®] Reagent, Invitrogen, Life Technologies, PA, Estados Unidos) e armazenados a -80 °C. A extração de RNA total foi realizada segundo as indicações do fabricante indicada no manual Trizol[®] Reagent (separação das fases, precipitação do RNA). O RNA total foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

4.3.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Nos experimentos com células 3T3-L1, a transcrição reversa foi feita utilizando-se o High-Capacity cDNA ReverseTranscription Kit (Life Technologies). Resumidamente, 2 μ g de RNA foi incubado por 10min a 70 °C com Oligo(dT) Primer (Invitrogen) e água (para 12 μ L). Após esta etapa, foi adicionado o mix, como segue na Tabela 2, e incubado por 10min a 25 °C, 120min a 37 °C e 5 min a 85 °C.

Tabela 3. Proporção de reagentes durante transcrição reversa High-Capacity cDNA ReverseTranscription Kit.

Mix RT	Volume em μL / amostra
10 x Buffer	2 μL
25x dNTP MIX (100mM)	0.8 μL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	1 μL
H ₂ O RNase free	4.2 μL

4.3.3 PCR quantitativo (real time)

Para os experimentos de células 3T3-L1, foram utilizados na amplificação, realizada com QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Germany) em mix contendo 0.1 μL de cDNA (200 ng), 6.25 μL de SYBR, 1 μL de primer de trabalho e 5,15 μL de água. (Vide primers na tabela 4). As reações foram feitas em tubos de 0.1 mL. As condições de ciclagem foram: 95 °C por 5 min, 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1min. 40 ciclos. O termociclador utilizado foi o Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Tabela 4. Lista de primers

Gene	Sense	Antisense
Ucp1	GGCAAAAACAGAAGGATTGC	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
Ppargc1a	TTGCCCAGATCTTCCTGAAC	TGAGGACCGCTAGCAAGTTT
aP2	AATCCCCATTTACGCTGATG	TCACCTGGAAGACAGCTCCT
Pparg	CGAGTCTGTGGGGATAAAGC	CAAACCTGATGGCATTGTGA
CycloA	GCCGATGACGAGCCCTTG	TGCCGCCAGTGCCATTATG

4.4 Análise estatística

Foi utilizado teste t de Student. Os dados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). A significância foi fixada em $P < 0,05$. O software utilizado foi o Graph Prism 5.0® (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, Estados Unidos).

5. METODOLOGIA III – Experimentos *in vivo*

5.1 Descrição dos experimentos

O objetivo aqui foi o de testar os efeitos dos corpos cetônicos *in vivo* sobre marcadores de *browning* em diferentes tecidos adiposos brancos (subcutâneo, epididimal e perirrenal) além do tecido adiposo marrom, através de um modelo experimental de cetose, sem alterações dietéticas como restrição de carboidratos ou aumento do consumo lipídico. Passa isso, foi aqui desenvolvido um modelo de suplementação com sais de β HB. Este modelo foi publicado em Caminhotto et al. (2017).

5.2 Padronização do modelo experimental

5.2.1 Indução aguda de cetose através da ingestão de sais de β HB

Segundo Kesl et al. (2016), a administração oral de sais de β HB (500 - 1000 mg/100g p.c.) não induzem um estado de cetose significativo em ratos Sprague-Dawley. A fim de testarmos a mesma hipótese, administramos via gavagem sais de β HB (300 mg/ 100g p.c.) e concomitantemente uma solução de glicose (75mg/100g p.c.) a fim de induzir inibição da cetogênese endógena. Os sais de β HB consistem em uma solução de aproximadamente 50% de β HB na forma de sais de sódio/potássio adquiridos da empresa Prototype Nutrition (Urbana, IL, USA). Ainda, um grupo controle recebeu, além da solução de glicose, uma solução salina (NaCl/KCl) nas mesmas concentrações e volume dos sais de β HB. A cetonemia e glicemia foram medidas nos tempos: 0', 15', 30', 60', 120'. A cetonemia foi mensurada através do aparelho *Freestyle Optium XCEED* (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, USA) utilizando *Freestyle Optium β -Ketone strips*; a glicemia foi mensurada através de glicosímetro (One Touch Ultra LifeScan, Milpitas, CA, USA).

5.2.1 Administração contínua e de longo prazo de sais de β HB

Dezenove ratos Wistar machos (9-10 semanas) foram divididos em 2 grupos experimentais. Nove animais foram destinados a um grupo controle; Dez animais receberam sais de β HB diluídos no bebedouro numa

concentração final de 4.2% por 4 semanas. A concentração de 4.2% de sais de β HB foi escolhida pelo resultado isotônico das concentrações de sódio e potássio da solução final (0.9% de Na^+/K^+). A cetonemia e glicemia foram acompanhadas semanalmente na manhã experimental (ZT 0- luzes acessas) e entre os ZTs 15-16 (aproximadamente 3 horas após início da noite experimental – luzes apagadas). Esses horários foram escolhidos devido à hipótese do maior consumo de sais de β HB por ingestão de água, o que normalmente ocorre nos períodos de maior consumo de alimento.

5.3. Obtenção de Adipócitos Isolados

Após completarem 4 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados por decapitação, após serem anestesiados com Tiopental (4mg/100mg de p.c.). A retirada dos coxins adiposos- Epididimal (EP), Subcutâneo abdominal/inguinal (SC), Perirrenal (PR), Mesentérico (ME) e Marrom (BAT de *brown adipose tissue*) - foi realizada mediante laparotomia mediana e da região interscapular para o BAT.

5.3.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica

Os adipócitos dos coxins EP, SC, PR e ME foram isolados como descrito no item 3.2.1.

5.4 Ensaio de atividade enzimática – Citrato Sintase

A atividade da enzima foi mensurada como descrito em 3.4. A quantidade de tecido homogeneizado foi de 0.3 gramas para os tecidos EP, SC e PR e 0.1-0.2 gramas para o BAT.

5.5 Análise da expressão gênica

Todas as etapas foram como descritas no item 3.5 e subitens. A quantidade de tecido utilizada foi de 0.1 gramas para todos os tecidos.

5.6 Análise do conteúdo proteico - *Western blotting*

Amostras dos coxins adiposos EP, SC, PR e BAT foram homogeneizadas em solução tampão (NaCl 1,5 M, KCl 0,2 M, MgCl₂ 0,2 M, EDTA 0,5 M, Na₄P₂O₇ 0,1 M, NaF 0,5 M, Triton X-100 20%, glicerol 75%, Na₃VO₄ 0,1 M, Tris 1,0 M, PMSF 0,2 M e coquetel com inibidores de proteases cOmplete®, pH 7,4). O homogenato foi centrifugado (12.000 rpm, 40 min, 0°C) e as proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford Protein assay (Bio-Rad). Quantidades iguais de proteínas totais (6µg para BAT, e 30µg para SC, EP e PR) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8 %, submetidas a eletroforese (100 V) e a eletro-transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (2 horas - 80 V). A membrana de nitrocelulose foi reversivelmente corada com ponceau-S para detecção das bandas de proteínas após a transferência. Em seguida, a membrana foi lavada com PBST (tampão salina fosfato com 0,1% de Tween-20), submetida ao bloqueio com leite em pó livre de gorduras por 1 h, para impedir ligações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo, e incubada com os anticorpos primários Anti-UCP1 (ab23841) (1:1000) *overnight* à 4° C. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000) por 75 min à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com PBST e submetidas à reação de quimioluminescência (ECL), para detecção dos blots. Os blots foram visualizados em fotodocumentador (Syngene G:BOX®) e analisados usando o programa Image Studio Lite ver 5.2. A densidade dos blots da proteína UCP1 foram normalizados pela proteína constitutiva vinculina (no caso das gorduras PR e BAT) e beta-actina (no caso das gorduras SC e EP).

5.7 Análise estatística

Foi utilizado teste t de Student ou Two-way ANOVA, pós -teste Bonferroni quando indicado. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). A significância foi fixada em $P < 0,05$. O software utilizado foi o Graph Prism 5.0® (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, Estados Unidos). Gráficos de correlação foram criados com o software Graph Prism 5.0®.

6. RESULTADOS

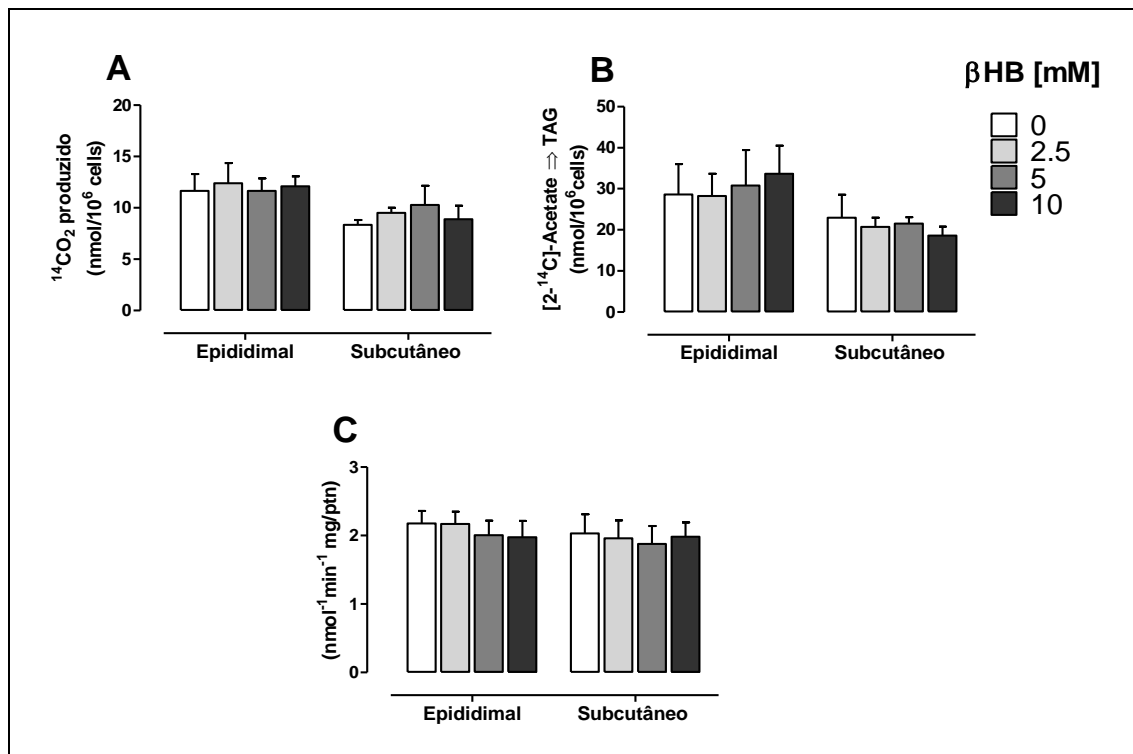
6.1 Concentrações fisiológicas de β HB não induzem o *browning* em adipócitos isolados

Espera-se um aumento do metabolismo celular e de marcadores de biogênese mitocondrial, além de um padrão específico na expressão gênica de adipócitos submetidos a um estímulo eficaz de *browning*. Por isso, avaliamos os efeitos das concentrações fisiológicas do corpo cetônico β HB (0, 2,5, 5, 10 mM) na capacidade dos adipócitos de oxidar um substrato energético ou incorporá-lo em lipídios (marcador de lipogênese) através de uma metodologia que utiliza um substrato energético radioativamente marcado (no caso, Acetato [$2\text{-}^{14}\text{C}$]). O acetato é um substrato bem usado pelo tecido adiposo (Feller, 1954) e foi escolhido para melhor refletir a capacidade mitocondrial de modo independentemente de outras rotas metabólicas, como glicólise e beta-oxidação, já que sua metabolização elimina a necessidade destas reações para iniciar o ciclo do ácido cítrico. Também, a atividade máxima da enzima citrato sintase foi aqui usada como um marcador da função mitocondrial, uma vez que está bem correlacionada com a massa mitocondrial e sua capacidade oxidativa (Rooyackers et al., 1996; Civitarese et al., 2007) e é constantemente considerada representativa de densidade mitocondrial (Sidossis et al., 2015).

Na Figura 2. nem os adipócitos do coxim epididimal nem os do tecido subcutâneo exibiram diferenças na capacidade oxidativa (A), lipogênica (B) e atividade máxima da citrato sintase (C) após 24 horas de incubação com diferentes concentrações fisiológicas do corpo cetônico β HB. Além disso, na Figura 3., a expressão gênica típica encontrada durante o estímulo eficaz de *browning* (aumento de *Ucp1*, *Cidea* e de reguladores transcricionais que governam o fenótipo marrom e biogênese mitocondrial, como *Ppargc1* e *Prdm16*) não ocorreu após 24 (A, B) ou 48 (C, D) horas de tratamento com β HB, em ambos tipos de células estudadas (epididimais [A, C] subcutâneas [B, D]). O mesmo foi encontrado com relação à expressão gênica de agentes permissivos ao *browning*, como os receptores PPAR γ e β -adrenérgicos. Por fim, na Figura 4., o tratamento prévio (24 horas) com β HB [5 mM] não demonstrou ter efeito permissivo no padrão gênico de *browning* induzido após

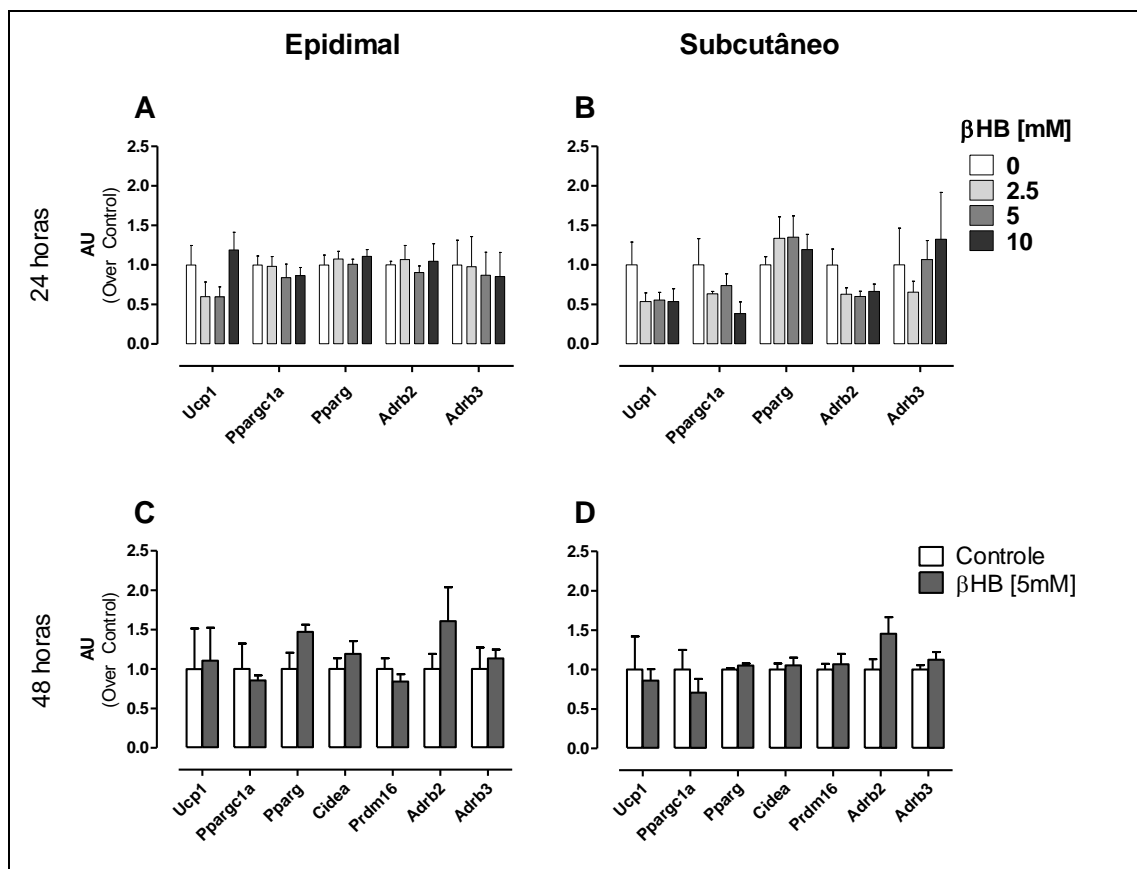
6 horas de incubação com agonista β -adrenérgico isoproterenol em adipócitos isolados de tecido adiposo visceral (A) subcutâneo (B). Como esperado, as células de gordura subcutânea responderam com maior intensidade do que os adipócitos epididimais ao estímulo (168 vs 99 para *Ucp1* e 37 vs 19 para *Ppargc1a*. [unidade arbitrária em relação ao controle, 1]).

Figura 2. β HB não alterou os marcadores de metabolismo de células adiposas isoladas.



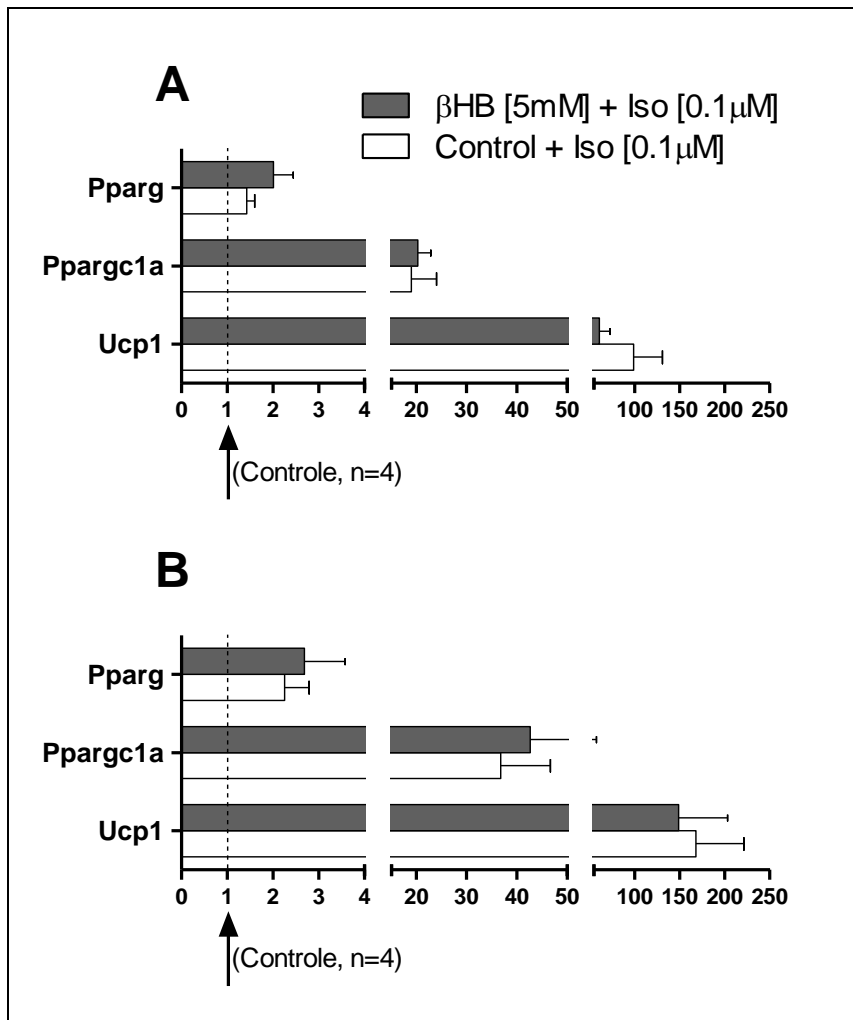
Adipócitos do tecido adiposo epididimal e subcutâneos foram incubados com concentrações fisiológicas [0, 2.5, 5, 10 mM] do corpo cetônico β HB durante 24 horas e tiveram sua capacidade oxidativa (A) e lipogênica (B) e atividade enzima citrato sintase (C) avaliadas. Nenhuma diferença foi encontrada. As barras representam médias \pm EPM dos grupos. (Testes de oxidação e lipogênese, n=4 para adipócitos epididimais e 3 para subcutâneos, resultado de 4 experimentos independentes; n=5 resultado de 3 experimentos para atividade enzimática) One-way ANOVA entre tratamentos vs respectivo ponto 0.

Figura 3. β HB não induziu o padrão gênico característico de *browning* em adipócitos isolados.



Adipócitos do tecido adiposo epididimal e subcutâneos foram incubados com concentrações fisiológicas do corpo cetônico β HB durante 24 (A, B) ou 48 (C, D) horas. Expressão gênica tipicamente encontrada durante estimulação do *browning* não ocorreu. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=5 resultado de 3 experimentos para o teste 24 horas; n=4 resultado de 1 experimento para 48 horas). One-way ANOVA entre tratamentos vs respectivo ponto 0 (A, B) e teste t de Student (C, D)

Figura 4. β HB não exerceu efeito permissivo sobre o *browning* induzido por via β -adrenérgica.

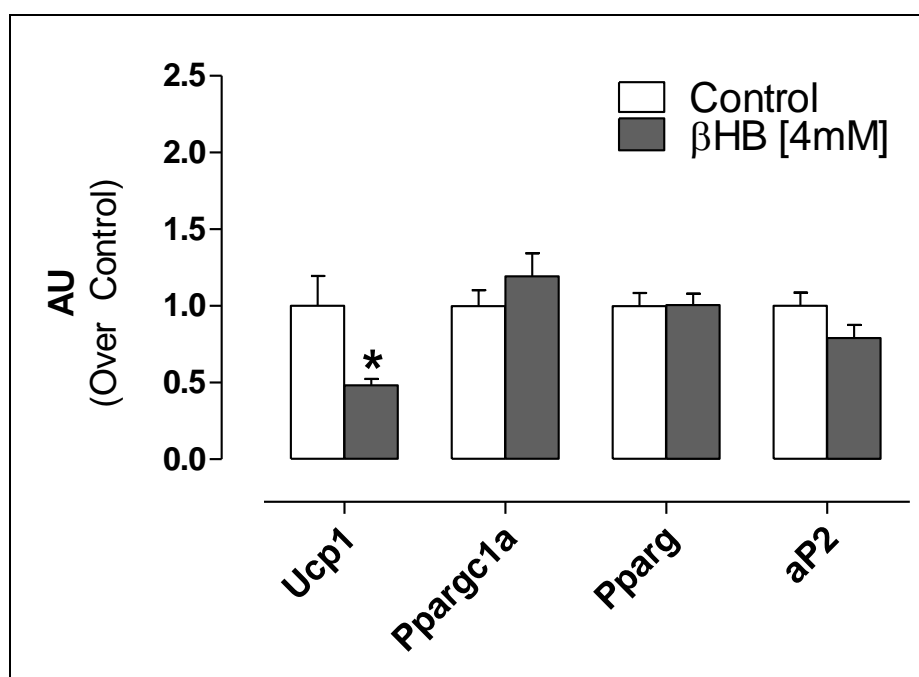


Adipócitos epididimais (A) e subcutâneos (B) foram tratados com o corpo cetônico β HB [5mM] durante 24 horas, lavados e incubados com o agonista β -adrenérgico isoproterenol (0.1 μ M/ 6 hours). Expressão gênica típica resultante de estímulos de *browning* ocorreu. Entretanto, nenhum efeito permissivo foi encontrado. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=4 resultado de 1 experimento). Teste t de Student.

6.2 β HB diminui a expressão de *Ucp1* em adipócitos 3T3-L1

A fim de definir se um tratamento de longo prazo com uma concentração fisiológica de β HB poderia induzir um padrão genético relacionado ao *browning*, células 3T3-L1 foram diferenciados em adipócitos na ausência ou presença de β HB [4mM]. Após 8 dias de tratamento, a expressão gênica da *Ucp1* foi 52% menor nos adipócitos 3T3-L1 ($p > 0,05$) tratados com o corpo cetônico (Figura 5). *Ppargc1a*, o gene da proteína PGC1 α , um importante regulador da biogênese mitocondrial, não foi alterado. Ainda assim, os genes *Pparg* e *Ap2*, ambos marcadores de adipogênese, também não foram alterados.

Figura 5. β HB diminuiu a expressão de *Ucp1* de adipócitos 3T3-L1.

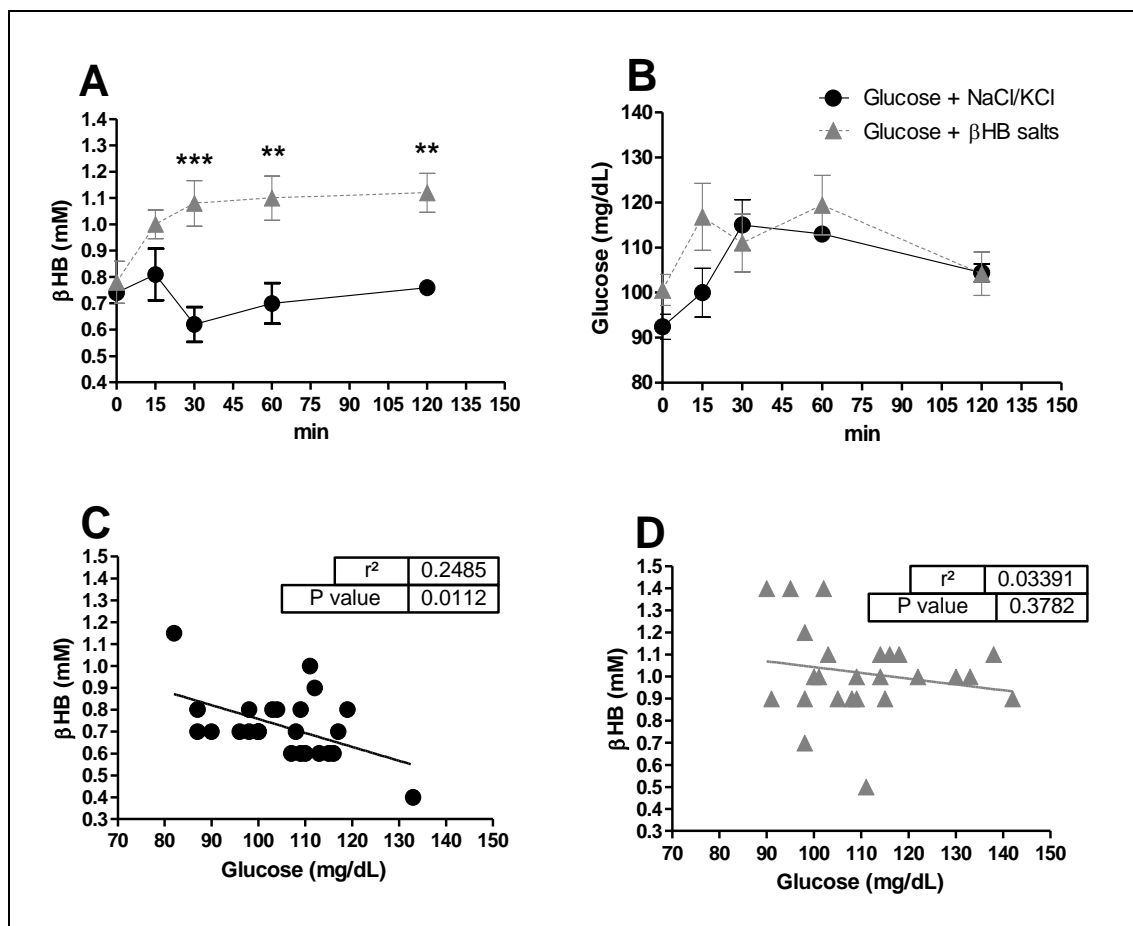


Adipócitos 3T3-L1 foram diferenciados na ausência ou presença do corpo cetônico β HB [4 mM]. Os níveis de *Ucp1* mRNA diminuiram ~52%. Nenhuma diferença foi encontrada com relação aos genes *Ppargc1*, *Pparg* and *aP2*. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=6 resultado de 6 experimentos). * $P < 0,05$. Teste t de Student.

6.3 A administração oral de sais de β HB induz aumento de cetonemia

Na figura 6. observamos que a administração oral de sais de β HB aumenta a cetonemia dos animais quando comparados a controles (A), mesmo durante concomitante administração de glicose (B), demonstrando que o aumento da cetonemia é causado pela suplementação dos sais de β HB, e não por síntese endógena. Ainda, os sais de β HB romperam a correlação negativa entre glicemia e cetonemia encontradas no grupo controle (C, D).

Figura 6. Sais de β HB aumentam a cetonemia

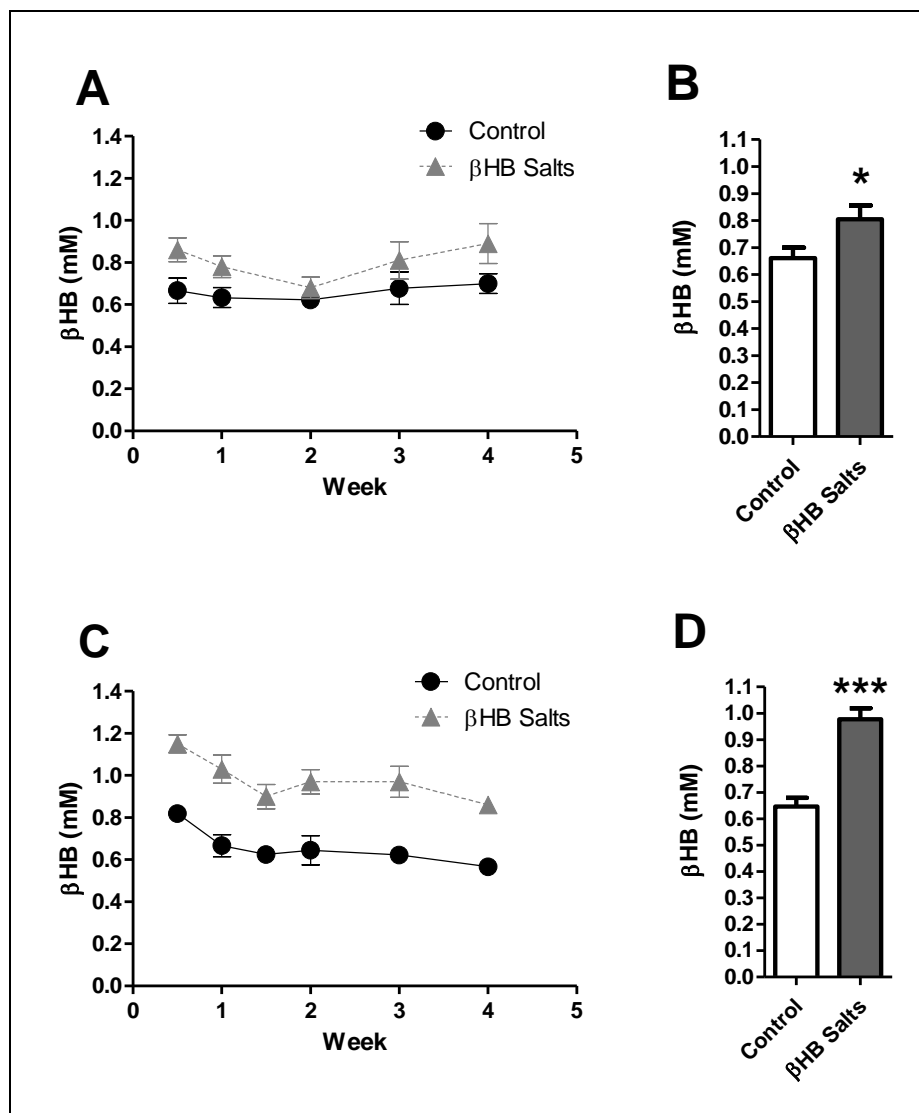


(A) Sais de β HB aumentam significativamente a cetonemia depois de 30 min e a mantém elevada durante ao menos 2h; (B) Sais de β HB não alteram a glicemia após sobrecarga de glicose.; (C) Correlação negativa entre glicemia e cetonemia foi rompida pelos sais de β HB (D). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=5 resultado de 1 experimento) - Two-way ANOVA, pós -teste Bonferroni;

6.4 Suplementação crônica com sais de β HB mantém a cetonemia elevada em diferentes momentos do dia

Na figura 7 observamos que a administração contínua da solução de sais de β HB (4.2%) no bebedouro promove aumento nas médias das cetonemias ao fim da noite e início da manhã experimental (dosagem realizada entre os ZTs 24-0).

Figura 7. Administração contínua de β HB aumenta a cetonemia ao longo do dia

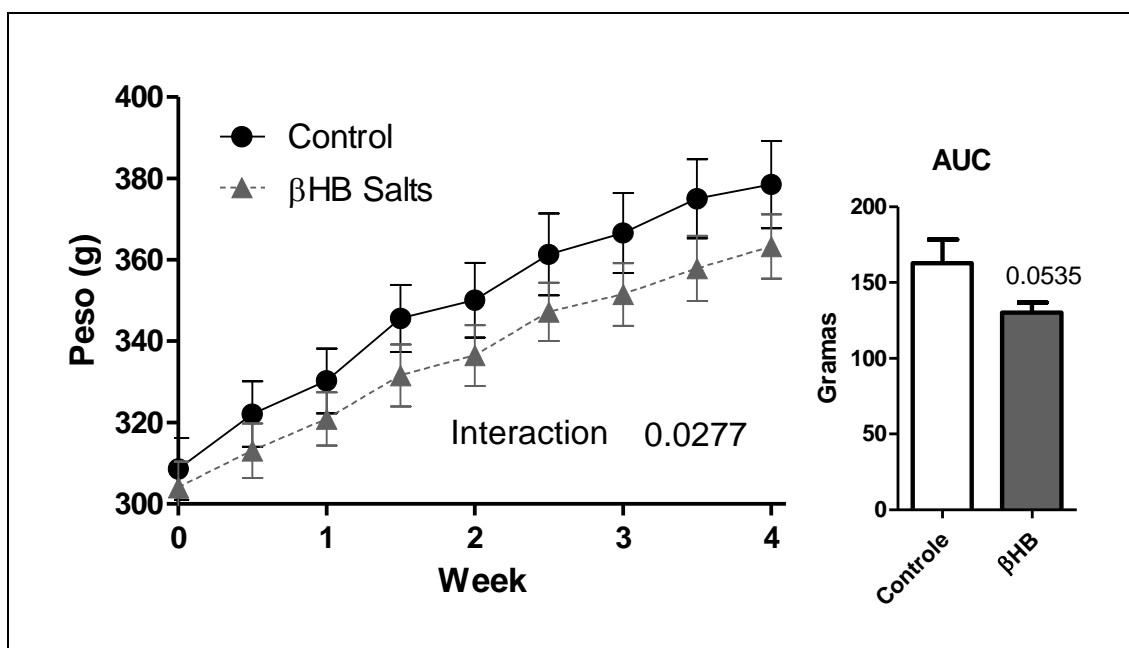


O consumo de uma solução de 4.2% de sais de β HB aumentou significativamente a cetonemia ao longo do dia durante todo o período de tratamento (4 semanas). As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=9-10 resultado de 2 experimentos). * p <0,05, *** p <0,001. (Test t-Student)

6.5 Os sais de β HB alteram a evolução ponderal dos animais

Na figura 8 observamos que a administração contínua da solução de sais de β HB (4.2%) no bebedouro promove mudanças na evolução ponderal ao longo de todo o tratamento (4 semanas), apesar de não haver mudanças significativas de massa corporal ao fim do experimento. (interação tempo x tratamento).

Figura 8. Administração contínua de β HB altera a evolução ponderal dos animais



O consumo de uma solução de 4.2% de sais de β HB (em azul) promoveu uma interação entre tempo x tratamento na evolução ponderal durante as 4 semanas de experimentação. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=9 resultado de 2 experimentos). Two-way ANOVA, pós -teste Bonferroni.

6.6 Caracterizações metabólicas do modelo de suplementação com sais de β HB: Consumo alimentar e parâmetros bioquímicos

Na tabela 5 observamos que a administração contínua da solução de sais de β HB (4.2%) no bebedouro não promove mudanças significativas na ingestão alimentar, enquanto claramente aumenta a ingestão hídrica.

Tabela 5. Comparação consumo hídrico, alimentar e calórico

	Control (n=9)	Sais de β HB (n=10)	<i>P</i> value
Consumo hídrico (mL/dia)	43.03 \pm 2.663	65.85 \pm 2.885	< 0.0001
Consumo alimentar (g/dia)	22.86 \pm 0.9987	20.77 \pm 0.6033	0.0836
Consumo calórico (kcal/dia)	94.0 \pm 4.190	96.64 \pm 2.541	0.5883

Média \pm erro padrão (Test t-Student)

Na tabela 6, a suplementação altera a lipidograma dos animais, com aumento significativo do HDLc e diminuição da razão LDL/HDL.

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos

	Controle (n=9)	Sais de β HB (n=10)	<i>P</i> value
Colesterol Total (mg/dL)	66.17 \pm 5.130	62.90 \pm 3.537	0,6071
HDLc (mg/dL)	18.53 \pm 1.291	25.76 \pm 1.592	<0,01
LDLc (mg/dL)	41.57 \pm 4.761	30.27 \pm 2.422	0,0503
LDL/HDL ratio	2.317 \pm 0.2956	1.192 \pm 0.09439	<0,01
TAG (mg/dL)	30.31 \pm 4.714	34.34 \pm 6.662	0,8208
Lactato (mmol/L)	1.17 \pm 0.248	2.49 \pm 0.539	0,2221
Glicerol (μ g/dL)	7.120 \pm 1.012	5.006 \pm 0.7562	0,1083
Ác. Graxos Livres (mmol/L)	0.5001 \pm 0.03249	0.3740 \pm 0.06784	0,1245

Média \pm erro padrão (Test t-Student)

Na tabela 7, a suplementação não alterou o peso do TAM e fígado.

Tabela 7. Peso de tecidos

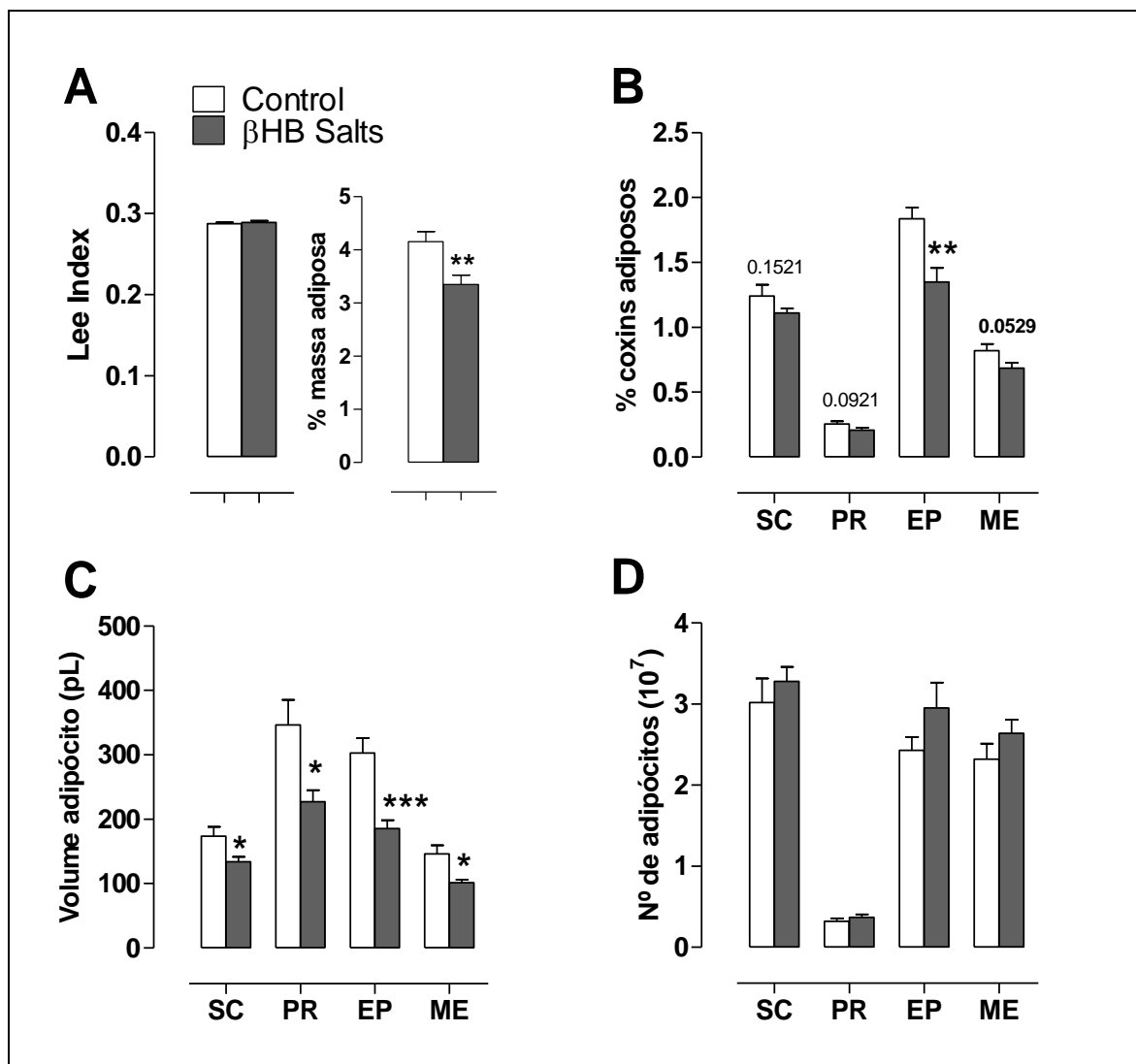
	Controle (n=9)	Sais de β HB (n=10)	<i>P</i> value
BAT (peso absoluto)	0.3743 \pm 0.02632	0.3644 \pm 0.02415	0,7869
BAT (% peso corporal)	0.1037 \pm 0.006796	0.1026 \pm 0.007214	0,9162
Fígado (peso absoluto)	10.94 \pm 0.4229	10.57 \pm 0.2422	0,4413
Fígado (% peso corporal)	3.058 \pm 0.1302	2.960 \pm 0.04122	0,4359

Média \pm erro padrão (Test t-Student)

6.7 Efeitos da suplementação crônica de sais de β HB nos tecidos adiposos: Diminuição de massa adiposa e volume celular

Na figura 9 observamos que a administração contínua da solução de sais de β HB (4.2%) no bebedouro por 4 semanas promove diminuição do % de massa adiposa (A), especialmente no coxim EP (B), apesar de não haver alterações no índice de Lee (A). Entretanto, uma diminuição generalizada no volume dos adipócitos foi observada (C). Nenhuma alteração significativa foi encontrada no número estimado de células adiposas por tecido (D).

Figura 9. Suplementação de sais de β HB altera a massa adiposa dos animais

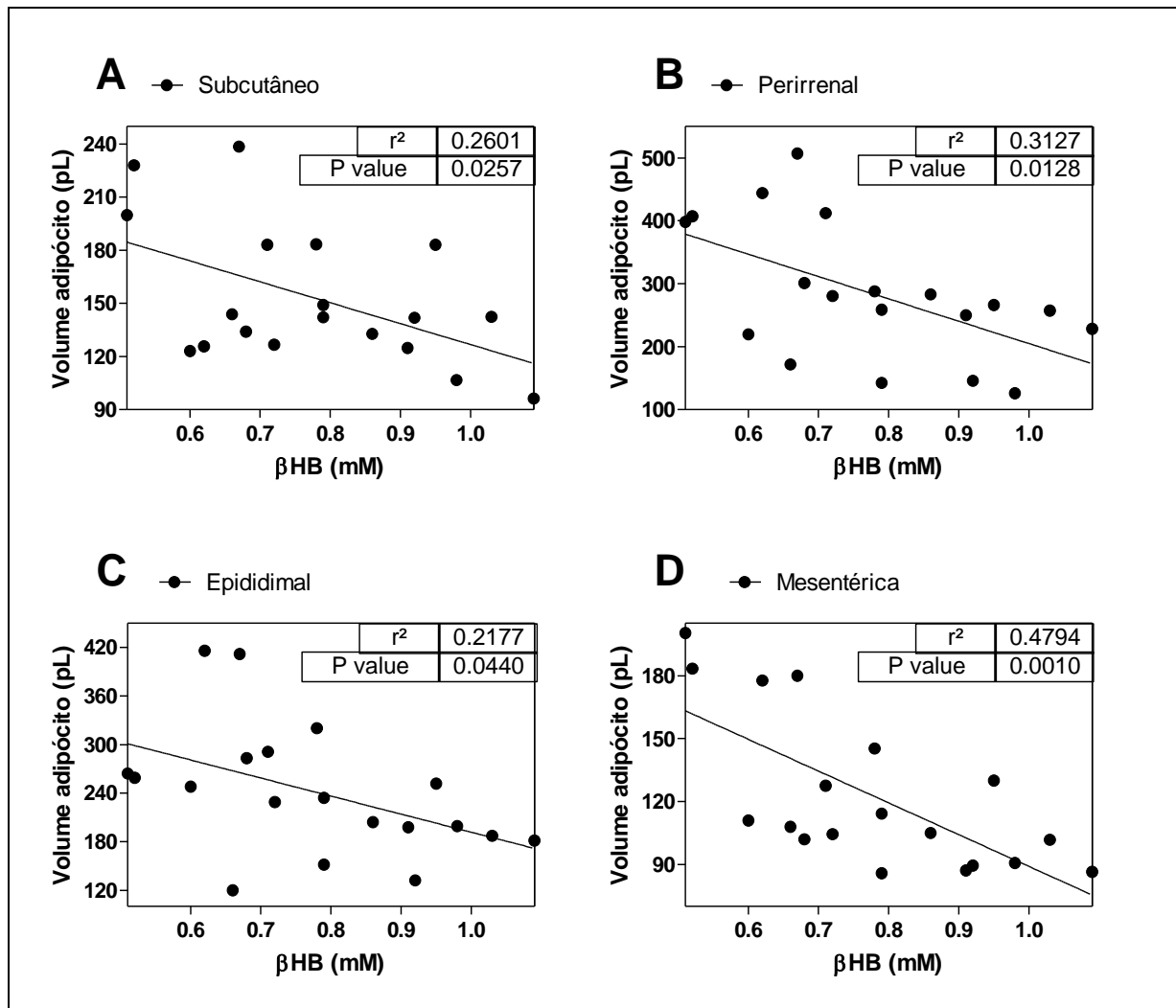


(A) O consumo de uma solução de 4.2% de sais de β HB (em azul) diminuiu o % de massa adiposa (A), em especial do coxim EP (B); (C) Diminuição generalizada do volume dos adipócitos nos coxins estudados (SC, PR, PE, ME). As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=9-10 resultado de 2 experimentos). (Test t-Student).

6.7.1 A cetonemia é inversamente correlacionada ao volume dos adipócitos e ao % corporal de massa adiposa

A média das cetonemias (média da cetonemia dos dois ZTs avaliados) é inversamente correlacionada ao volume dos adipócitos de todos os coxins estudados.

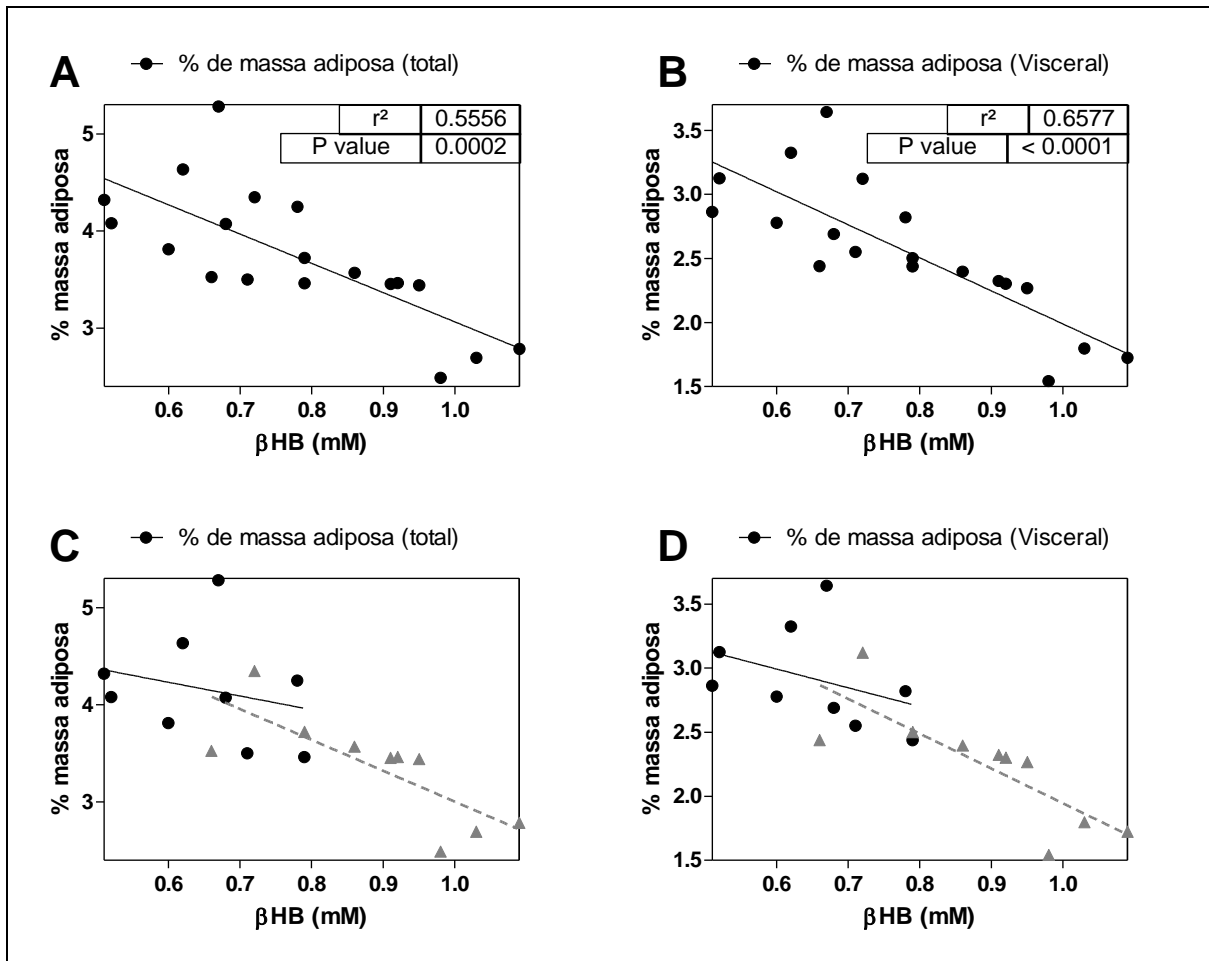
Figura 10. Correlação negativa entre cetonemia e volume de células adiposas:



As médias das cetonemias se correlacionam inversamente ao volume dos adipócitos de todos os coxins estudado (B, C, D). dados apresentados ponto a ponto. (n=19 resultado de 2 experimentos).

Por fim, existe uma correlação negativa entre a média das cetonemias o percentual de massa adiposa total (considerando os coxins SC, PR, EP e ME) e do % visceral (considerando PR, EP, ME).

Figura 11. Correlação negativa entre cetonemia e % de massa adiposa

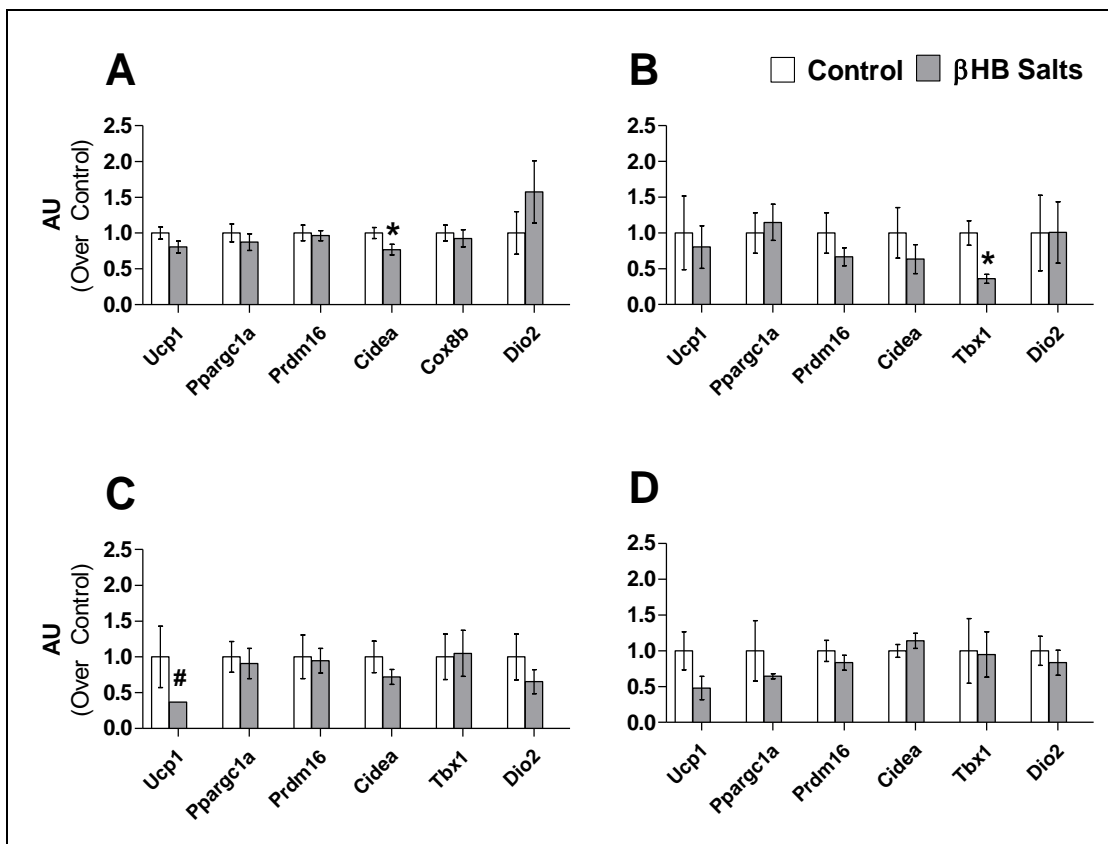


As médias das cetonemias se correlacionam inversamente ao % de massa adiposa, considerando todos os coxins estudados. Dados apresentados ponto a ponto. (n=19 resultado de 2 experimentos).

6.8 Efeito da ingestão de sais β HB em marcadores de *browning* em diferentes tecidos adiposos

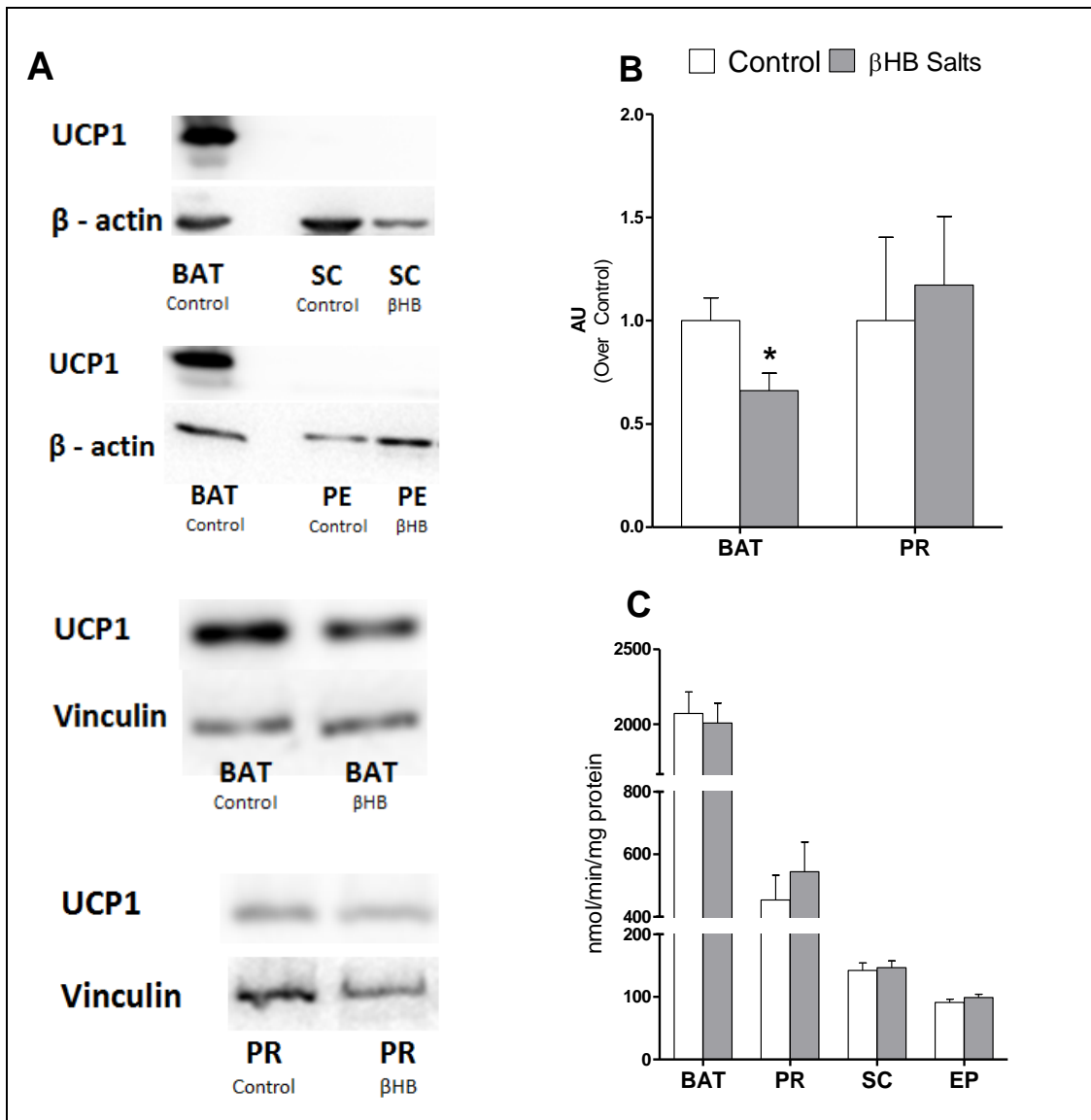
A administração oral de DL- β HB aumentam significativamente a cetonemia sem a necessidade de outras intervenções dietéticas. Assim, esse modelo foi aqui utilizado para determinar o efeito isolado de dos corpos cetônicos em marcadores de *browning* em diferentes coxins adiposos. Avaliou-se a expressão de diferentes genes (*Ucp1*, *Ppargc1a*, *Prdm16*, *Cidea*, *Cox8b*, *Dio2* e o gene específico dos adipócitos beges, *Tbx1*). Na Figura 12. os níveis de mRNA de *Ucp1* foram incapazes de serem detectados em 8 de 9 amostras de coxim subcutâneo de ratos tratados. Ainda, o mRNA do gene *Tbx1* diminuiu na gordura perirrenal (-64%) enquanto o do gene *Cidea* diminuiu 23% na gordura marrom. Na atividade máxima da citrato sintase, que é um marcador proteico de densidade mitocondrial, nenhuma alteração foi encontrada (Figura 13, C). Por fim, a expressão proteica de UCP1 não aumentou em coxins brancos, sendo inclusive indetectável nos coxins subcutâneo e epididimal (Figura 13, A). Por outro lado, a expressão de UCP1 foi 34% menor no tecido adiposo marrom de ratos tratados com DL- β HB.

Figura 12. Efeito da ingestão de β HB sobre os marcadores gênicos de *browning* em diferentes tecidos adiposos.



Ratos Wistar receberam DL- β HB por 4 semanas. A expressão gênica foi realizada em diferentes coxins adiposos. A gordura marrom exibiu 23% de diminuição no mRNA do gene *Cidea* (A); a gordura perirrenal teve 64% de diminuição do mRNA do gene *Tbx1* (B); a subcutânea teve menor expressão do gene *Ucp1* (-63%) (C); nenhuma mudança na gordura epididimal (D). As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=9 resultado de 2 experimentos). * $P < 0,05$; ** $p > 0,01$; Teste t de Student. # apenas uma amostra foi mRNA positiva para o gene *Ucp1*.

Figura 13. Efeito da ingestão de β HB sobre marcadores proteicos do *browning* em diferentes coxins adiposos.



Ratos Wistar receberam DL- β HB por 4 semanas. A expressão proteica foi realizada em diferentes coxins adiposos. As amostras das gorduras subcutânea (SC) e epididimal (EP) foram UCP1 negativas (A). No tecido marrom (BAT) a UCP1 diminuiu 34%, ($p > 0.05$) (B). Atividade da enzima citrato sintase não mudou (C). As barras representam médias \pm EPM dos grupos ($n=9$ resultado para atividade enzimática e 7 para western blot). Teste t de Student.

7. DISCUSSÃO

Através de estimulação adequada, diferentes modelos de adipócitos *in vitro* respondem com o desenvolvimento de um fenótipo bege. Em nosso estudo, 6 horas de incubação com um agonista β -adrenérgico aumentou a expressão de genes relacionados à programação termogênica e biogênese mitocondrial em adipócitos brancos (respectivamente, *Ucp1* e *Ppargc1a*). O mesmo ocorre em relação às células 3T3-L1 e durante protocolos *in vivo*, onde diferentes compostos e situações já foram testadas (veja exemplos em Baboota et al., 2014; Asano et al., 2014; Piao et al. 2018). Nessa temática, alguns efeitos dos corpos cetônicos já haviam sido estudados e os resultados levaram à conclusão de que, em altas concentrações, β HB poderia ser um forte indutor de *browning* (Carriere et al., 2014): Após sua captação pelas células, o β HB é metabolizado em uma reação reversível pela enzima β -hidroxibutirato desidrogenase formando acetoacetato que pode ser facilmente metabolizado até acetil-CoA (Newman & Verdin, 2014); isso influenciaria o estado redox intracelular, pelo aumento da redução de NAD^+ para $\text{NADH}+\text{H}^+$ (resultado da desidrogenação do β HB), o que Carriere et al., 2014 demonstrou induzir a expressão de *Ucp1* em adipócitos brancos. Dessa forma, esse resultado poderia ajudar a explicar a programação termogênica do tecido adiposo branco durante modelos animais de dieta cetogênica (Kennedy et al., 2007; Srivastava et al., 2013; Douris et al., 2017), onde a cetonemia aumenta significativamente, no entanto, nossos resultados são contrários a essa conclusão.

Aqui, o corpo cetônico β HB mostrou ser um composto ineficaz na indução de *browning* nos adipócitos, pelo menos no que se refere aos efeitos de suas concentrações fisiológicas. Além disso, o β HB não proporcionou um efeito permissivo no incremento dos marcadores de *browning* induzido por um agonista β -adrenérgico. Ainda, ao contrário do esperado, adipócitos 3T3-L1 diferenciados sob o tratamento β HB tiveram menor expressão do gene *Ucp1* e mantiveram marcadores de diferenciação de adipócitos inalterados, o que revela células de gordura maduras com um menor fenótipo bege. Ainda, nosso modelo *in vivo* de suplementação de sais de β HB, onde os efeitos dos corpos cetônicos podem ser isolados de outras modificações dietéticas, reproduziu o

comprometimento da expressão de *Ucp1* no tecido adiposo subcutâneo inguinal, coxim de gordura reconhecido como sendo particularmente suscetível à estimulação da programação termogênica em camundongos.

A diminuição do gene *Tbx1* (do inglês, *T-box 1*), específico e marcador de células adiposas beges, no tecido perirrenal também aponta para um efeito inibitório do *browning* pelo β HB. É notável que, em nossos resultados, a gordura perirrenal demonstrou ter maior expressão proteica de UCP1 (enquanto nas amostras de gordura subcutânea a UCP1 não foi detectável através da técnica de western blot), maior atividade da enzima citrato sintase e mesmo maior expressão de genes relacionados ao *browning* (dados não mostrados). Em camundongos, a gordura perirrenal também possui maior expressão de marcadores de programação termogênica quando comparada a outras gorduras brancas (vide suplemento de Fisher et al. 2012). Em ratos, não somos os primeiros a perceber que tais características termogênicas são mais intensas na gordura perirrenal do que na gordura subcutânea, ao menos na falta de estímulo para desenvolvimento do *browning* (Pereira et al., 2017).

Apesar dos resultados serem contrários aos encontrados até então sobre o tema (vide Carriere et al., 2014), embora em outro contexto, outros experimentos possuem resultados similares ao nosso. Através de infusão de β HB, em uma dose que produziu incrementos na cetonemia até valores fisiológicos (~ 1,2 mM), a expressão de *Ucp1* diminuiu no tecido renal (rins) de camundongos (Shimazu et al, 2013).

É concebível como o corpo cetônico β HB pode ter antes um efeito inibitório do que estimulatório, sobre marcadores de *browning*, como expressão de *Ucp1*. Os corpos cetônicos, particularmente o β HB, podem exercer efeitos diretos em células que expressam uma família de receptores de membrana 109A acoplados a proteína G (GPR109A). O receptor GPR109A responde a alguns agonistas exógenos, como a niacina, mas foi considerado um receptor órfão até a identificação do β HB como seu ligante endógeno, sendo então renomeado como receptor de ácido hidroxicarboxílico 2 (HCA2) (Tunaru et al., 2003; Taggart et al., 2005; Plaisance et al., 2009). Os receptores HCA2 são receptores de membrana acoplados a proteína Gi abundantemente expressos

em adipócitos e sua ativação, seja por niacina ou pelo β HB, diminui a formação de AMPc pela inibição da enzima adenilato ciclase – exato oposto da sinalização β -adrenérgica, via canônica do *browning* induzido pelos receptores β -adrenérgicos. Através deste receptor, o β HB e outros ligantes, como a niacina, são reconhecidos como inibidores da lipólise (Newman & Verdin, 2014; Plaisance et al., 2009), um efeito clássico que tem levado a utilização da niacina como um tratamento de dislipidemias, pela diminuição do fluxo de ácidos graxos, particularmente para o fígado, que promovem acúmulo hepático de lipídeos e influenciam negativamente na produção hepática de lipoproteínas, particularmente as aterogênicas, como VLDL e LDL. De fato, em nosso modelo *in vivo* de suplementação de sais β HB, existem correlações negativas entre os produtos de lipólise séricos (glicerol e ácidos graxos livres) e cetonemia (vide Caminhoto, et al., 2017) indicando, possivelmente, alguma ativação do receptor HCA2 pelo β HB, que por sua vez pode ser responsável pelo comprometimento da expressão da *Ucp1*.

Esses resultados estão de acordo com opinião atual de que os corpos cetônicos podem ser metabólitos sinalizadores da inanição envolvidos em eixos fisiológicos de preservação de energia, através de ações anti-catabólicas durante condições metabólicas desfavoráveis. Diminuição da mobilização de energia (inibição da lipólise), de utilização de glicose e de gasto de energético via diminuição do tônus simpático e expressão de *Ucp1* podem ser listados dentro dessas ações anti-catabólicas (Rojas-Morales, 2016). Efeitos na diminuição do catabolismo proteico também já foram descritos. A administração de sais de DL- β HB, em obesos submetidos à inanição terapêutica e/ou dietas baixíssima quantidade de energia (600 kcal), preserva a massa muscular durante a perda de peso e diminui a excreção de nitrogênio urinário, um marcador de catabolismo proteico (Pawan & Sample, 1983).

Ainda, além de ajudarem a entender os efeitos inibitórios em marcadores de *browning*, essas informações também podem explicar a diminuição da expressão de UCP1 (-34%) no tecido marrom dos animais suplementados. Esses resultados demonstram que a ativação da programação termogênica do tecido marrom de ratos suplementados com cetonas exógenas em Srivastava

et al. (2012) muito provavelmente é dependente: ou da restrição de carboidratos dietéticos, e nesse caso, não somente pelo aumento da cetonemia, ou de um aumento da cetonemia que ultrapasse as concentrações fisiológicas encontradas na dieta cetogênica (0.5 – 3 mM), como é o caso do estudo, onde a cetonemia alcançou um pico de 7 mM.

Curiosamente, o ácido graxo de cadeia curta butirato, que possui semelhanças estruturais com o β HB e ativa, inclusive, os mesmos tipos de receptores acoplados a proteína Gi, aumenta a expressão de UCP1 no tecido adiposo em camundongos suplementados (Gao et al., 2009). A maior diferença entre essas moléculas é uma hidroxila, grupo funcional responsável pelo *browning* no estudo já discutido de (Carriere et al., 2014). Todas essas informações tornam inconclusivo o mecanismo pelo qual o β HB induziu os resultados inibitórios nos marcadores de *browning* e expressão de UCP1 no tecido marrom. A perda de massa adiposa branca e a diminuição do volume dos adipócitos de diversos coxins estudados em nosso modelo de suplementação de sais de β HB apontam para algum aumento do gasto energético *in vivo*, uma vez que a ingestão calórica dos animais permaneceu a mesma. Não sabemos qual o papel do tecido adiposo marrom nesses resultados, bem como não descartamos outros possíveis efeitos da suplementação de β HB, como: perda de substratos energéticos pela urina (como a cetonúria, fenômeno típico de quando há elevação da cetonemia) ou mesmo possíveis efeitos via circuitaria neural entre intestino-cérebro (nervo vago), via recentemente descrita como responsável pelos efeitos de redução de apetite e ativação do gasto energético pelo butirato (Liz et al., 2018), o que, se confirmado, exclui o papel da cetose (aumento da cetonemia) no fenômeno discutido. Por fim, a reconhecida ação anti-lipolítica do β HB, bem como a já citada correlação negativa entre cetonemia e produtos séricos da lipólise, nos fazem questionar a contribuição termogênica da UCP1 nesse modelo, já que sua ativação se dá, dentre outros estímulos, sobretudo por ácidos graxos, resultantes de hidrólise intracelular (Fedorenko et al., 2012). Apesar disso, o β HB, em concentrações fisiológicas (~1.5 mM), possui um efeito permissivo no aumento da temperatura do tecido adiposo marrom induzido pela noradrenalina

(Cañas et al., 1997). A importância de tais inferências para os nosso resultado permanecem, por enquanto, desconhecida.

Reunindo todos os experimentos, os resultados apontam para a necessidade de outras hipóteses que não a ação direta dos corpos cetônicos para explicar o aumento da programação termogênica durante modelos de dieta cetogênica. Nesses modelos, os animais sofrem intensa modulação de diversos componentes endócrinos. Entre eles, encontram-se altas concentrações de fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), hormônio que foi identificado como um mediador necessário de muitas adaptações metabólicas à cetose (Badman, et al., 2009; Douris et al., 2017) além de também ser conhecido como indutor de programação termogênica em adipócitos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Fisher et al., 2012). Além disso, a baixa ingestão protéica (característica dietética de muitas dietas cetogênicas utilizadas para atingir cetose em modelos murinos) pode ser um estímulo da secreção de FGF21 e escurecimento do tecido adiposo (Pereira et al., 2017) efeito que, portanto, não necessariamente estaria relacionado ao componente cetogênico da dieta (como baixa ingestão de carboidratos / alta gordura ou cetonas em si). Por outro lado, em camundongos alimentados com dieta normoproteica enriquecida com ésteres de cetona, onde tanto o tecido adiposo marrom quanto branco têm seus marcadores do programa termogênica aumentados e a cetonemia atinge altas concentrações, aproximadamente 7mM (enquanto a cetonemia de uma dieta cetogênica é de ~ 1,5mM), não sabemos se intensa restrição de carboidratos ou o intenso aumento da cetonemia, ou a combinação de ambos, seria o responsável pelos resultados (vide Srivastava et al., 2012 – nesse estudo o carboidrato foi isocaloricamente substituído pelo éster cetônico). Também, recentemente foi demonstrado que a hiperinsulinemia prejudica a respiração mitocondrial e o desacoplamento do tecido adiposo marrom e branco subcutâneo (Dallon et al., 2018). É amplamente reproduzido que a dieta cetogênica induz intenso decréscimo da insulina sérica, resultado reproduzido no modelo de suplementação de ésteres de cetona (Srivastava, 2012; Srivastava, 2013). Assim, a participação da insulina neste processo não pode ser de todo descartada.

Em conclusão, embora as causas do *browning* durante dietas cetogênicas permaneçam inconclusivas, nosso estudo demonstra a incapacidade do principal corpo cetônico, em concentrações fisiológicas, ser responsável por esse fenômeno. Pelo contrário, em algumas situações, o β HB pode prejudicar a expressão de genes marcadores de *browning*, como *Ucp1*, e a expressão proteica de UCP1 no tecido marrom.

REFERÊNCIAS

Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1976;154:689-700.

Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, et al. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *J Vet Med Sci.* 2014;76:57-64.

Astrup A, Bülow J, Madsen J, Christensen NJ. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am J Physiol.* 1985;248:E507-15.

Baboota RK, Singh DP, Sarma SM, et al. Capsaicin induces "brite" phenotype in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *PLoS One* 2014; 9:e103093.

Badman MK, Koester A, Flier JS, et al. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology.* 2009;150:4931-40.

Barneda D, Planas-Iglesias J, Gaspar ML et al. The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife.* 2015;4:e07485.

Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:24-36.

Bielohuby M, Menhofer D, Kirchner H, et al. Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300:E65-76.

Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 2012;122:1022-36.

Cahill GF Jr Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 2006;26:1-22.

Caminhotto RO, Komino ACM, de Fatima Silva F, et al. Oral β -hydroxybutyrate increases ketonemia, decreases visceral adipocyte volume and improves serum lipid profile in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond).* 2017;14:31.

Cañas N, Sanchis D, Gómez G, et al. 3-Hydroxybutyrate co-infused with noradrenaline decreases resulting plasma levels of noradrenaline in Wistar rats. *J Exp Biol.* 1997;200:2641-6.

Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, et al. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 200;276:27077-82.

Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes*. 2014;63:3253-65.

Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med*. 2007;4:e76.

Cohen P, Levy JD, Zhang Y, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 2014;156:304-16.

Dallon BW, Parker BA, Hodson AE, et al. Insulin selectively reduces mitochondrial uncoupling in brown adipose tissue in mice. *Biochem J*. 2018;475:561-569.

Douris N, Desai BN, Fisher FM, et al. Beta-adrenergic receptors are critical for weight loss but not for other metabolic adaptations to the consumption of a ketogenic diet in male mice. *Mol Metab* 2017;6:854-62.

Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151:400-13.

Feller DD. Metabolism of adipose tissue. I. Incorporation of acetate carbon into lipids by slices of adipose tissue. *J Biol Chem*. 1954;206:171-80.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):271-81. Suppl Figures.

Gao Z, Yin J, Zhang J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1509-17.

Guerra C, Koza RA, Yamashita H, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102:412-20.

Hall KD, Chen KY, Guo J, et al. Energy expenditure and body composition changes after an isocaloric ketogenic diet in overweight and obese men. *Am J Clin Nutr*. 2016;104:324-33.

Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–1263.

Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab*. 2014;19:593-604.

Kajimura S. Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S11-4.

Kennedy AR, Pissios P, Otu H, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E1724-39

Kesl SL, Poff AM, Ward NP, et al. Effects of exogenous ketone supplementation on blood ketone, glucose, triglyceride, and lipoprotein levels in Sprague-Dawley rats. *Nutr Metab (Lond).* 2016;13:9.

Li Z, Yi CX, Katiraei S, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut.* 2018;67:1269-79.

Meidenbauer JJ, Ta N, Seyfried TN. Influence of a ketogenic diet, fish-oil, and calorie restriction on plasma metabolites and lipids in C57BL/6J mice. *Nutr Metab (Lond).* 2014;11:23.

Müller MJ, Enderle J, Bosy-Westphal A. Changes in energy expenditure with weight gain and weight loss in humans. *Curr Obes Rep.* 2016;5:413-23.

Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:42-52.

Newman JC, Verdin E. β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition.* 2017;37. 51–76.

Pawan GL, Semple SJ. Effect of 3-hydroxybutyrate in obese subjects on very-low-energy diets and during therapeutic starvation. *Lancet.* 1983;1:15-7.

Pereira MP, Ferreira LAA, da Silva FHS, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases browning in perirenal adipose tissue but not in inguinal adipose tissue. *Nutrition.* 2017;42:37-45.

Piao Z, Zhai B, Jiang X, et al. Reduced adiposity by compensatory WAT browning upon iBAT removal in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 501:807-813.

Plaisance EP, Lukasova M, Offermanns S, et al. Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E549-58.

Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, et al. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol* 2015;402:86-94.

Rojas-Morales P, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. β -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response? *Cell Signal.* 2016;28:917-23.

Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, et al. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:15364-9.

Rothwell NJ, Stock MJ. Luxuskonsumtion, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. *Clin Sci (Lond)*. 1983;64:19-23.

Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* 2012; 16: 348–362.

Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1269-78.

Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, et al. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab* 2015;22:219-27.

Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, et al. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 2013;5:1196-203.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 2013;339:211-4. Suppl 2

Srivastava S, Baxa U, Niu G, et al. A ketogenic diet increases brown adipose tissue mitochondrial proteins and UCP1 levels in mice. *IUBMB Life* 2013;65:58-66.

Srivastava S, Kashiwaya Y, King MT, et al. Mitochondrial biogenesis and increased uncoupling protein 1 in brown adipose tissue of mice fed a ketone ester diet. *FASEB J* 2012;26:2351-62.

Stubbs BJ, Cox PJ, Evans RD, et al. On the Metabolism of Exogenous Ketones in Humans. *Front Physiol*. 2017;8:848.

Taggart AK, Kero J, Gan X, et al. (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*. 2005;280:26649-52.

Tunaru S, Kero J, Schaub A, et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*. 2003;9:352-5.

Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17:691-702.

Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, et al. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life*. 2001;51:241-7.

Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012;150:366-76.

Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27: 234–250

Yancy WS, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2004;140:769-77.

Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012;425:88-90.

APÊNDICE I – CITOTOXICIDADE NOS MODELOS *IN VITRO*

1.1. Metodologia estudos in vitro

1.1.1 Teste de viabilidade celular (XTT ensaio colorimétrico)

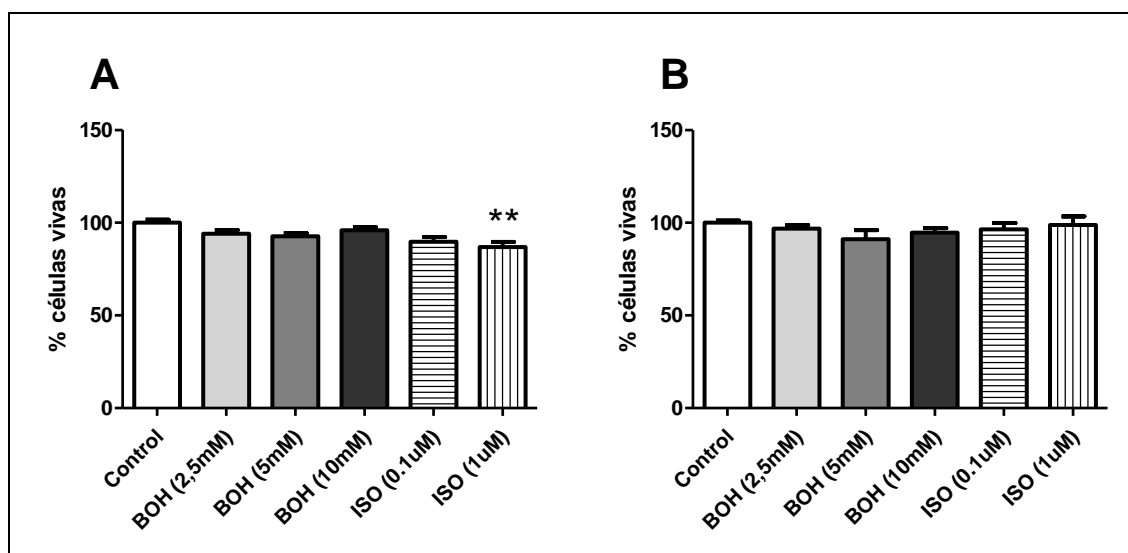
A viabilidade celular frente os tratamentos foi determinada pelo ensaio colorimétrico XTT de viabilidade celular (Cell Proliferation Kit II-XTT, Roche) de acordo com as instruções do fornecedor. Em suma, células tratadas foram incubadas na presença da solução XTT, que é metabolizado por células viáveis. Após a reação, o produto resultante é o corante de formazan, que é diretamente proporcional à atividade mitocondrial de desidrogenases, e portanto, também da viabilidade celular. A concentração de formazan foi determinada através de um leitor de placas de Elisa e os resultados foram expressos em percentual de células vivas.

1.2 Resultados

1.2.1 Viabilidade celular de adipócitos isolados

O efeito citotóxico das drogas utilizadas neste trabalho (β HB e Isoproterenol) foi testado durante incubação de 24 horas nos adipócitos isolados (EP e SC). Crescentes concentrações de β HB (2.5, 5, 10mM) e Isoproterenol (0.1, 1 μ M) foram utilizadas. Nenhuma das doses utilizadas de β HB demonstrou toxicidade. Apenas o isoproterenol diminuiu a viabilidade celular na dose de 1 μ M nos adipócitos da gordura epididimal.

Figura 7. XTT – Ensaio de Viabilidade Celular.

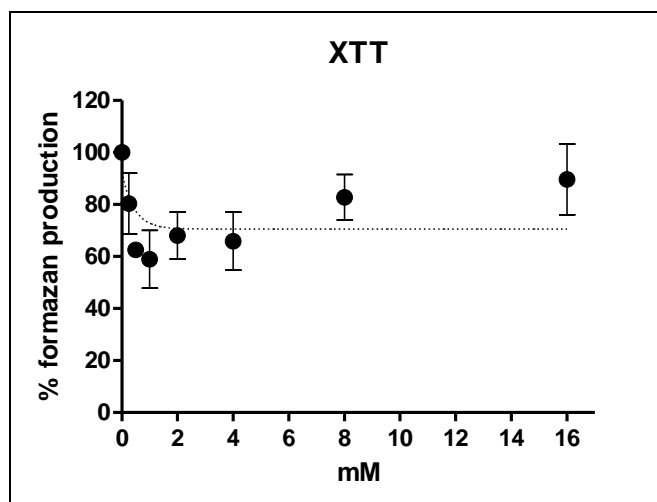


Percentual (%) da taxa de produção de formazan foi estimada em células adiposas isoladas e incubadas com 0, 2.5, 5 ou 10 mM de β HB por 24 horas. (A) Adipócitos da gordura EP; (B) Adipócitos da gordura SC. As barras representam médias \pm EPM dos grupos (n=6 – resultado de um experimento). * $p < 0,05$ vs Controle (One-way ANOVA, pós teste Bonferroni).

1.2.2 Viabilidade celular de células 3T3-L1

O efeito proliferativo/citotóxico do β HB foi testado em células 3T3-L1 não diferenciadas, cultivadas em placa de 24 wells (25% de confluência, $4,75 \times 10^2$ céls) privadas de soro bovino por 12 horas (feita com a intenção de reduzir a proliferação celular habitual e averiguar se o β HB possuía efeito estimulatório ou citotóxico). A incubação dose resposta foi feito por 48 horas seguida de teste de proliferação/viabilidade celular (XTT). Foi encontrada uma citotoxicidade média de aproximadamente 25% e não um efeito proliferativo.

Figura 8. Teste de viabilidade celular.



Células 3T3-L1 não diferenciadas foram privadas de soro bovino fetal por 12 e incubadas com doses crescentes de β HB por 48 horas. Foi verificada a indução de citotoxicidade de média de aproximadamente 25%.