



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde – FS
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas

MATHEUS GALVÃO ALVARES

AQUISIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO TERMOGÊNICO NA INFÂNCIA E
DESFECHOS METABÓLICOS NA VIDA ADULTA

Orientadora: Profa. Angélica Amorim Amato

Brasília – DF

2026

MATHEUS GALVÃO ALVARES

AQUISIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO TERMOGÊNICO NA INFÂNCIA E
DESFECHOS METABÓLICOS NA VIDA ADULTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Angélica Amorim Amato

Brasília – DF

2026

Matheus Galvão Alvares

AQUISIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO TERMOGÊNICO NA INFÂNCIA E
DESFECHOS METABÓLICOS NA VIDA ADULTA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de 2026.

Banca Examinadora

Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Dra. Louise Tavares Garcia Pereira – Corpo de Bombeiros do Distrito Federal

Dra. Flora Aparecida Milton – Universidade de Brasília

Dra. Paula Maria Quaglio Bellozi – Universidade de Brasília

Dedico esse trabalho todos que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus por toda força e saúde que me deu durante esses dois anos, foram muitas conversas que me mantiveram no caminho e me fizeram não desistir do meu sonho, mesmo com as dificuldades me fez permanecer firme, sei que tudo posso naquele que me fortalece.

À minha mãe que nunca duvidou da minha capacidade e me impulsionou a seguir os meus estudos, que sempre teve palavras de carinho e independente de qualquer coisa esteve do meu lado me apoiando; saber que permanecia do meu lado me levou à caminhos que jamais imaginei alcançar.

À minha orientadora Angélica que me acolheu como filho e mesmo não me conhecendo antes do mestrado me deu a oportunidade de crescer como profissional e como pessoa. Agradeço por segurar minha mão nos momentos de fraqueza e pela paciência que teve comigo, reconheço que sem a senhora nada disso seria possível. Para mim à tenho como inspiração.

Aos meus amigos Andressa e Vinícius, que durante esses dois anos não deixaram de estar presentes e se mostrarem tão interessados na pesquisa. Ter a companhia dos dois deixou o trabalho mais leve, obrigado por dedicarem o tempo de vocês a estarem nesse projeto comigo.

Ao Laboratório de Farmacologia Molecular que pôde me proporcionar momentos de aprendizados, com reuniões, debates de artigos, apresentações. Agradeço aos professores que fazem parte desse laboratório e promovem a pesquisa nacional de forma grandiosa. À técnica Rilva que esteve dando o suporte para a realização dessa pesquisa.

Ao veterinário Rafael, aos funcionários do CIEX e do biotério, Dérisson e Wilson, por toda a ajuda com os animais, vocês fizeram toda a diferença nesse processo. Aos camundongos, pequeninos com um propósito especial para a ciência.

Aos meus amigos e familiares que conviveram comigo e puderam me ouvir falar sobre como tudo era importante para mim e me apoiaram e me deram amparo para finalizar esse capítulo na minha vida.

A todos que participaram diretamente e indiretamente desse trabalho meus sinceros e mais verdadeiro agradecimento.

RESUMO

A obesidade é um problema global que aumenta o risco de diversas doenças crônicas e impacta tanto a qualidade de vida quanto os sistemas de saúde. Sua ocorrência resulta da interação complexa entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Evidências recentes indicam que fatores ambientais precoces, como a exposição a temperaturas mais baixas na infância, podem influenciar o desenvolvimento do tecido adiposo termogênico, potencialmente modulando o metabolismo e o risco de obesidade na vida adulta. Este estudo investigou, em camundongos C57BL/6, os efeitos da exposição precoce a temperaturas abaixo da termoneutralidade (8–14°C) sobre o recrutamento do tecido adiposo termogênico e suas consequências metabólicas na vida adulta. A pesquisa envolveu duas gerações de camundongos: a geração parental (F0) e sua prole (F1). Após o parto, as fêmeas F0 foram divididas aleatoriamente em dois grupos: um mantido a 25°C e outro transferido para temperatura entre 8–14°C a partir do 10º dia de vida da prole. A prole foi mantida nessas condições até o 50º dia de vida, quando parte dos animais foi eutanasiada para coleta de tecido adiposo branco inguinal e marrom interescapular para análises histológicas e de expressão gênica. O restante da prole foi mantido a 25°C e, a partir da 9ª semana, dividida para receber dieta controle (10% de lipídios) ou hiperlipídica (30% de lipídios), com avaliações semanais de peso corporal. Entre a 15ª e 16ª semanas, os animais foram submetidos a testes de tolerância à glicose e insulina, e na 26ª semana foram eutanasiados para análise final. Os resultados mostraram que a exposição precoce ao frio aumentou a quantidade de adipócitos multiloculares no tecido adiposo branco inguinal e elevou a expressão do RNAm da UCP1 em machos e fêmeas. Além disso, reduziu o ganho de peso em machos, independentemente da dieta, e o ganho de peso induzida por dieta hiperlipídica em fêmeas. Não foram observadas alterações significativas na tolerância à glicose em resposta à dieta em machos e fêmeas, porém no grupo exposto ao frio os camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram piora da tolerância à glicose quando comparados àqueles alimentados com dieta controle. Esse achado não foi acompanhado de alterações na sensibilidade à insulina. Não houve, ainda, modificações do gasto energético na vida adulta. Como conclusão, a exposição precoce ao frio promoveu o recrutamento de adipócitos termogênicos e modulou o ganho de peso em machos e fêmeas, sugerindo que estímulos ambientais durante fases críticas do desenvolvimento podem influenciar o fenótipo metabólico adulto. Esses achados indicam que o tecido adiposo termogênico adquirido na infância pode contribuir para a regulação do peso corporal, embora os efeitos sobre a homeostase glicêmica pareçam limitados e dependam do sexo. O estudo reforça a importância do ambiente precoce na prevenção da obesidade e na compreensão dos mecanismos que regulam o metabolismo energético.

Palavras-chave: Obesidade, tecido adiposo termogênico, exposição ao frio, intolerância à glicose.

ABSTRACT

Obesity is a global health problem that increases the risk of several chronic diseases and negatively impacts both quality of life and healthcare systems. Its development results from the complex interaction between genetic, environmental, and behavioral factors. Recent evidence suggests that early-life environmental factors, such as exposure to lower temperatures during childhood, may influence the development of thermogenic adipose tissue, potentially modulating metabolism and obesity risk in adulthood. This study investigated, in C57BL/6 mice, the effects of early exposure to temperatures below thermoneutrality (8–14°C) on thermogenic adipose tissue recruitment and its metabolic consequences in adulthood. The study involved two generations of mice: the parental generation (F0) and their offspring (F1). After delivery, F0 females were randomly divided into two groups: one maintained at 25°C and another transferred to 8–14°C starting on postnatal day 10 of the offspring. The offspring were maintained under these conditions until postnatal day 50, when a subset of animals was euthanized for collection of inguinal white adipose tissue and interscapular brown adipose tissue for histological and gene expression analyses. The remaining offspring were maintained at 25°C and, starting at week 9, were assigned to receive either a control diet (10% fat) or a high-fat diet (30% fat), with weekly body weight assessments. Between weeks 15 and 16, animals underwent glucose and insulin tolerance tests, and at week 26 they were euthanized for final analyses. The results showed that early-life cold exposure increased the number of multilocular adipocytes in inguinal white adipose tissue and increased UCP1 mRNA expression in both males and females. In addition, it reduced body weight gain in males regardless of diet and attenuated high-fat diet-induced weight gain in females. No significant alterations in glucose tolerance in response to diet were observed in males or females; however, within the cold-exposed group, males mice fed a high-fat diet exhibited impaired glucose tolerance compared with those fed a control diet. This finding was not accompanied by changes in insulin sensitivity. Furthermore, no modifications in energy expenditure were detected in adulthood. In conclusion, early-life cold exposure promoted thermogenic adipocyte recruitment and modulated body weight gain in both males and females, suggesting that environmental stimuli during critical developmental windows may influence the adult metabolic phenotype. These findings indicate that thermogenic adipose tissue acquired during early life may contribute to body weight regulation, although effects on glucose homeostasis appear limited and sex-dependent. The study reinforces the importance of the early-life environment in obesity prevention and in understanding the mechanisms that regulate energy metabolism.

Keywords: Obesity, thermogenic adipose tissue, cold exposure, glucose intolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeitos metabólicos da ativação do tecido adiposo termogênico.

Figura 2 - Desenho experimental do estudo *in vivo*.

Figura 3 - Fluxograma das etapas para isolar o RNA total usando o Pure Link® RNA Mini Kit

Figura 4 - Avaliação do peso corporal dos camundongos fêmeas durante o período de gestação, a partir do acasalamento realizado na idade de 20 semanas.

Figura 5 - Peso corporal e ganho de peso de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade.

Figura 6 - Ganho de peso de camundongos machos (até a 19ª semana de vida) e fêmeas (até a 16ª semana de vida) mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade.

Figura 7 - Teste de tolerância à glicose (TTG) de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade.

Figura 8 - Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade.

Figura 9 - Gasto energético por calorimetria indireta de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade.

Figura 10 - Análise do gasto energético de camundongos machos submetidos a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta controle.

Figura 11 - Análise do gasto energético de camundongos machos submetidos a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta hiperlipídica.

Figura 12 - Análise do gasto energético de camundongos fêmeas submetidas a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta controle.

Figura 13 - Análise do gasto energético de camundongos fêmeas submetidas a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta hiperlipídica.

Figura 14 - Características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular (A) e branco inguinal (B) de camundongos fêmeas e machos dos diferentes grupos experimentais.

Figura 15 - Expressão gênica de UCP1 dos camundongos expostos ao frio (8–14 °C) ou mantidos a 25°C.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa e seus respectivos volumes.

Tabela 2 - Condições de termociclagem durante a transcrição reversa de RNA em cDNA

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades.

Tabela 4 – Sequência de primers para determinação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos grupos experimentais do estudo e seus respectivos números amostrais.

Quadro 2 – Composição da dieta controle (AIN 93G).

Quadro 3 – Composição da dieta hiperlipídica.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
ATGL	Lipase triglicerídica adiposa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4
C/EBP β	CCAAT/proteína de ligação ao potenciador beta
C/EBP α	CCAAT/proteína de ligação ao potenciador alfa
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DNCT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
HSL	Lipase Hormônio-sensível
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MYF5	Fator miogênico 5
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos-1
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PRDM16	Domínio PR contendo 16
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PKA	Proteína quinase A
PGC-1 α	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
UCP1	Proteína Desacopladora 1
VIGITEL	Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
ZNF423	Proteína dedo de zinco 423

CLAMS	<i>Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System</i>
PAF	Fator Ativador de Plaqueta
AKG	Alquilglicerol
ATM	Macrófagos do Tecido Adiposo
AdBe	Adipócito Bege
TM	<i>Melting Temperature</i> (temperatura de desnaturação)

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

g/kg	Gramas por quilograma
%	Porcentagem
%v/v	Porcentagem em volume
°C	grau Celsius
g	Gramas
kcal	Quilocalorias
kcal/g	Quilocalorias por grama
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
H	Horas

SUMÁRIO

1. Introdução e revisão da literatura.....	17
1.1. Obesidade.....	17
1.2. Adipogênese e a diferenciação do tecido adiposo – ontogenia.....	18
1.3. Adipócitos termogênicos e seus papéis na homeostase metabólica.....	21
1.4. Influências ambientais no desenvolvimento do adipócito.....	24
2. Objetivo.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Metodologia.....	27
3.1. Modelo animal e dieta.....	27
3.2. Delineamento experimental.....	27
3.2.1. Acasalamento.....	30
3.2.2. Teste de tolerância a glicose e a insulina.....	31
3.2.3. Avaliação do gasto energético por calorimetria indireta.....	31
3.2.4. Expressão gênica.....	32
3.2.5. Análise histológica.....	37
3.2.6. Análise estatística.....	37
4. Resultados.....	39
4.1. Ganho de peso da geração F0 durante a gestação.....	39
4.2. Efeito da exposição ao frio durante o período de desenvolvimento sobre o peso corporal na vida adulta.....	39
4.3. Efeito da exposição ao frio durante o período de desenvolvimento sobre a homeostase da glicose na vida adulta.....	43
4.3.1. Teste de tolerância a glicose (TTG).....	43
4.3.2. Teste de tolerância a insulina (TTI).....	44
4.4. Efeito da exposição ao frio durante o período de desenvolvimento sobre o gasto energético na vida adulta.....	45
4.5. Efeito da exposição ao frio durante o período de desenvolvimento sobre o tecido adiposo.....	51
4.5.1. Características histológicas.....	51
4.5.2. Expressão do marcador termogênico UCP1.....	53

5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	61
7. Referências.....	62

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. OBESIDADE

Atualmente, a obesidade permanece sendo uma preocupação global que tem impacto significativo na qualidade de vida da população. Estatisticamente, mais de dois bilhões e meio de pessoas estão com sobrepeso ou obesidade (Caballero, 2019; World Health Organization, 2025). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade é definida como uma epidemia, impactando adultos, crianças e idosos, independentemente de gênero e teve seu aumento na população de modo gradual ao longo dos anos, com prevalência crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Okunogbe et al., 2022; Rimes-Dias et al., 2022; World Health Organization, 2025).

A obesidade é uma doença crônica e se estabelece pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo identificada em humanos pelo índice de massa corporal (IMC), obtido pela divisão do peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medida em metros (kg/m^2), um marcador que auxilia no diagnóstico da obesidade. Os valores de IMC descritos para um indivíduo de peso adequado estão entre $18,5 \text{ kg/m}^2$ e $24,9 \text{ kg/m}^2$, 25 kg/m^2 a $29,9 \text{ kg/m}^2$ para sobrepeso e $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ para obesidade (Caballero, 2019; Wen et al., 2022; World Health Organization, 2025). No entanto, mais do que um número, a obesidade representa uma condição multifatorial que envolve uma interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (Longo et al., 2019).

O excesso de gordura / tecido adiposo gera consequências consideráveis para a saúde pública e é um dos fatores de risco mais importantes para outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doenças vasculares, doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica, problemas respiratórios, problemas relacionados ao sono, problemas ósseos, resistência à insulina e até mesmo câncer (Ghaben & Scherer, 2019; Lustig et al., 2022; Rimes-Dias et al., 2022; Wen et al., 2022). A obesidade está entre os três fatores de risco mais fortemente associados às mortes e incapacidades no Brasil (Ministério da Saúde, 2022).

Apesar da prevalência ser crescente em diversos países, com indicadores quase triplicando nas últimas quatro décadas, essa doença crônica ainda parece ser invisibilizada no Brasil (Rimes-Dias et al., 2022).

Por meio de inquéritos de saúde conduzidos pelo Ministério da Saúde (2023) e a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

(Vigitel) foi constatado um acréscimo no percentual de adultos com obesidade no Brasil, com o marco de 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 20,3% no ano de 2019, entretanto dados mais recentes trazem que a prevalência saiu de 20,3% para 23,8% em 2023, evidenciando a crescente epidemia de obesidade (Ministério da Saúde & Vigitel, 2023). No conjunto de todas as unidades federativas, a frequência de sobrepeso foi de 55,4%, sendo ligeiramente maior entre homens (57,1%) do que entre mulheres (53,9%), e para a obesidade, a frequência foi de 19,8%, sendo 18,7% para homens e 20,7% para mulheres (Ministério da Saúde & Vigitel, 2023).

Em 2023, estima-se que aproximadamente 9,6% dos indivíduos com idade entre 18 e 24 anos e 17,2% entre 25 e 34 anos já viviam com obesidade. Entre a população idosa, a prevalência da condição foi ainda mais elevada, atingindo cerca de 22% das pessoas com 65 anos ou mais (Ministério da Saúde & Vigitel, 2023).

Comumente, o excesso de peso ocorre quando há uma ingestão de calorias maior do que o gasto energético, condição conhecida como balanço energético positivo e que leva ao acúmulo de tecido adiposo (Longo et al., 2019). Além de favorecer o aumento da massa de gordura subcutânea, a obesidade promove o acúmulo de tecido adiposo visceral, concentrando-se ao redor dos órgãos internos, como fígado, pâncreas, intestino e rins (Lustig et al., 2022). O tecido adiposo visceral, em comparação ao tecido adiposo subcutâneo, tem um impacto desfavorável no metabolismo, possui maior atividade lipolítica e inflamatória, levando a consequências como resistência à insulina e suas complicações (Lustig et al., 2022; Vishvanath & Gupta, 2019).

A remodelação do tecido adiposo na obesidade, com hipertrofia e hiperplasia, sobretudo visceral, induz a estresse celular que impulsiona a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e MCP-1, criando um estado inflamatório de baixo grau (Ghaben & Scherer, 2019; Lustig et al., 2022; Vishvanath & Gupta, 2019; Wen et al., 2022).

Além disso, a obesidade, pode alterar a produção e sinalização de hormônios reguladores do apetite, como a leptina e a grelina, interferindo na sinalização de saciedade. Simultaneamente, parece haver uma memória obesogênica que defende contra mudanças de peso corporal, gerando um ciclo em que a obesidade persiste (Hinte et al., 2024; Longo et al., 2019)

1.2. ADIPOGÊNESE E A DIFERENCIAÇÃO DO TECIDO ADIPOSE – ONTOGÊNEIA

Adipogênese é o processo em que células tronco mesenquimais se desenvolvem para a formação de adipócitos maduros funcionais (Ghaben & Scherer, 2019). Tal processo ocorre em dois estágios. No primeiro, a célula tronco mesenquimal passa a expressar fatores específicos que estabelecem a formação adipogênica, que incluem a proteína dedo de zinco 423 (ZNF423) (Gupta et al., 2010) e a proteína morfogenética óssea 4 (BMP4) (Otto & Lane, 2005). Esses fatores, por sua vez, promovem a ativação de genes pró-adipogênicos, incluindo o gene que codifica o Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ). Desta forma, a célula tronco mesenquimal que antes poderia se diferenciar em outros tipos celulares (Fu et al., 2019), agora restringe-se à linhagem dos adipócitos sem quaisquer alterações morfológicas, formando um pré-adipócito (Ghaben & Scherer, 2019; Gupta et al., 2010; Longo et al., 2019).

Após o direcionamento celular para a formação dos adipócitos, o pré-adipócito segue para o segundo estágio de diferenciação: torna-se responsivo a estímulos endógenos como insulina, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), glicocorticoides, entre outros (Ghaben & Scherer, 2019; Mandrup & Lane, 1997; Otto & Lane, 2005). Tais estímulos levam à ativação de vias de sinalização intracelular, como a via do AMPc/PKA e a cascata da MAPK, culminando na expressão de fatores de transcrição precoces, C/EBP β e C/EBP δ (fatores de indução pró-adipogênicos) (Mandrups & Lane, 1997). A diferenciação final é caracterizada pela função do PPAR γ , que estabelece o fenótipo funcional do adipócito, acumulando lipídios no citoplasma, o que marca morfológicamente o processo de maturação (Rosen & Spiegelman, 2014).

Desta forma, a célula de gordura agora passa a ter propriedades de expressão de adipocinas como a adiponectina, leptina, interleucinas, resistina, entre outros. Além disso, o adipócito maduro apresenta funcionalidade endócrina, participando da regulação do metabolismo energético (Ghaben & Scherer, 2019; Rosen & Spiegelman, 2014). Antes da diferenciação, as linhagens celulares de pré-adipócitos são morfológicamente semelhantes aos fibroblastos, alongados e com formato estrelado. No entanto, após a indução da diferenciação, as células perdem seu caráter fibroblástico e assumem uma aparência arredondada (Otto & Lane, 2005).

Ao final da adipogênese, o adipócito maduro está especializado em síntese, acúmulo e liberação de lipídios. O citoplasma torna-se progressivamente completo por

uma ou mais gotículas lipídicas, dependendo do tipo de adipócito (unilocular ou multilocular) (Ghaben & Scherer, 2019; Rosen & Spiegelman, 2014).

O adipócito unilocular caracteriza o adipócito branco, capaz de armazenar energia, e o adipócito multilocular caracteriza os adipócitos marrom e bege, capazes de promover a termogênese (Scheele & Wolfrum, 2020). A localização dos adipócitos bege e marrom é distinta: o tecido adiposo marrom (TAM) é mais localizado na região interescapular, já o adipócito bege surge em depósitos adiposos brancos (Ghaben & Scherer, 2019). Morfologicamente, o adipócito unilocular possui núcleo deslocado para a periferia e armazena uma única grande gota de lipídio, ocupando quase todo o volume celular. Os adipócitos multiloculares possuem quantidade maior de gotículas de lipídios e mitocôndrias que expressam em sua membrana a proteína desacopladora 1 (UCP1); esta, por meio do gradiente de prótons formado na cadeia respiratória de elétrons permite, a produção de calor (Holman et al., 2024).

Diferentemente do processo de formação do tecido adiposo branco, a origem do tecido adiposo marrom e adipócitos bege se inicia em uma linhagem celular distinta, o que leva em análise que suas diferenças de funcionalidades e características se expliquem por suas distinções ontogênicas (Shamsi et al., 2021).

Estudos anteriores observaram que o tecido adiposo marrom e alguns adipócitos bege estão mais próximos da linhagem muscular, em razão do descobrimento do marcador fator miogênico 5 (Myf5), marcador encontrado em linhagem celular destinada ao processo de formação dos mioblastos e que também origina o tecido adiposo marrom e adipócitos bege. Em contraste, o tecido adiposo branco não possui este marcador (Ghaben & Scherer, 2019; Shamsi et al., 2021). Esse achado reflete uma importante diferenciação no destino celular: a célula que expressa o Myf5 está destinada a seguir para a formação do músculo esquelético, porém, o direcionamento para a linhagem adiposa é determinado por fatores de transcrição e coativadores moleculares que interagem para suprimir o desenvolvimento miogênico e promover a expressão de genes associados à adipogênese e à termogênese (Shamsi et al., 2021). É importante destacar, contudo, que adipócitos bege também podem se originar de linhagens precursoras que não expressão o Myf5, indicando a heterogeneidade desse tipo celular (Wu et al., 2012).

Dentre os fatores que determinam a diferenciação da linhagem Myf5 para adipócitos marrons ou bege, destaca-se o domínio PR contendo 16 (PRDM16) e coativador 1 alfa do PPAR γ (PGC-1 α) (Kajimura et al., 2010). O PRDM16 é considerado o principal regulador de direcionamento e atua reprimindo genes miogênicos, como os

que codificam as proteínas MyoD e miogenina, enquanto ativa a transcrição de genes termogênicos, como *UCP1*, *CIDEA* e *ELOVL3*. Por outro lado, o PGC-1 α está correlacionado à biogênese mitocondrial e ao aumento da capacidade de oxidação de ácidos graxos, gliconeogênese e resposta ao estresse. A expressão de PGC-1 α é induzida tanto por PRDM16 quanto por estímulos fisiológicos, como o frio, ativação β -adrenérgica, e sua ação envolve a coativação de fatores nucleares, incluindo o PPAR γ , resultando na expressão de UCP1 e mitocôndrias com capacidade termogênica (Ikeda & Yamada, 2020; Kajimura et al., 2010). Ressalta-se que a elevada quantidade de mitocôndrias presentes nos adipócitos multiloculares possa se explicar por meio de sua linhagem similar à miogênica, com necessidade de alta produção de adenosina trifosfato (ATP), para tecidos com alta atividade metabólica (Kajimura et al., 2010).

Após a diferenciação em adipócitos marrons maduros, há formação de um tecido funcional, localizados principalmente em regiões interescapulares, perirrenal, paravertebral e cervical (Kajimura et al., 2010; Shamsi et al., 2021). Em contraste, como comentado anteriormente, o adipócito branco emerge em depósitos de tecido adiposo branco.

1.3. ADIPÓCITOS TERMOGÊNICOS E SEU PAPEL NA HOMEOSTASE METABÓLICA

Adipócitos termogênicos são células de gordura que apresentam a capacidade de gerar calor (termogênese), o que se deve a uma maior concentração de mitocôndrias no citoplasma (Ghaben & Scherer, 2019; Ikeda & Yamada, 2020). As mitocôndrias são organelas presentes em células eucariontes e encontram-se em maior quantidade em células metabolicamente ativas, pois estão envolvidas na produção de energia para sustentar suas funções (Ikeda & Yamada, 2020). Sua função principal é produzir energia, na forma de ATP, através da respiração celular. Para isso, utilizam principalmente glicose e ácidos graxos como fontes de energia, que são metabolizados com a finalidade de gerar moléculas como o NADH e o FADH₂, que alimentam a cadeia transportadora de elétrons (Ghaben & Scherer, 2019). Nos adipócitos multiloculares, entretanto, essa energia é também desviada para a ação da UCP1.

A UCP1 é uma proteína presente na membrana interna da mitocôndria, cuja ativação por origem de estimulação beta-adrenérgica (Ikeda & Yamada, 2020). Esse processo começa com a oxidação do NADH e do FADH₂, moléculas redutoras formadas

durante a glicólise e a β -oxidação de ácidos graxos, que liberam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE). Esses elétrons percorrem seguidamente os complexos I, II, III e IV da CTE, localizados na membrana interna mitocondrial, liberando energia que é utilizada para bombear prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente positivo (Ikeda & Yamada, 2020). Em células típicas, esse gradiente é utilizado pela ATP sintase (complexo V) para sintetizar ATP. No entanto, nos adipócitos termogênicos, a presença da UCP1 promove o desacoplamento da fosforilação oxidativa, permitindo que os prótons retornem à matriz mitocondrial sem a geração de ATP. Essa dissipação do gradiente de prótons pela UCP1 resulta na liberação de energia na forma de calor (Ikeda & Yamada, 2020).

Outro aspecto sobre o tecido adiposo marrom é a inervação pelo sistema nervoso simpático, cujas terminações liberam noradrenalina, que se liga aos receptores adrenérgicos $\beta 3$ localizados na membrana plasmática dos adipócitos termogênicos. A ativação desses receptores inicia uma cascata intracelular: a noradrenalina, ao se ligar ao receptor $\beta 3$ que está acoplado à proteína Gs, tem uma ação estimuladora, ativando a adenilato ciclase, seguida pelo aumento da concentração de AMP cíclico (cAMP) que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) (Wen et al., 2022). Essa via de sinalização tem efeitos múltiplos: promove a ativação da lipase hormonal-sensível (HSL) e da lipase de triglicerídeos adiposos (ATGL), levando à lipólise dos triglicerídeos das gotículas lipídicas e liberação de ácidos graxos livres. Esses ácidos graxos atuam como substratos para a oxidação mitocondrial e como ativadores diretos da UCP1, favorecendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa (Ghaben & Scherer, 2019; Ikeda & Yamada, 2020; Kajimura et al., 2010; Shamsi et al., 2021). De modo semelhante, adipócitos bege localizados em depósitos de tecido adiposo branco também são ativados pela noradrenalina, o que resulta em ativação da UCP1 e termogênese.

Portanto, com a ativação dos adipócitos termogênicos, ocorre a estimulação da lipólise, com o catabolismo de triglicerídeos e utilização dos ácidos graxos livres como fonte de energia e também para a ativação de UCP1 (Ikeda & Yamada, 2020). Ocorre, ainda, a indução da captação de glicose, que também fornece substratos para a cadeia transportadora de elétrons. A atividade da UCP1 resulta em aumento do gasto energético total. Esses mecanismos, em conjunto, promovem melhora da sensibilidade à insulina e favorecem a redução do peso corporal, caracterizando-se como uma estratégia terapêutica promissora para indivíduos com fenótipo obesogênico e resistência à insulina (Figura 1). (Kajimura et al., 2010; Kazak et al., 2015).

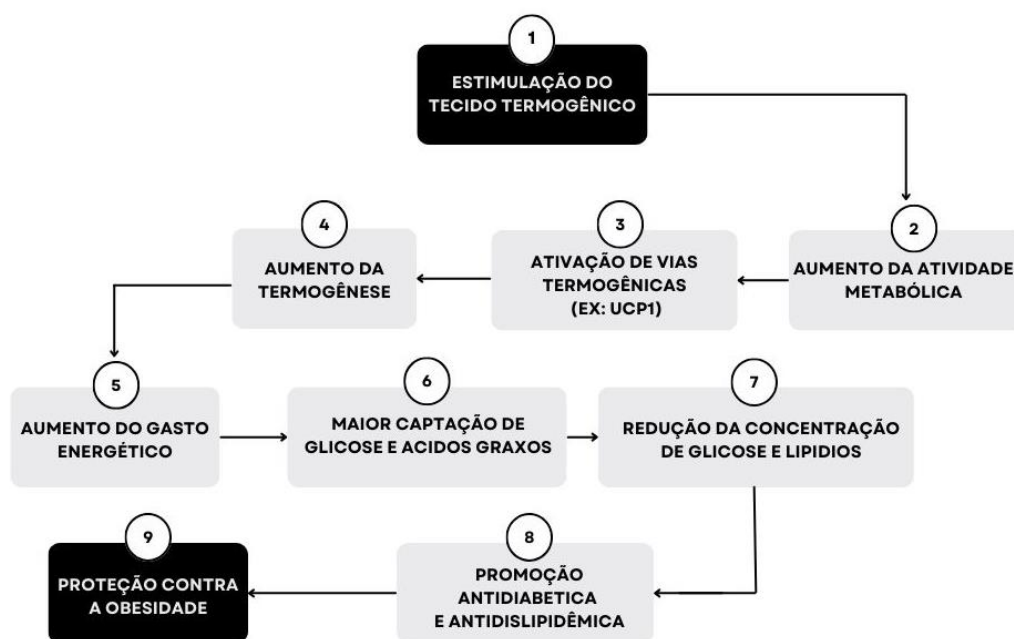


Figura 1. Efeitos metabólicos da ativação do tecido adiposo termogênico. O aumento da quantidade e/ou atividade do tecido adiposo termogênico conduz a aumento da atividade da UCP1 e, assim, a termogênese e aumento do gasto energético, que pode ter efeito antiobesidade. Neste processo, o tecido adiposo termogênico também aumenta a captação de ácidos graxos e glicose circulantes, que são oxidados ou estocados como triglicerídeos ou ácidos graxos, respectivamente. Isso resulta na diminuição da concentração sanguínea de glicose e ácidos graxos, que resulta em efeitos antidiabético e antilipidêmico. TAM: tecido adiposo marrom. Fonte: Adaptado por (Kim & Plutzky, 2016)

A quantidade de tecido adiposo termogênico (multilocular) depende da idade. Crianças possuem tecido adiposo multilocular em maior quantidade do que adultos, por serem menores e, com isso, perderem mais calor para o ambiente e, portanto, precisarem de maior ativação metabólica do tecido termogênico para se manterem em estado de equilíbrio térmico (Scheele & Wolfrum, 2020; Yu et al., 2019). Com o passar dos anos, o tecido adiposo marrom se diminui e na vida adulta resta uma pequena quantidade, mas com a permanência do adipócito bege (Holman et al., 2024; Yu et al., 2019).

O adipócito bege possui uma característica de plasticidade, a depender de influências como sobretudo a temperatura ambiente. O frio é o principal estimulador de sua ativação e produção de calor. Por outro lado, em condições de termoneutralidade, ou seja, a uma temperatura que não gere estresse térmico, não é necessário ativar mecanismos para produzir ou perder calor, e o adipócito bege tem uma tendência a se comportar mais como um adipócito branco (Holman et al., 2024). Os estímulos ambientais que promovem o recrutamento e ativação do adipócito bege, em especial o frio, resultam no amarronzamento ou “*beiging*” do tecido adiposo branco, caracterizado

por escurecimento desse tecido, em razão o aumento de seu conteúdo mitocondrial, e o aumento da expressão de genes termogênicos (Ikeda & Yamada, 2020; Pan et al., 2020)

Por ser uma célula com fenótipo variável dependendo dos estímulos, é observado que, apesar de o ser humano possuir uma quantidade menor de tecido termogênico depois da infância, se o tecido for exposto a um estresse metabólico, como a exposição ao frio, os adipócitos bege serão ativados e promoverão a sua atividade plena de termogênese (Holman et al., 2024; Pan et al., 2020).

1.4. INFLUÊNCIAS AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DO ADIPÓCITO

O desenvolvimento do tecido adiposo termogênico, especialmente o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo bege (AdBe), são altamente sensíveis às influências ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação, a fase neonatal e a primeira infância (Wen et al., 2022). Evidências científicas sugerem que estímulos precoces podem modular a quantidade e a atividade dessas células ao longo da vida, contribuindo para maior gasto energético basal e menor risco de obesidade na idade adulta (Cheng et al., 2021; Pan et al., 2020; Vishvanath & Gupta, 2019) .

A nutrição materna durante a gestação também exerce papel determinante (Yu et al., 2019). A ingestão adequada de nutrientes, especialmente de ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas lipossolúveis e aminoácidos essenciais, está associada à expressão gênica benéfica ao desenvolvimento do tecido adiposo branco no feto (Yan et al., 2014). Por outro lado, dietas maternas hipercalóricas ou com excesso de gordura saturada durante a gestação pode comprometer a formação e a funcionalidade do tecido adiposo termogênico da prole, aumentando a suscetibilidade à obesidade e à síndrome metabólica (Yan et al., 2014).

De acordo com Haidong Yu, et al., (2019), o leite materno de algumas espécies, como a humana e murina, apresenta lipídios do tipo alquilglicerois (AKGs). Estes, por sua vez, são ausentes em formulações infantis derivadas de leite de vaca. Os AKGs têm a capacidade de manter o tecido adiposo bege durante a infância, retardando sua transformação fenotípica e funcional em adipócito branco. Os AKGs são absorvidos pelo lactente e metabolizados pelos macrófagos do tecido adiposo (ATM) em fator ativador de plaquetas (PAF), que então induz a sinalização IL-6/STAT3 nos adipócitos,

promovendo o desenvolvimento de células adiposas bege, capazes de gerar calor (Yu et al., 2019).

Em estudos envolvendo camundongos, a ingestão de AKG durante o período neonatal levou a um aumento do tecido adiposo bege (AdBe), com maior expressão de UCP1 e PGC-1 α , maior número de mitocôndrias e menor acúmulo de gordura no tecido adiposo branco. Em camundongos adultos obesos (mas não em adultos magros), o tratamento com AKGs melhorou o perfil lipídico e aumentou a oxidação lipídica, ainda que sem alterar o gasto energético ou a atividade metabólica basal. Portanto, os AKGs constituem um sinal lipídico materno essencial para o desenvolvimento saudável do tecido adiposo infantil, contribuindo para proteção contra obesidade precoce (Yu et al., 2019). É possível, ainda, que a presença dos AKGs explique, pelo menos em parte, a proteção conferida pela amamentação contra obesidade em humanos.

Outro fator fisiológico de grande importância para a manutenção do tecido adiposo termogênico é o frio (Cheng et al., 2021; Ghaben & Scherer, 2019; Ikeda & Yamada, 2020; Pan et al., 2020). Pesquisas com modelos animais e humanos indicam que temperaturas mais baixas podem aumentar a diferenciação e atividade dos tecidos adiposos multiloculares, promovendo maior capacidade termogênica, estimulando a lipólise, fluxo sanguíneo para o adipócito e aumento do processo de respiração celular. Não se sabe, contudo, se à semelhança da exposição aos AKGs durante o período neonatal, a exposição precoce ao frio poderia impactar a saúde metabólica precoce e em etapas posteriores da vida.

Embora influências ambientais possam induzir a quantidade de tecido termogênico na infância (Yu et al., 2019), não se sabe se isso impacta o fenótipo metabólico na vida adulta. Nesse contexto, a proposta do presente projeto é investigar o efeito da exposição, durante etapas precoces da vida, a temperaturas inferiores à termoneutralidade, como forma de recrutamento do tecido adiposo termogênico nessa fase da vida, e avaliar seu impacto sobre desfechos metabólicos na vida adulta, em camundongos C57BL/6.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de variações da aquisição de tecido adiposo termogênico na infância, por meio da exposição ao frio, sobre desfechos metabólicos em camundongos C57BL/6.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da exposição ao frio (8-14°C) sobre a aquisição de tecido adiposo termogênico na infância, avaliada por análise histológica e expressão do RNAm que codifica a UCP1, e seu impacto na vida adulta em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, alimentados com dieta padrão e dieta obesogênica, por meio da avaliação dos seguintes desfechos:

- Massa corporal.
- Tolerância à glicose
- Sensibilidade à insulina.
- Gasto energético.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MODELO ANIMAL E DIETA

Para a realização do presente estudo foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas; os camundongos C57Bl/6 são animais com alta susceptibilidade à obesidade e constituem um modelo experimental que mimetiza a obesidade e suas complicações metabólicas em humanos (Buettner et al., 2007). Os camundongos foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com quatro semanas de idade, e compuseram a geração parental (F0) do estudo. Após a chegada destes animais ao Biotério da Faculdade de Medicina da UnB, eles passaram por um período de quarentena de uma semana e adaptação ao novo ambiente antes de sua utilização.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de plástico (mini-isoladores em estante ventilada com caixas multiespécie da Alesco Al20), com o número de 4 animais por gaiola, à temperatura de 25 °C, com ciclos claro-escuro fixos de 12/12 horas. O enriquecimento ambiental foi realizado pela introdução de um segmento de cano de PVC nas gaiolas e bolas de algodão no decorrer de todas as etapas do experimento. Os camundongos foram alimentados com ração AIN-93G, fornecida na forma de *pellet*. O fornecimento de ração e de água potável (filtrada) foi *ad libitum*.

Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília (Anexo I).

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A primeira geração de camundongos (F0) foi composta por 16 machos e 32 fêmeas, divididos aleatoriamente e por sexo em gaiolas (4 animais/gaiola). Na 10ª semana, as fêmeas foram divididas em dois grupos, aleatoriamente, com 16 animais em cada grupo, e foi realizado o acasalamento seguindo as recomendações do *The Jackson Laboratory* “[6 steps for setting up timed pregnant mice](#)”. Especificamente, o acasalamento entre machos e fêmeas foi realizado por meio da manutenção, em um mesmo mini-isolador, de duas fêmeas e um macho, durante três dias, num total de 16 casais. Após o período de três dias, os casais foram separados e retornaram às suas gaiolas originais. Após o acasalamento, as fêmeas foram avaliadas semanalmente quanto ao peso

corporal, até o parto. No 14º dia de gestação, as fêmeas foram individualizadas, tendo assim permanecido durante o restante da gestação e período de lactação.

No 10º dia de vida da prole (geração F1), as fêmeas com suas respectivas proles foram aleatoriamente divididas em dois grupos, contendo 16 camundongos cada. Um grupo a 25°C e o outro, a temperatura entre 8 e 14°C. No 24º dia de vida, a prole foi desmamada e machos e fêmeas separados aleatoriamente para distribuição em gaiolas contendo quatro a cinco animais. A prole foi mantida à temperatura anteriormente descrita (um grupo a 25°C e outro a 8-14°C) até a 8ª semana de vida, quando se inicia o período de vida adulta do camundongo C57BL/6. A partir desse período, todos os camundongos foram mantidos a 25°C. A Figura 2 apresenta o esquema do desenho experimental do estudo.

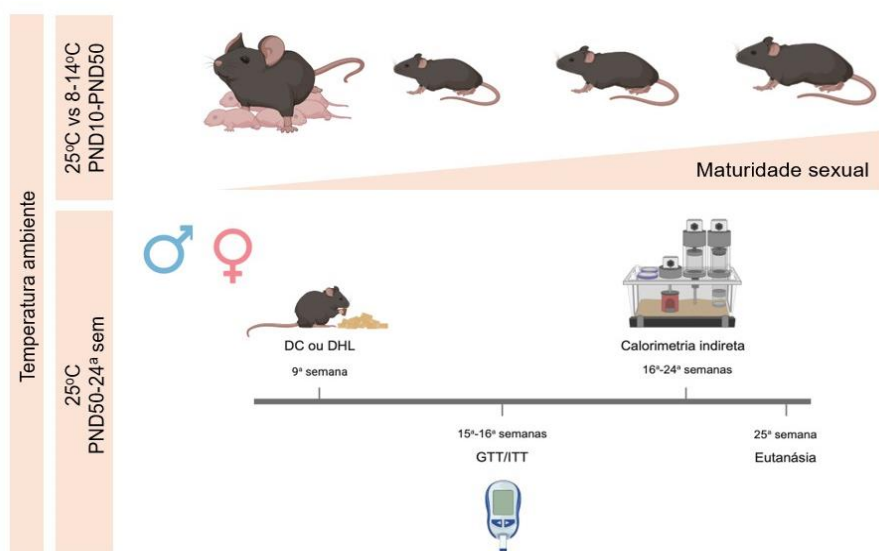


Figura 2. Desenho experimental do estudo *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram expostos a diferentes temperaturas; (8-14°C) e (25°C) desde o nascimento até a 8ª semana de vida, quando atingem a maturidade. A prole de machos e fêmeas foi alimentada com dieta controle (DC) ou hiperlipídica (DHL) a partir da 8ª semana de vida e avaliada quanto ao peso corporal, gasto energético, tolerância à glicose por meio do teste de tolerância à glicose (TTG) e tolerância à insulina por meio do teste de tolerância à insulina (ITT).

Para composição dos grupos experimentais com os camundongos da geração F1, foram consideradas somente as ninhadas que contenham 6 a 8 camundongos, com pelo menos dois representantes de cada sexo. Isso se deve ao impacto comprovado que o tamanho da ninhada e a distribuição de sexo têm sobre a trajetória de crescimento e composição corporal, o que pode gerar vieses quando são avaliados desfechos metabólicos (Chahoud & Paumgarten, 2009; Suvorov & Vandenberg, 2016). Ou seja, camundongos provenientes de ninhadas muito pequenas ou muito grandes apresentam

programação metabólica intrauterina diferente daquela de camundongos provenientes de ninhadas com tamanho habitual, o que impacta seu fenótipo metabólico na vida adulta. Esse efeito foi descrito por (Suvorov & Vandenberg, 2016) para a exposição a outras influências em períodos críticos do desenvolvimento e seu impacto no fenótipo na vida adulta (Suvorov & Vandenberg, 2016).

A prole foi avaliada semanalmente quanto ao peso corporal e ingestão de dieta. Na 8ª semana de vida, um grupo de camundongos (5 machos e 5 fêmeas) de cada exposição (25°C e 8-14°C) foi eutanasiado e isolados os depósitos de tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco inguinal para análise histológica e de expressão gênica.

O restante dos animais de cada grupo foi aleatoriamente dividido para receber dieta controle normolipídica (DC, 10% de seu conteúdo calórico representado por lipídeos) ou dieta hiperlipídica (DHL, 30% de seu conteúdo calórico representado por lipídeos) a partir da 9ª semana de vida. A composição das dietas normolipídica e hiperlipídica é apresentada no Anexo II. Dessa forma, foram compostos oito grupos experimentais, como descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos grupos experimentais do estudo, acompanhados durante a vida adulta, e seus respectivos números amostrais.

Exposição (10º dia – 8ª sem)	Sexo	Dieta	Número amostral
25°C	Masculino	Normolipídica	12
25°C	Feminino	Normolipídica	12
25°C	Masculino	Hiperlipídica	14
25°C	Feminino	Hiperlipídica	16
8-14°C	Masculino	Normolipídica	14
8-14°C	Feminino	Normolipídica	19
8-14°C	Masculino	Hiperlipídica	11
8-14°C	Feminino	Hiperlipídica	13

Entre a 13ª e a 14ª semanas de vida, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e, na semana seguinte, entre a 14ª e 15ª semanas de vida, ao teste de tolerância à insulina.

Entre a 17ª e a 20ª semanas de vida, quatro animais de cada grupo foram selecionados aleatoriamente com uso do programa random.org para avaliação do gasto energético. Para tanto, os animais foram transferidos para o equipamento denominado sistema de monitoração abrangente de animais de laboratório (*Comprehensive*

Laboratory Animal Monitoring System, CLAMS, Columbus®), onde foram mantidos em gaiolas individuais para determinação do gasto energético.

Na 25ª semana, os animais foram submetidos a anestesia com isoflurano (inalatório). Logo em seguida, foram submetidos a punção cardíaca para coleta de sangue e a eutanásia com aumento da exposição ao isoflurano. Em seguida, foi realizada dissecação dos seguintes tecidos: tecido adiposo branco inguinal, tecido adiposo branco visceral (epididimal nos machos e parametrial nas fêmeas), tecido adiposo marrom interescapular e fígado. Os tecidos foram armazenados para realização de expressão gênica e análise histológica. No presente estudo, serão apresentadas apenas as análises de expressão gênica e histológicas nos camundongos na 8ª semana de vida.

Os camundongos foram expostos ao frio em uma câmara climatizada equipada com sistemas de refrigeração que permitiam o controle da temperatura interna, a qual foi mantida entre 8 e 14 °C. A câmara continha estantes destinadas à acomodação das gaiolas dos camundongos. A câmara foi equipada, na parte elétrica, com um sistema de controle de iluminação, permitindo o estabelecimento de um ciclo claro/escuro. O período claro foi mantido das 06:00 às 18:00, enquanto o período escuro ocorreu das 18:00 às 05:59.

O manejo dos animais durante o tratamento foi de caráter observacional. De modo que diariamente um responsável realizava a verificação das condições das gaiolas, incluindo a avaliação da umidade e a disponibilidade adequada de água e alimento.

3.2.1. ACASALAMENTO

O acasalamento entre machos e fêmeas foi realizado seguindo-se o seguinte procedimento:

1. Três a quatro dias antes do acasalamento, os machos foram alojados de forma individualizada e as fêmeas na quantidade de duas por gaiola. Nesse mesmo período, foi inserida a maravalha das gaiolas das fêmeas nas gaiolas dos machos e vice-versa, para estímulo pelos ferormônios do sexo oposto.

2. Três dias depois, as duas fêmeas de cada uma das gaiolas foram alocadas em cada uma das gaiolas dos machos. Depois de três noites, foram separados os machos das fêmeas.

3. Depois de 10 a 14 dias, as fêmeas foram analisadas em relação à presença de gestação e, as que gestacionaram, mantidas em gaiolas individuais.

4. A partir dos 14 dias, as gaiolas foram checadas diariamente em relação à presença de filhotes e anotada sua data de nascimento.

As fêmeas foram analisadas semanalmente quanto ao peso para determinar a presença de gestação por meio do ganho de peso corporal (Heyne et al., 2015).

3.2.2. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA

O teste de tolerância à glicose foi realizado na 15ª semana de vida, após 6 semanas de exposição a DC ou DHL. Para isso, os camundongos foram mantidos em jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água. Para tanto, foi coletada amostra de sangue venoso da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero). Em seguida, os animais receberam solução de glicose (1 g/kg de peso corporal) por via intraperitoneal e foram submetidos a determinação da glicemia, com uso de glicosímetro e tiras reagentes, em amostra de sangue da cauda coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da solução de glicose.

Para o teste de tolerância à insulina, realizado na 16ª semana de vida, após jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água, foi coletada amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, os animais foram administrados a uma dose única de solução de insulina regular (0,5 UI/kg de peso corporal), por via intraperitoneal. Amostras de sangue venoso da cauda foram então coletadas após 15, 30, 60 e 90 minutos para determinação da glicemia em glicosímetro com tiras reagentes.

3.2.3. AVALIAÇÃO DO GASTO ENERGÉTICO POR CALORIMETRIA INDIRETA

Para avaliação do gasto energético, oito camundongos aleatoriamente selecionados de cada grupo foram submetidos à calorimetria indireta no sistema de monitoramento abrangente de animais de laboratório (*Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System*, CLAMS, Columbus®). Nesse sistema, os camundongos são alojados individualmente em gaiolas metabólicas fechadas e com fluxo de ar controlado. São realizadas medidas contínuas entre as diferenças das concentrações de oxigênio e gás carbônico entre o ar que entra e o que sai nas gaiolas, o que permite calcular o consumo de oxigênio e a produção de gás carbônico.

Os camundongos foram transferidos para as gaiolas metabólicas, onde foram mantidos durante 72 a 96 horas. As primeiras 24 horas das medidas de consumo de oxigênio e gás carbônico foram descartadas, por serem consideradas relativas ao período de aclimação. O gasto energético foi calculado com a utilização da equação de Weir modificada, por meio da determinação do produto do valor calórico do oxigênio ($3.815 + 1.232 \times \text{RER}$) e o consumo de oxigênio (VO_2), em que RER representa o quociente de troca respiratória (produção de gás carbônico / consumo de oxigênio).

3.2.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Foi realizada a análise da expressão de genes que codifica a proteína UCP1 no tecido adiposo branco subcutâneo inguinal e no tecido adiposo marrom interescapular. Para a realização deste procedimento, o RNA total dos tecidos foi homogeneizado em trizol. Em seguida, foi adicionado clorofórmio e realizada centrifugação a 12000 g durante 30 minutos. A fase aquosa, em que se encontra o RNA, foi isolada e a purificação do RNA foi realizada com a utilização do PureLink® RNA Mini Kit (ThermoScientific). A concentração e pureza do RNA foram analisadas por meio de um espectrofotômetro de microvolume NanoDrop™ One/One^c (ThermoScientific). A síntese de cDNA foi efetuada com o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoScientific), e a PCR em tempo real quantitativa foi realizada com o kit Power SYBR® Green 2X (ThermoScientific). O gene que codifica a proteína ribossomal 36B4 foi empregado como referência, e a expressão gênica relativa foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

- Isolamento do RNA total

Para isolamento do RNA total, à fase aquosa foi adicionado etanol 70% as amostras e essa mistura foi então homogeneizada em agitador de tubos (vórtex), para dispersar qualquer precipitado visível que possa ter formado após a adição de etanol.

As amostras foram transferidas para as colunas (com o tubo de coleta) e centrifugadas a 12000 x g, por 15 segundos à temperatura ambiente, para remoção de detritos celulares. Após isso, foi adicionado o tampão de lavagem I (*Wash Buffer I*) e as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, por 15 segundos à temperatura ambiente novamente. As colunas foram transferidas para um novo tubo de coleta. Em seguida, foi

adicionado o tampão de lavagem II com etanol (*Wash Buffer II*) e as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, por 15 segundos à temperatura ambiente mais uma vez. Esse procedimento foi realizado duas vezes. As colunas foram centrifugadas a 12.000 x g, por 1 minuto, para secar a membrana que o RNA está ligado e o tubo de coleta foi trocado por um microtubo de 1,5 mL.

Por fim, a água livre de RNase (*RNase-Free Water*) foi adicionada às colunas, que foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida, centrifugadas a 12000 x g, por 2 minutos à temperatura ambiente, para eluir o RNA da membrana para o microtubo de 1,5 mL. As amostras foram armazenadas no *freezer* a -80°C para posterior utilização (Figura 3).



Figura 3. Fluxograma das etapas para isolar o RNA total usando o PureLink® RNA Mini Kit. Fonte: [PureLink® RNA Mini Kit](#)

- Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada no espectrofotômetro de microvolume NanoDrop™ One/One^c (ThermoScientific), utilizando-se 1 µL da amostra de RNA purificado.

A concentração de RNA total foi fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, determinada pelo seguinte cálculo: $(DO\ 260\ nm \times 40) / 1000$, em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento de onda 260 nm. O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, foi calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de

onda 260 e 280nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras com grau de pureza entre 1,7 e 2,0, visto que estes valores representam baixa contaminação com proteínas.

- Síntese de cDNA a partir de RNA

Para a realização da análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativa em tempo real, é necessário que o RNA purificado das amostras seja convertido em cDNA de fita simples por meio da transcrição reversa (TR). O cDNA foi sintetizado utilizando kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoScientific)*.

Os reagentes que compõe esse kit e foram utilizados neste ensaio estão apresentados na Tabela 1. Os reagentes foram colocados no gelo para descongelamento e posterior uso. A partir desses componentes e seus respectivos volumes, foi manipulado o mix de TR, de acordo com as recomendações do fabricante, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa e seus respectivos volumes.

Reagentes	Volume/ reação (µL)
<i>10x RT buffer</i>	2
<i>25x dntp mix (100mm)</i>	0,8
<i>10x RT random primers</i>	2
<i>Multiscribe™</i>	1
<i>Reverse transcriptase</i>	1
<i>Rnase inhibitor</i>	1
<i>Nuclease-free H₂O</i>	3,2
Total por reação	10

No preparo das reações de TR de cDNA, foi pipetado 10 µL do mix de TR e 10 µL da amostra de RNA na parede de cada microtubo, totalizando 20 µL de volume final da amostra. Os microtubos foram centrifugados rapidamente para eliminar qualquer bolha de ar e colocados no termociclador. As condições de termociclagem durante a TR estão apresentadas na tabela. As condições de termociclagem durante a TR estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de termociclagem durante a transcrição reversa de RNA em cDNA.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

- PCR (reação de polimerase em cadeia) quantitativa em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o kit Power SYBR® Green 2X (*ThermoScientific*). O produto de amplificação de cada amostra foi determinado pela utilização do SYBR Green, um fluoróforo que se intercala na dupla fita de DNA e, quando excitado por luz, emite fluorescência, de forma que a intensidade do sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do produto de amplificação na amostra, a cada ciclo da PCR. O sinal fluorescente é detectado por um detector no equipamento de PCR e, ao final da reação, é possível determinar o Ct (*cycle threshold* / ciclo limiar), que corresponde ao número de ciclos de reação necessários para a amplificação tornar-se exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*), em duplicatas, para volume final de 10 µL, de acordo com instruções do fabricante. Uma reação controle negativo, ou seja, sem amostra de cDNA, foi realizada para cada par de *primers* a fim de verificar possíveis contaminações. Os reagentes utilizados na reação estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades.

Reagentes	Volume (µl)
Mix power SYBR green® PCR (2x)	5
cDNA 5 ng/mL	2
Primer forward 10 µm	0,5
Primer reverse 10 µm	0,5
Água milli-q	2
Total	10

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). As sequências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<i>Primer</i>	<i>Primer Forward (3'-5')</i>	<i>Primer Reverse (3'-5')</i>
UCP1	ACTGCCACACCTCCAGTCATT	CTTTGCCTCACTCAGGATTGG
36B4	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT

As condições de termociclagem durante a PCR foram:

- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos) e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);
- Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): realizado após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação *T_M* (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR se apresenta 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A *T_M* é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado.

A expressão relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo ΔC_t , com normalização para o gene referência *36B4*. Para isso, os valores de *C_t* obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do *C_t* obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*36B4*), sendo obtido o ΔC_t .

$$\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ gene referência}$$

A quantificação relativa de cada gene alvo foi expressa por meio da fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

3.2.5. ANÁLISE HISTÓLOGICA

Para a análise histológica, as amostras de tecidos (adiposo e hepático) fixadas em paraformaldeído (4%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) foram desidratados em uma série de concentrações crescente de álcool etílico, diafanizado com xilol e incluído em parafina, com o auxílio do histotécnico Oma DM-40. Foram feitos cortes de 5 μ m de espessura, de forma seriada a cada 25 μ m de profundidade, no micrótomo Leica Biosystems, modelo RM 2235 (Leica Biosystems, Alemanha). Eles foram corados com hematoxilina-eosina para análise das amostras teciduais quanto à ocorrência de alterações morfológicas e classificação. As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópico de luz Axioskop 2 e as imagens obtidas com o programa Zen lite 2011.

3.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados de peso corporal ao longo do tempo foram analisados pelo modelo de efeitos mistos, considerando que apresentaram distribuição não normal. O ganho de peso foi analisado por análise de variância de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (dados com distribuição normal) ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn (dados com distribuição não normal).

Os dados do teste de tolerância à glicose e do teste de tolerância à insulina foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (considerando que apresentaram distribuição normal). Foi calculada também a área sob a curva do teste de tolerância à glicose, e os dados dos diferentes grupos foram comparados teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, considerando que os dados apresentaram distribuição não normal).

Os dados de expressão gênica dos tecidos de machos ou fêmeas expostos a 8-14°C ou 25°C foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Os resultados acima mencionados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e os dados analisados separadamente para machos e fêmeas. Todas as análises foram realizadas por meio da utilização do programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises será o valor $p < 0,05$.

Para avaliar se a exposição a 25°C ou 8-14°C em período precoce do desenvolvimento (PND10-PND5) influenciou o gasto energético independentemente do peso, foi realizada análise de covariância considerando o gasto energético como a variável dependente, a temperatura de exposição como variável independente e o peso como covariável, separadamente em camundongos machos ou fêmeas alimentados com dieta controle ou hiperlipídica. Foi ainda avaliado modelo considerando camundongos de cada sexo alimentados com dieta controle e hiperlipídica em conjunto, considerando como covariáveis o peso corporal e a dieta. A análise de covariância foi conduzida utilizando o programa STATA, versão 16.0. Foram considerados estatisticamente significativos valores $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. GANHO DE PESO DA GERAÇÃO F0 DURANTE A GESTAÇÃO

Durante o período gestacional, as fêmeas de camundongos foram pesadas regularmente a fim de avaliar a progressão do ganho de peso corporal, sendo possível observar que os camundongos aumentaram o peso corporal no decorrer da gestação (Figura 4A). Não foram observadas diferenças significativas de peso corporal entre os grupos de camundongos fêmeas que, posteriormente, foram alocados aleatoriamente às condições de exposição ao frio ou mantidas a 25°C (Figura 4B).

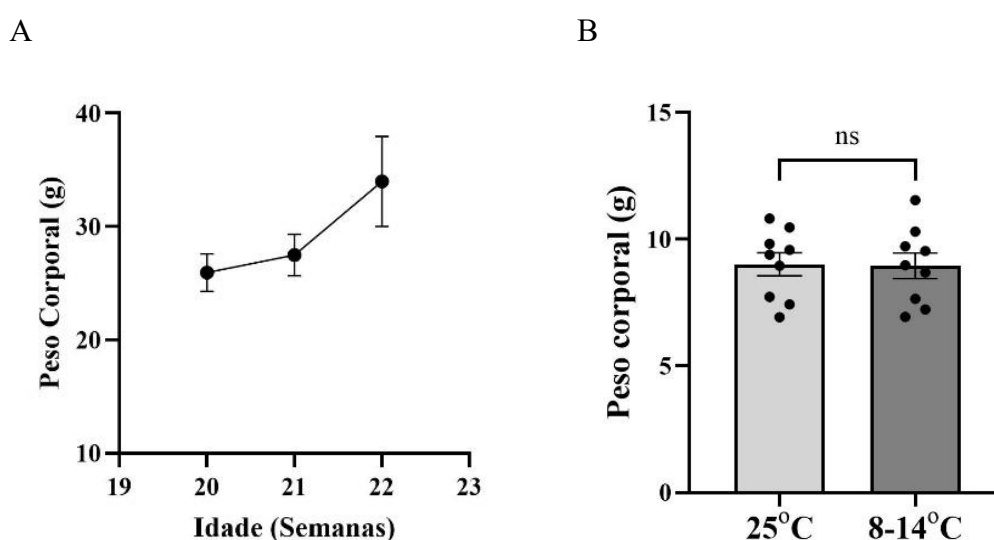


Figura 4. Avaliação do peso corporal dos camundongos fêmeas durante o período de gestação, a partir do acasalamento realizado na idade de 20 semanas (A). Comparação do ganho de peso corporal entre os dois grupos de exposição posterior ao frio (8-14°C) e 25°C (B). Em B, dados analisados pelo teste t de Student não pareado.

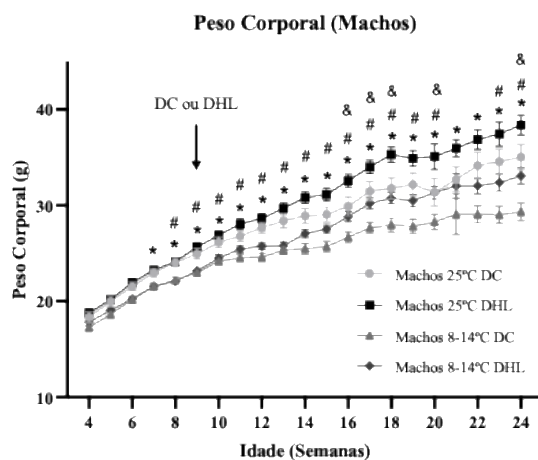
4.2. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE O PESO CORPORAL NA VIDA ADULTA

O acompanhamento da prole durante a vida adulta mostrou diferenças no peso corporal ao longo do tempo em função da dieta e da temperatura. Em ambos os sexos, os camundongos submetidos à dieta hiperlipídica em 25°C apresentaram maior ganho de peso ao longo do período experimental quando comparados aos grupos alimentados com dieta controle (Figura 5). Nos machos, observamos que os camundongos mantidos a 25°C sob dieta hiperlipídica exibiram os maiores valores de peso corporal ao longo do acompanhamento, enquanto aqueles expostos ao frio (8–14 °C) tiveram menor ganho de

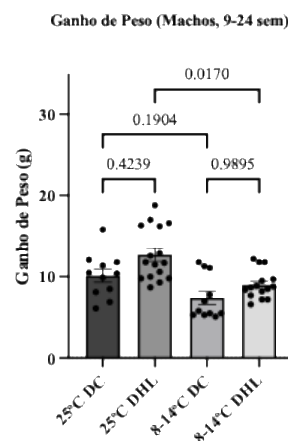
peso sob a mesma dieta (Figura 5A e B). Nas fêmeas, embora o ganho de peso também tenha sido maior nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, as diferenças entre as condições de temperatura foram menos pronunciadas, com curvas de peso corporal mais semelhantes entre os grupos expostos ao frio e a 25°C (Figuras 5C e D).

Entre a 9ª e a 24ª semana de vida, o ganho de peso corporal dos camundongos varia de acordo com o sexo, a temperatura de vida e o tipo de dieta. Nas fêmeas, os animais mantidos a 25 °C e submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso em comparação às fêmeas sob dieta controle na mesma temperatura e aqueles expostos ao frio (8–14 °C) ($p < 0,01$). Nos machos, houve diferenças significativas no ganho de peso entre os regimes nutricionais dentro e fora da mesma condição térmica; contudo, os animais submetidos à dieta hiperlipídica e expostos ao frio apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos mantidos a 25 °C ($p = 0,017$) .

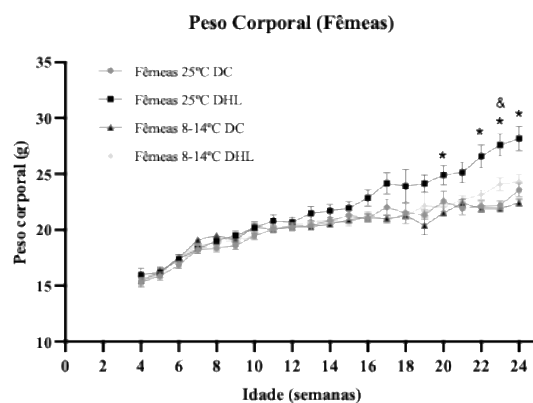
A



B



C



D

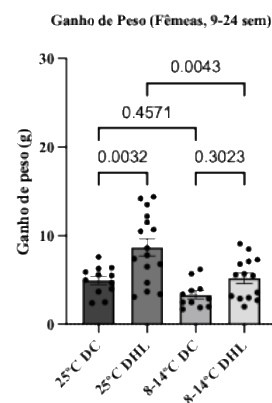
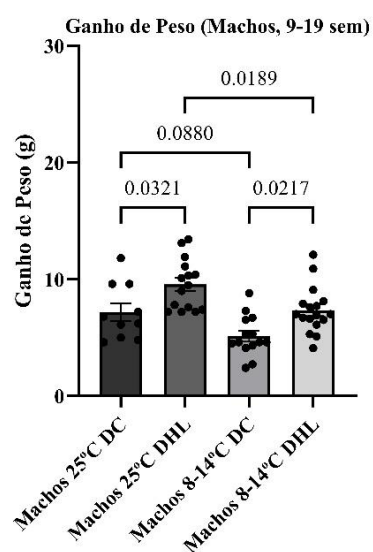


Figura 5. Peso corporal e ganho de peso de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade. O ganho de peso acumulado foi avaliado entre a 9ª e a 24ª semana de vida em fêmeas e machos. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, com pontos representando valores individuais. Em A, dados analisados pelo modelo de efeitos mistos seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$ grupo DHL 8-14°C vs 25°C; # $p < 0,05$ grupo DC grupo DHL 8-14°C vs 25°C; & $p < 0,05$ DC 8-14°C vs DHL 8-14°C). Em C, dados analisados por análise de variância de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey (& $p < 0,05$ grupo DHL 25°C vs demais grupos). Em B e D, dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Considerando que os camundongos foram submetidos à avaliação do gasto energético por calorimetria e, para tanto, foram individualizados, foi analisado também ganho de peso até o momento dessa análise, que correspondeu à 16ª de vida das fêmeas e à 19ª semana de vida dos machos. Nos machos (Figura 6A), entre a 9ª e a 19ª semana, os animais mantidos a 25 °C e submetidos à dieta hiperlipídica tiveram maior ganho de peso em comparação aos mantidos a 25 °C sob dieta controle ($p = 0,0321$). Além disso, os machos expostos ao frio e alimentados com dieta controle apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos reduzidos a 25 °C sob dieta hiperlipídica ($p = 0,0189$), enquanto os machos expostos ao frio e submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso em relação aos expostos ao frio sob dieta controle ($p = 0,0217$). Nas fêmeas (Figura 6B), o ganho de peso entre a 9ª e a 16ª semana não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C), independentemente da dieta consumida.

A



B

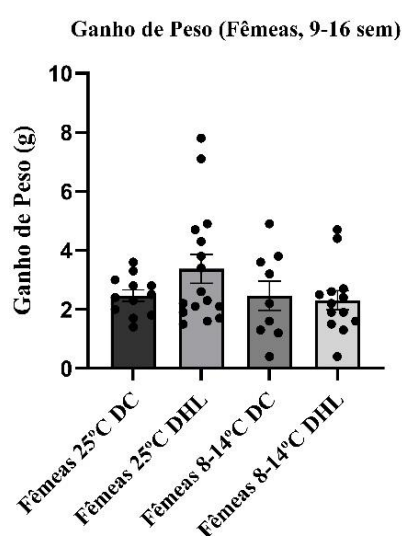


Figura 6. Ganho de peso de camundongos machos (até a 19ª semana de vida) e fêmeas (até a 16ª semana de vida) mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, com pontos representando valores individuais. As comparações estatísticas entre os grupos estão indicadas pelos valores de p apresentados nos gráficos. Em A, dados analisados por análise de variância de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Em B, dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

4.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE NA VIDA ADULTA

Para avaliar os efeitos da exposição ao frio (8-14°C) durante o desenvolvimento sobre a homeostase dos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas na vida adulta, foram realizados testes de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI).

4.3.1. TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TTG).

Após a administração de glicose, todos os grupos apresentaram elevação da glicemia, com pico observado entre 15 e 30 minutos, seguida de redução progressiva até 120 minutos (Figura 7A e C). Nas fêmeas (Figuras 7A e 7B), não foram observadas diferenças significativas da tolerância à glicose entre os grupos alimentados com DC ou DHL ou expostos às diferentes temperaturas (8-14 °C vs 25°C) durante o desenvolvimento. Nos machos (Figuras 7C e 7D), foi observado que no grupo exposto ao frio durante o desenvolvimento, a DHL promoveu aumento da AUC no TTG. Não houve diferença da tolerância à glicose dos machos mantidos a 25°C alimentados com DC ou DHL, ou entre os machos mantidos a diferentes temperaturas e alimentados com a mesma dieta.

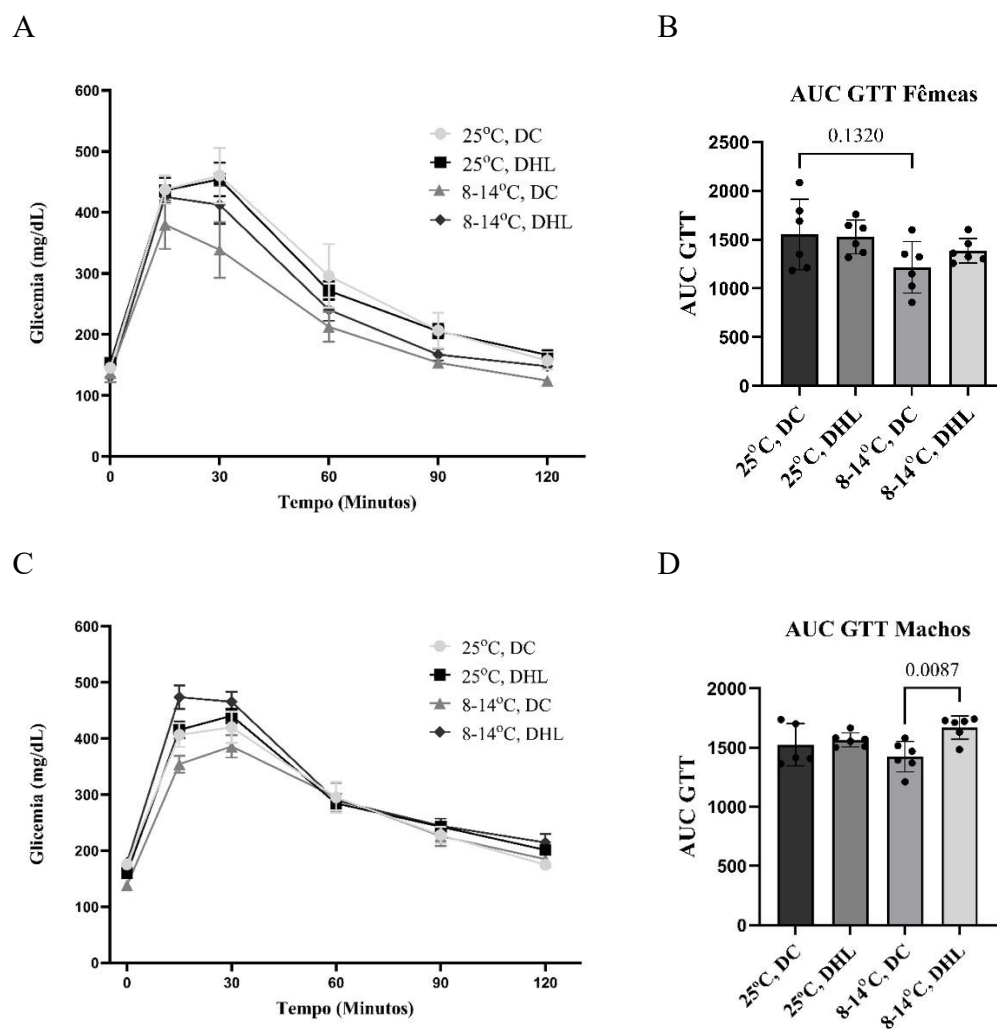


Figura 7. Teste de tolerância à glicose (TTG) de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, com pontos representando valores individuais. A. Glicemia de acordo com o tempo após a administração de 1 g/kg de glicose (tempo 0 min) por via intraperitoneal de fêmeas, B. Área sob a curva do TTG de fêmeas, C. Glicemia de acordo com o tempo após a administração de 1 g/kg de glicose (tempo 0 min) por via intraperitoneal de machos, D. Área sob a curva do TTG de machos. Em A e C, dados analisados por análise de variância de duas vias seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Em B e D, dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), n = 6 por grupo experimental.

4.3.2. TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA (TTI)

O TTI foi realizado somente em animais machos, considerando que não foi observada diferença da tolerância à glicose de fêmeas nos diferentes grupos experimentais. Os machos alimentados com DC apresentaram hipoglicemia significativa, com necessidade de correção com a administração de glicose hipertônica por via intraperitoneal, de modo que seus dados não foram apresentados.

Nos machos alimentados com DHL, foi observada no TTI redução da glicemia ao longo do tempo após a administração de insulina. A diminuição da glicemia foi observada nos primeiros 30 minutos, com valores mínimos registrados em torno de 60 minutos, seguida de recuperação parcial aos 90 minutos (Figura 8A). A análise da área sob a curva (AUC) do ITT não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos mantidos a 25 °C e 8–14°C durante o desenvolvimento e alimentados com DHL na vida adulta (Figura 8B).

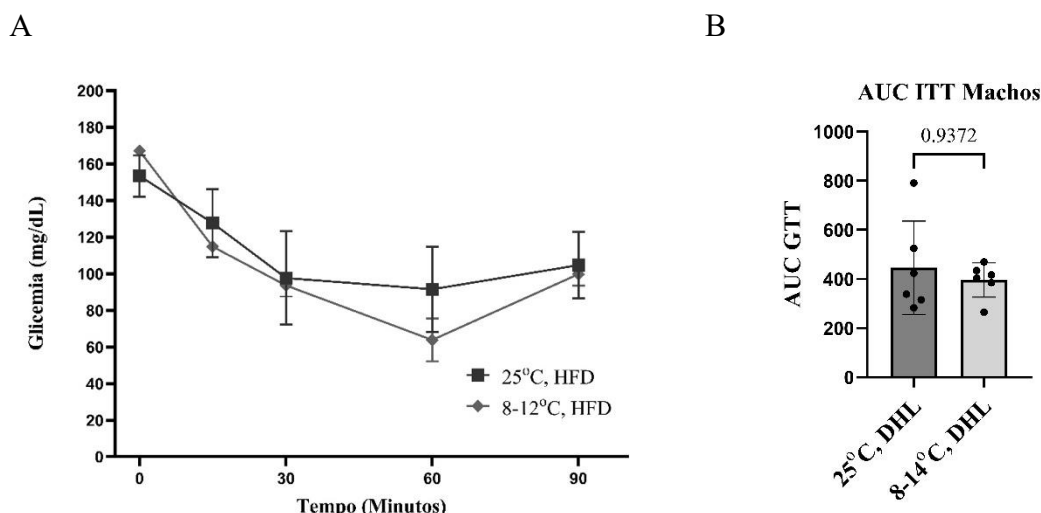
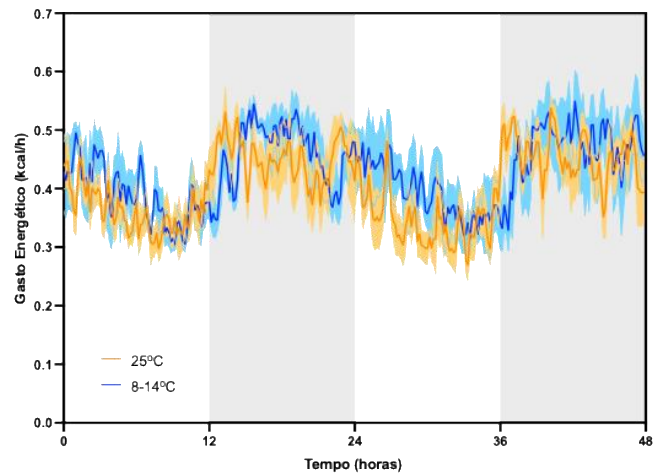


Figura 8. Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, com pontos representando valores individuais. A. Glicemia de acordo com o tempo após a administração de 0,5 UI/kg de insulina (tempo 0 min) por via intraperitoneal de machos alimentados com DHL, B. Área sob a curva do TTI de machos alimentados com DHL. Em A, dados analisados por análise de variância de duas vias seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Em B, dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), n = 6 por grupo experimental.

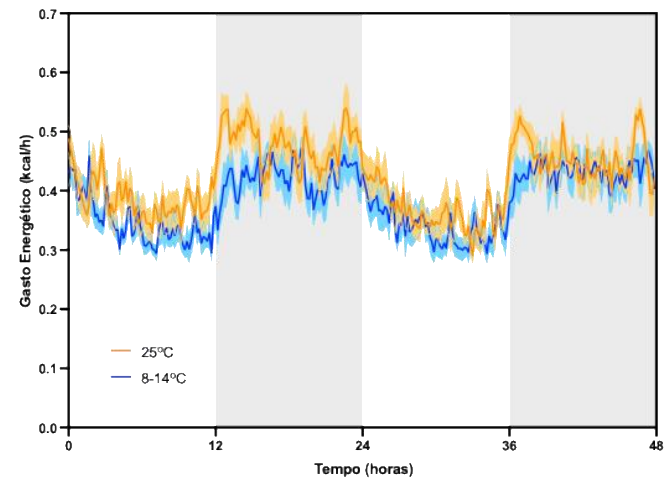
4.4. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE O GASTO ENERGÉTICO NA VIDA ADULTA

Na figura 9, são apresentados os resultados do gasto energético na vida adulta (16ª à 19ª semana de vida nas fêmeas e 20ª à 23ª semana de vida nos machos), ao longo de 48 horas em animais expostos a 25°C ou 8-14°C durante o desenvolvimento (PND10-PND50) e alimentados com a mesma dieta.

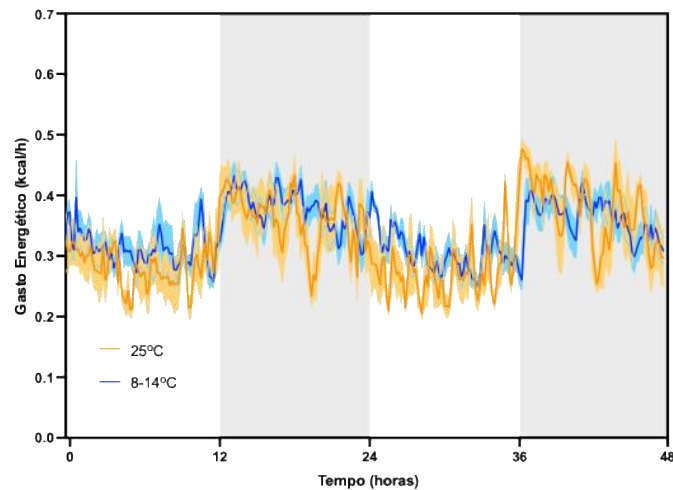
A



B



C



D

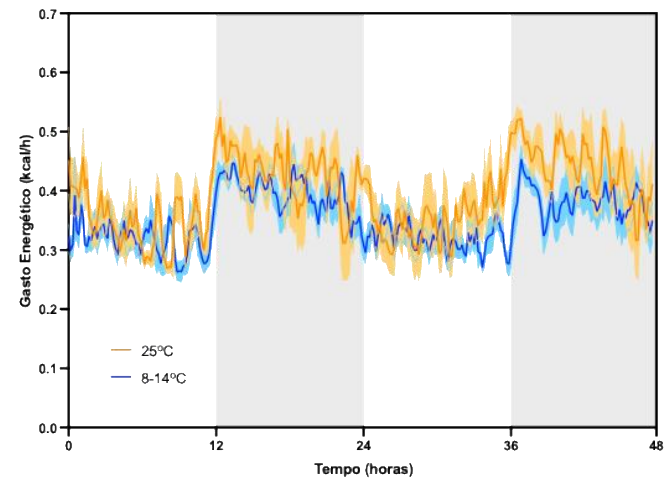


Figura 9. Gasto energético por calorimetria indireta de camundongos machos e fêmeas mantidos a 25 °C ou expostos ao frio (8–14 °C) durante o desenvolvimento e alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DHL) a partir da 9ª semana de idade. Gasto energético (kcal/h) ao longo de 48 horas (barras cinza indicam o fotoperíodo escuro) em (A) camundongos machos alimentados com dieta controle, (B) camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica, (C) camundongos fêmeas alimentados com dieta controle e (D) camundongos fêmeas alimentados com dieta hiperlipídica. Os camundongos foram expostos a 25°C ou 8-14°C entre o 10º e o 50º dia de vida e submetidos a análise do gasto energético por calorimetria indireta entre a 16ª e 20ª semanas de vida (fêmeas) e 20ª e 24ª semanas de vida (machos). Dados apresentados como média (linha) $\pm$ erro padrão da média (banda). N = 5-8 camundongos por grupo experimental.

Não foi observada influência significativa da exposição anterior (PND10-PND50) a 25°C ou 8-14°C sobre o gasto energético de camundongos machos e fêmeas, alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica, considerando o peso corporal como covariável (Figuras 10 a 13).

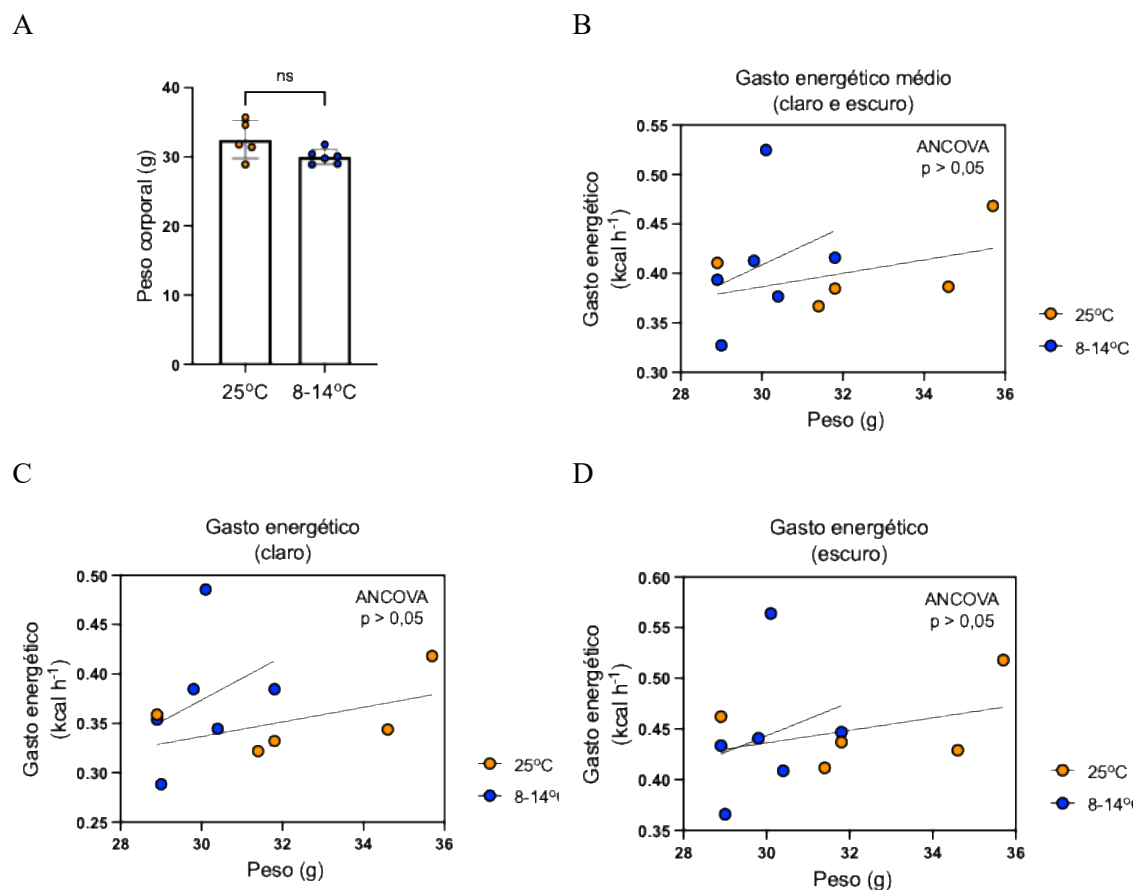


Figura 10. Análise do gasto energético de camundongos machos submetidos a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta controle. A. Peso dos camundongos antes do início da calorimetria indireta. B. Gasto energético médio total (períodos claro e escuro) de acordo com o peso. C. Gasto energético no período claro. D. Gasto energético no período escuro. N = 5-6 camundongos por grupo experimental. Em A, dados analisados pelo teste de Mann-Whitney; em B-D, dados analisados por Análise de Covariância (ANCOVA) considerando o gasto energético como variável dependente, a temperatura de exposição do 10 ao 50º dia como variável independente, e o peso como covariável. N = 5-6/grupo experimental.

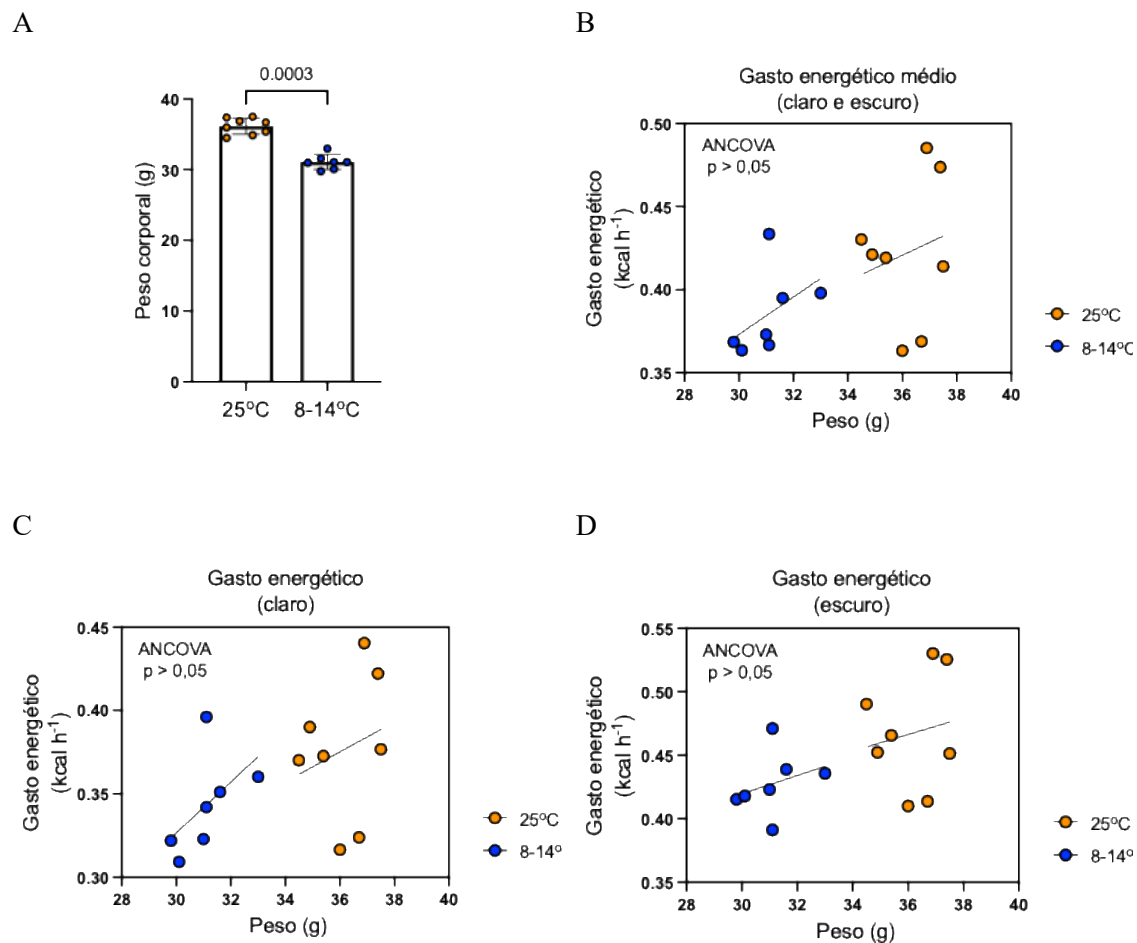


Figura 11. Análise do gasto energético de camundongos machos submetidos a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta hiperlipídica. A. Peso dos camundongos antes do início da calorimetria indireta. B. Gasto energético médio total (períodos claro e escuro) de acordo com o peso. C. Gasto energético no período claro. D. Gasto energético no período escuro. N = 7-8 camundongos por grupo experimental. Em A, dados analisados pelo teste de Mann-Whitney; em B-D, dados analisados por Análise de Covariância (ANCOVA) considerando o gasto energético como variável dependente, a temperatura de exposição do 10 ao 50º dia como variável independente, e o peso como covariável. N = 7-8/grupo experimental.

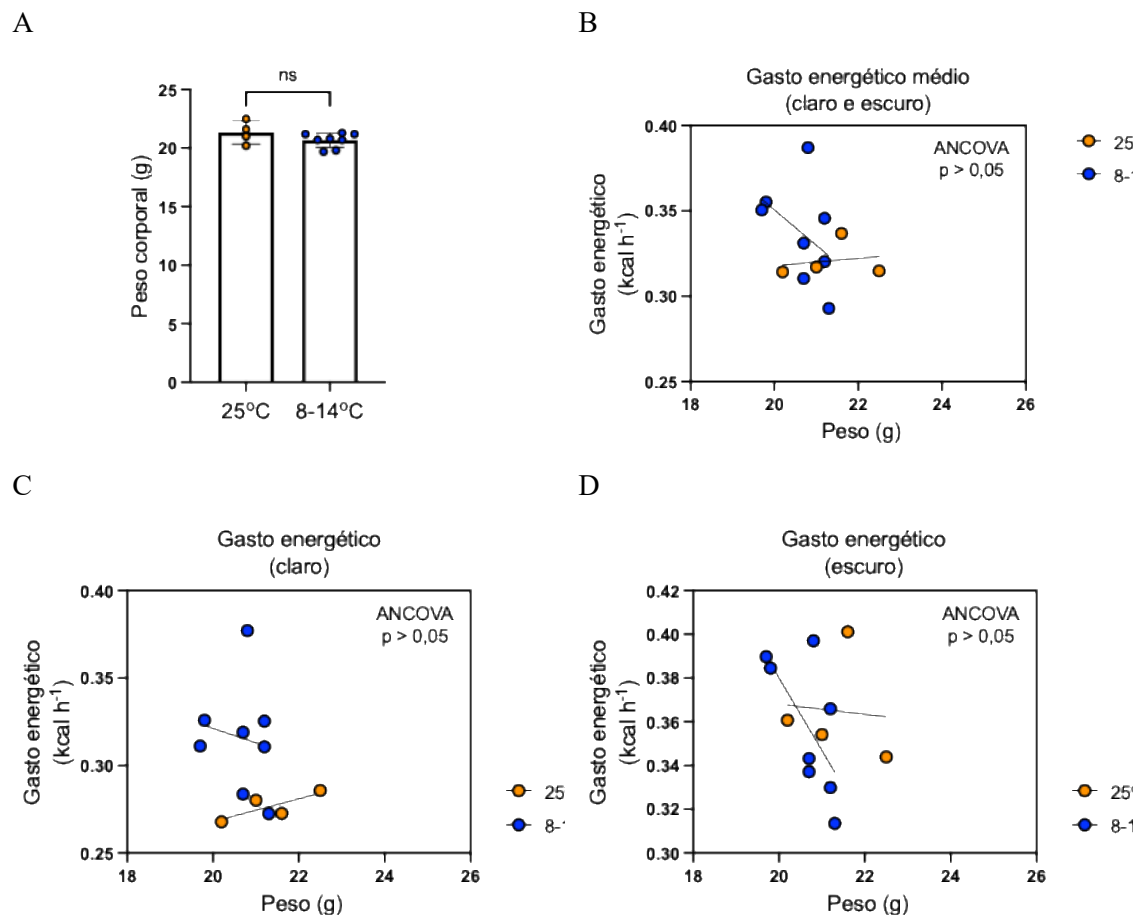


Figura 12. Análise do gasto energético de camundongos fêmeas submetidas a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta controle. A. Peso dos camundongos antes do início da calorimetria indireta. B. Gasto energético médio total (períodos claro e escuro) de acordo com o peso. C. Gasto energético no período claro. D. Gasto energético no período escuro. N = 4-8 camundongos por grupo experimental. Em A, dados analisados pelo teste de Mann-Whitney; em B-D, dados analisados por Análise de Covariância (ANCOVA) considerando o gasto energético como variável dependente, a temperatura de exposição do 10 ao 50º dia como variável independente, e o peso como covariável. N = 4-8/grupo experimental.

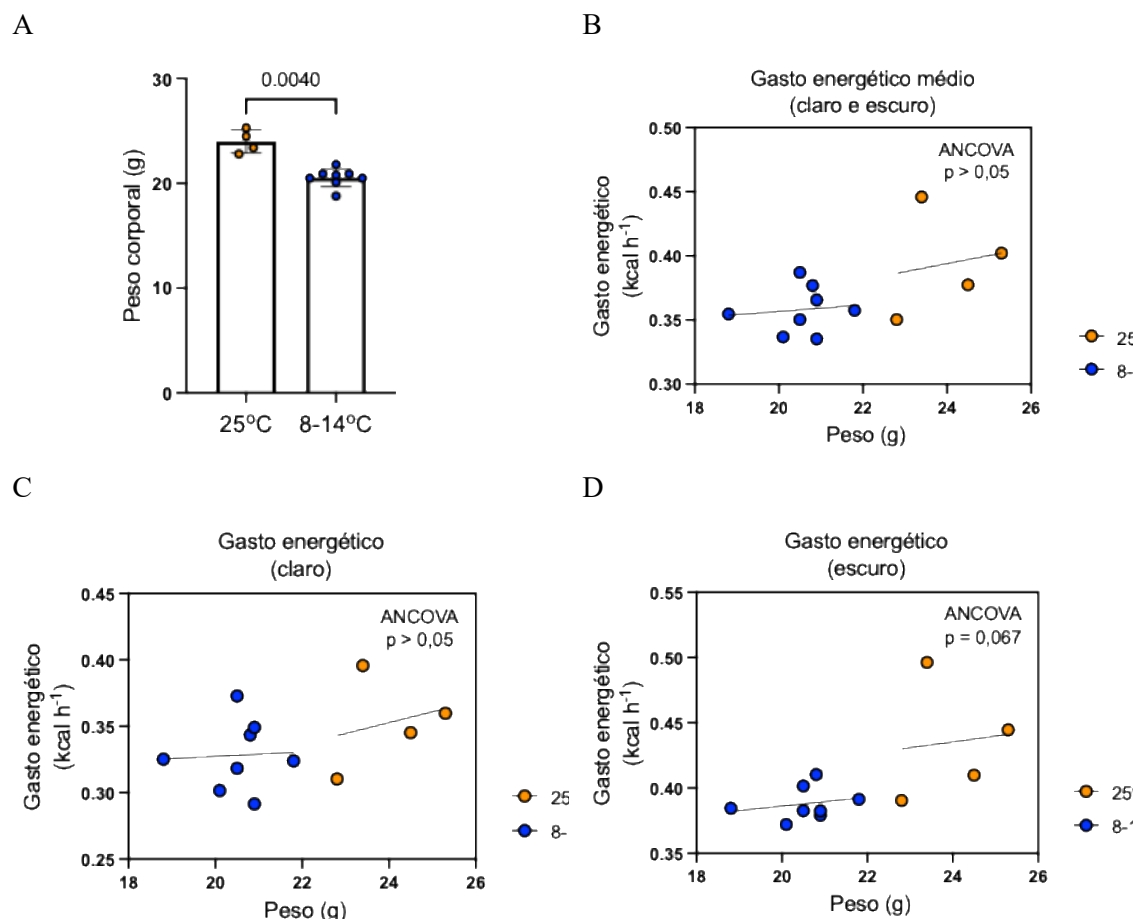


Figura 13. Análise do gasto energético de camundongos fêmeas submetidas a 25°C ou 8-14°C entre os dias de vida pós-natal 10 a 50 e alimentados com dieta hiperlipídica. A. Peso dos camundongos antes do início da calorimetria indireta. B. Gasto energético médio total (períodos claro e escuro) de acordo com o peso. C. Gasto energético no período claro. D. Gasto energético no período escuro. N = 4-8 camundongos por grupo experimental. Em A, dados analisados pelo teste de Mann-Whitney; em B-D, dados analisados por Análise de Covariância (ANCOVA) considerando o gasto energético como variável dependente, a temperatura de exposição do 10 ao 50º dia como variável independente, e o peso como covariável. N = 4-8/grupo experimental.

O modelo considerando os machos alimentados com dieta controle e hiperlipídica em conjunto, em que a temperatura de exposição anterior foi considerada a variável independente o peso e a dieta, covariáveis, não foi significativo ($F = 1,54$, $p = 0,232$, R^2 ajustado: 0.061), indicando a exposição anterior (PND10-PND50) a 25°C ou 8-14°C, peso corporal e dieta não foram preditores significativos do gasto energético médio dos períodos claro e escuro. Considerando o gasto energético no período claro, o modelo também não foi significativo ($F = 1,77$; $p = 0.182$, R^2 ajustado = 0.08), embora o peso tenha sido um preditor significativo do gasto energético nesse período ($F = 4,80$, $p = 0.039$, R^2 ajustado = 0,08). Considerando o gasto energético no período escuro, o modelo também não foi significativo ($F = 1,46$; $p = 0.253$, R^2 ajustado = 0.05).

Nas fêmeas, o modelo considerando aquelas alimentadas com dieta controle e hiperlipídica em conjunto foi significativo ($F = 4,56$, $p = 0,013$, R^2 ajustado: 0.317), ou seja, a temperatura de exposição anterior, dieta e peso combinados foram significativos em prever variações do gasto energético médio no período claro e escuro. Nesse modelo, a dieta não foi preditora independente do gasto energético ($F = 7,09$, $p = 0,015$). Especificamente, nos camundongos fêmeas previamente expostos a 25°C ou 8-14°C, a alimentação com dieta hiperlipídica associou-se ao aumento do gasto energético em 0,033 kcal/h ($p = 0,0123$) em relação à dieta controle.

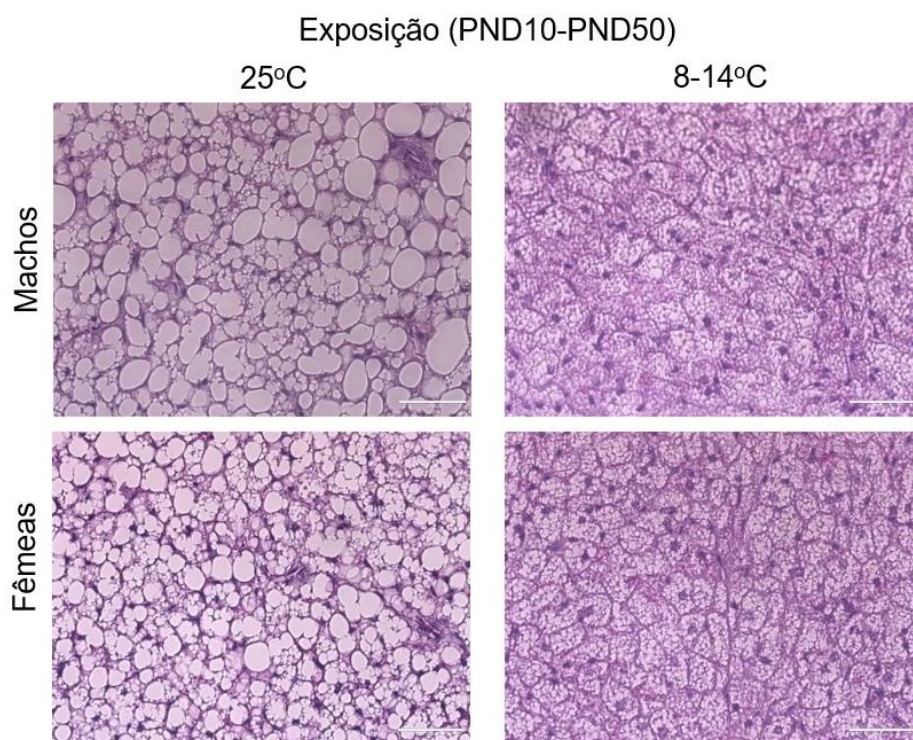
Considerando o gasto energético no período claro, o modelo também foi significativo ($F = 3,74$; $p = 0,028$, R^2 ajustado = 0.263) em explicar variações do gasto energético nesse período, embora a exposição anterior a 25°C ou 8-14°C, peso e dieta individualmente não tenham sido preditores significativos do gasto energético. Considerando o gasto energético no período escuro, o modelo também foi significativo ($F = 5,85$; $p = 0,005$, R^2 ajustado = 0.387), tendo a dieta sido um preditor independente do gasto energético ($F = 9,66$, $p = 0,006$). Nesse período, a dieta hiperlipídica associou-se ao aumento do gasto energético em 0,040 kcal/h ($p = 0,013$) em relação à dieta controle.

4.5. EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE O TECIDO ADIPOSEO

4.5.1. Características histológicas

Foram avaliadas as características histológicas do tecido adiposo branco subcutâneo inguinal e tecido adiposo marrom interescapular dos camundongos fêmeas e machos expostos ao frio 8-14°C ou a 25°C. A avaliação qualitativa dos cortes histológicos indicou diferença entre os tecidos, indicando redução do tamanho das gotículas lipídicas no tecido adiposo marrom interescapular de machos e fêmeas expostos a 8-14°C, quando comparados àqueles mantidos a 25°C (Figura 14A). No tecido adiposo branco inguinal, foi observado aumento do número de adipócitos multiloculares, consistentes com adipócitos bege, em machos e fêmeas (Figura 15B).

A



B

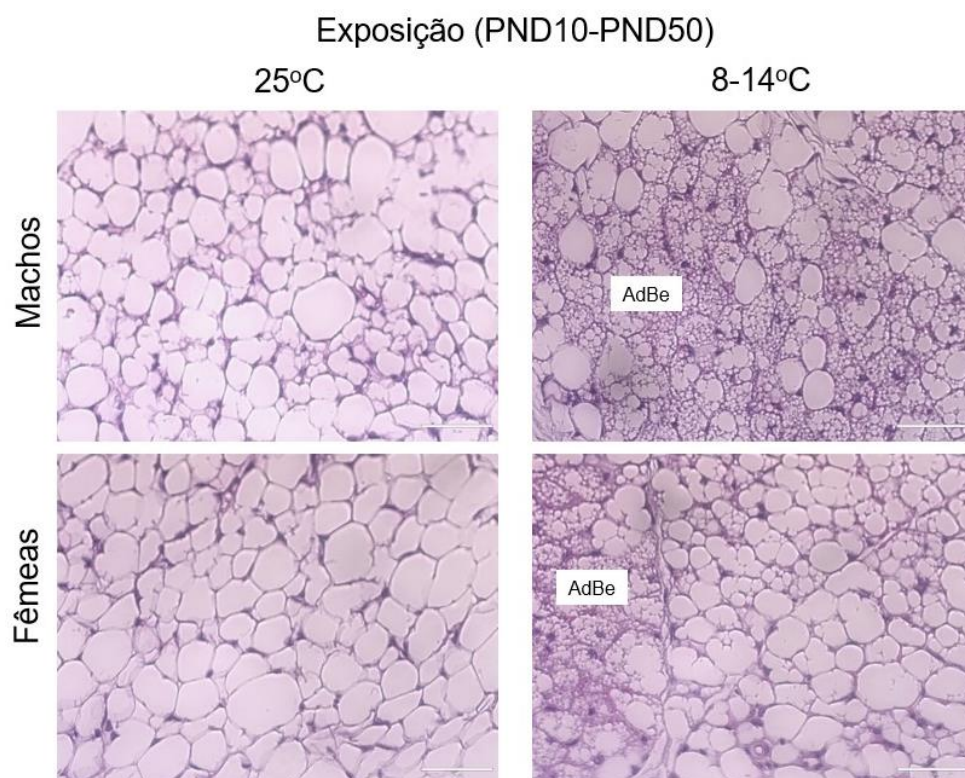


Figura 14. Características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular (A) e branco inguinal (B) de camundongos fêmeas e machos dos diferentes grupos experimentais. Amostras representativas de um animal por grupo experimental, na 8ª semana de vida (PND50) coradas com hematoxilina e eosina. Aumento de 60X e escala de 50 micrometros.

4.5.2. Expressão do marcador termogênico UCP1

A análise da expressão relativa do RNA mensageiro do gene que codifica a UCP1 permite inferir alterações transcricionais associadas à adaptação térmica em diferentes depósitos adiposos. Neste contexto, avaliamos a expressão relativa de UCP1, normalizada pelo gene de referência 36B4, no tecido adiposo marrom e no tecido adiposo branco inguinal de machos e fêmeas expostos ao frio (8–14 °C) ou mantidos a 25 °C, ao final do período de exposição ao frio.

No tecido adiposo marrom, a expressão relativa ao UCP1 foi significativamente maior nos animais expostos ao frio (8–14 °C) quando comparados àqueles mantidos a 25 °C (Figura 15A). Nos camundongos machos, a exposição ao frio resultou em aumento significativo da expressão de UCP1 em relação ao grupo a 25 °C ($p = 0,0159$). De forma semelhante, nas fêmeas, observamos um aumento significativo da expressão de UCP1 no grupo exposto ao frio em comparação ao grupo mantido a 25 °C ($p = 0,0357$). O mesmo perfil foi observado no tecido adiposo branco inguinal (Figura 15B), embora a indução da expressão de UCP1 tenha sido superior nas fêmeas expostas ao frio em relação aos machos.

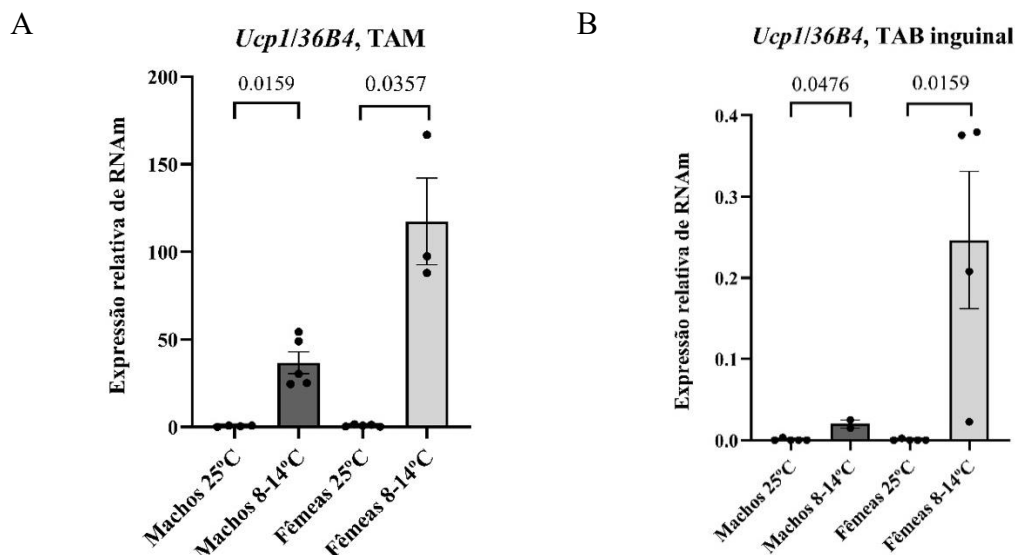


Figura 15. Expressão gênica de UCP1 dos camundongos expostos ao frio (8–14 °C) ou mantidos a 25°C. Expressão gênica relativa de UCP1, normalizada pelo gene de referência 36B4, no tecido adiposo marrom (TAM) e no tecido adiposo branco (TAB) inguinal de machos e fêmeas mantidos em 25 °C ou expostos ao frio 8–14 °C, na 8ª semana de vida (PND50). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média, com pontos individuais representando cada animal. Utilizado o teste de Mann–Whitney. A exposição ao frio aumentou significativamente a expressão de UCP1 em machos ($p = 0,0159$) e fêmeas ($p = 0,0357$) quando comparados aos respectivos grupos suspensos a 25 °C. No tecido adiposo branco inguinal, observou-se aumento significativo da expressão de UCP1 nos animais expostos ao frio, tanto em machos ($p = 0,0476$) quanto em fêmeas ($p = 0,0159$), em comparação aos grupos mantidos a 25°C. N = 3-5 animais/grupo experimental.

5. DISCUSSÃO

A exposição ao frio durante períodos críticos do desenvolvimento, como a infância, podem representar um estímulo relevante em uma fase caracterizada por elevada plasticidade metabólica e estrutural dos tecidos (Yu et al., 2019). As evidências indicam que os estímulos ambientais nesse período podem exercer efeitos sobre a organização e a função de diferentes compartimentos adiposos, especialmente o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo branco com potencial termogênico (Yu et al., 2019). Dessa forma, é plausível que a exposição ao frio nessas janelas possa, não apenas induzir respostas adaptativas imediatas, mas também influenciar a programação metabólica em longo prazo, modulando a capacidade de ativação termogênica, balanço energético e a resposta aos desafios metabólicos na vida adulta (Hoffman et al., 2017).

Considerando que o período de desenvolvimento representa uma janela crítica, estímulos adversos nessa fase podem resultar em consequências metabólicas que se estendem ao longo da vida (Yoneshiro et al., 2025). Entre esses estímulos, a composição da dieta, especialmente dietas com elevado percentual de gordura, tem sido associada a alterações precoces no metabolismo energético, favorecendo o aumento da adipogênese e a expansão de depósitos de tecido adiposo, o que pode contribuir para maior acúmulo de gordura corporal na vida adulta (Ghaben & Scherer, 2019). Destaca-se então a vulnerabilidade do organismo em desenvolvimento a fatores ambientais capazes de direcionar o fenótipo metabólico para um perfil mais propenso ao ganho de peso e aos distúrbios metabólicos.

Em contraste, estratégias de manejo durante essas janelas sensíveis emergem como potenciais moduladores da homeostase metabólica em longo prazo, uma vez que estímulos adequados podem atenuar ou redirecionar essas adaptações (Yoneshiro et al., 2025). Assim, é possível que intervenções como a exposição ao frio, que representa o principal estímulo fisiológico para a ativação de tecidos adiposos com função termogênica, possam atuar de forma protetora, contribuindo para a formação de um perfil metabólico mais eficiente e, consequentemente, para uma menor suscetibilidade ao desenvolvimento de obesidade na vida adulta (Neri et al., 2023; Yoneshiro et al., 2025). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o impacto metabólico, na vida adulta, da exposição ao frio durante o período de desenvolvimento.

Assumindo o controle de variáveis maternas que poderiam interferir na programação metabólica da prole e atuar como potenciais fatores de interferência na

interpretação dos resultados, realizamos o acompanhamento do peso corporal das fêmeas parentais (F0) ao longo do período gestacional, com o intuito de avaliar possíveis alterações associadas às condições experimentais. Não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso durante a gestação das fêmeas posteriormente alocadas para exposição ao frio com a prole ou mantidas a 25°C. Esse achado é relevante, uma vez que alterações metabólicas maternas durante a gestação, incluindo variações no ganho de peso, podem impactar o desenvolvimento fetal e influenciar o metabolismo da prole de forma independente dos estímulos aplicados no período pós-natal (Godfrey et al., 2017; Wen et al., 2025). Assim, a ausência de diferenças no ganho de peso materno permite inferir que eventuais alterações observadas na prole ao longo do estudo não foram decorrentes de fatores relacionadas ao metabolismo materno durante a gestação, reforçando que os efeitos identificados podem ser atribuídos, de maneira mais direta, à intervenção proposta no estudo (Godfrey et al., 2017; Wen et al., 2025).

Dados de estudos prévios indicam que a exposição ao frio em períodos precoces do desenvolvimento pode influenciar benéficamente o tecido adiposo termogênico na vida adulta. Em estudo anterior envolvendo humanos (Yoneshiro et al., 2025), foi observado que a concepção durante estações frias está associada à presença de maior atividade do tecido adiposo marrom, termogênese adaptativa, aumento do gasto energético total diário e menor índice de massa corporal e acúmulo de gordura visceral na vida adulta. Ou seja, a exposição ao frio na fase de célula germinativa e embrião, um período crítico do desenvolvimento, pode impactar a fisiologia do tecido adiposo termogênico em etapas posteriores da vida. Essas descobertas sugerem que o destino metabólico do tecido adiposo marrom e a suscetibilidade a doenças metabólicas são pré-programados em fases precoces do desenvolvimento, e podem envolver fatores epigenéticos modulados pelo frio (Yoneshiro et al., 2025).

De forma semelhante, porém abordando outra influência a ambiental sobre o tecido adiposo termogênico, um estudo pré-clínico (Yu et al., 2019) demonstrou que a nutrição com leite materno, rico em lipídeos do tipo alquilglicerois, que sustenta o desenvolvimento do tecido adiposo bege (AdBe) na prole, podendo compreender o mecanismo pelo qual o aleitamento materno está associado a proteção contra obesidade, embora esse aspecto não tenha sido explorado no estudo de Yu et al. (2019).

Os achados do impacto de influências ambientais em períodos críticos do desenvolvimento sobre o tecido adiposo termogênico, no entanto, sugerem que essas influências possam de fato apresentar impacto sobre a saúde metabólica na vida adulta.

Para testar essa hipótese, camundongos C57BL/6 machos e fêmeas foram expostos, entre o 10º e o 56º dia de vida, ao frio (8-14°C) e comparados àqueles mantidos a 25°C quanto a diversos desfechos metabólicos. O período de exposição compreende o período de desenvolvimento do camundongo, que é considerado um adulto jovem com cerca de 8 semanas de vida.

Os dados obtidos de peso corporal da prole ao longo do tempo indicaram que a exposição ao frio durante o período de desenvolvimento promoveu uma diminuição do ganho de peso, independentemente da dieta, nos machos, e nas fêmeas alimentadas com DHL. Nos machos mantidos a 25°C e alimentados com DHL, foi observado aumento progressivo e mais acentuado do peso corporal ao longo das semanas, quando comparados aos machos submetidos à mesma dieta, porém, expostos ao frio. Essa diferença tornou-se maior por volta da 12ª semana de vida, período no qual as curvas de peso passaram a divergir de forma consistente, mantendo-se diferentes até o final do acompanhamento. Tal achado sugere que a exposição ao frio reduz a eficiência da DHL em promover aumento do peso corporal. Embora seja bem estabelecido que a exposição ao frio promove redução do aumento do peso em resposta à DHL (Cohen & Kajimura, 2021; Ikeda & Yamada, 2020; Kajimura et al., 2010; Kazak et al., 2015), para nosso conhecimento até o momento a influência de exposição anterior ao frio não havia sido investigada sobre o peso corporal.

Em relação às fêmeas, não observamos efeito da exposição anterior ao frio sobre o peso naquelas alimentadas com DC, embora tenha sido observado menor ganho de peso naquelas expostas ao frio durante o desenvolvimento e alimentadas com DHL em relação àquelas mantidas a 25°C e alimentadas com a mesma dieta. Destaca-se, ainda, que o efeito da DHL em promover ganho de peso nas fêmeas mantidas a 25°C foi menos acentuado e mais tardio que o observado nos machos. Esse resultado é compatível com dados de estudos prévios, que indicam que as fêmeas apresentam menor suscetibilidade à obesidade induzida por dieta, efeito frequentemente atribuído à ação dos hormônios, principalmente o estrogênio (Mauvais-Jarvis, 2011, 2015; Mo et al., 2025). Os hormônios exercem papel importante na regulação do balanço energético, favorecendo maior oxidação de substratos, melhor sensibilidade à insulina e menor acúmulo de tecido adiposo, o que pode explicar o menor impacto das diferenças observadas entre os grupos de temperatura nas fêmeas (Barros & Gustafsson, 2011; Mauvais-Jarvis, 2011, 2015).

Os resultados do presente estudo indicam, ainda, que a exposição ao frio não impede completamente o ganho de peso, mas atua como um fator modulador do peso,

diminuindo o desenvolvimento do fenótipo obesogênico induzido pela DHL em machos e fêmeas. Esses dados sugerem que, em consistência com a hipótese do estudo, a exposição ao frio durante período crítico do desenvolvimento é capaz de modular a homeostase metabólica de forma a influenciar a trajetória do peso corporal ao longo da vida.

Padrões de obesidade e distúrbios metabólicos induzidos por dieta em camundongos são frequentemente utilizados para explorar os mecanismos fisiopatológicos relacionados à obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e intolerância à glicose (Hariri & Thibault, 2010). Dentre os tipos de dietas mais comumente utilizadas, destacam-se a DHL, que em geral contém entre 30% e 60% de seu conteúdo calórico derivado de lipídios. Esse padrão dietético replica elementos do estilo de vida humano moderno e induzem mudanças metabólicas graduais, como aumento do peso corporal, aumento da gordura visceral, elevação dos níveis de glicose e insulina no sangue, além de alterações no perfil lipídico (Hariri & Thibault, 2010; Longo et al., 2019; Lustig et al., 2022; Swinburn et al., 2011). A adoção dessas dietas possibilitou que o presente estudo estivesse mais controlado em relação à influência de fatores ambientais na definição do risco de doenças metabólicas (Longo et al., 2019; Lustig et al., 2022; Swinburn et al., 2011).

Considerando que a DHL está associada a alterações no perfil glicêmico e a redução da sensibilidade à insulina, nosso estudo também avaliou a influência da exposição anterior ao frio sobre esse desfecho induzido pela dieta. Nas fêmeas, não foi observado efeito da DHL ou da exposição ao frio sobre a tolerância à glicose. Esses achados são compatíveis com a menor sensibilidade das fêmeas a distúrbios metabólicos induzidos por dieta. Além disso, o TTG foi realizado em um período (15 semanas de vida) em que não havia sido detectado aumento do peso induzido pela DHL, que foi observado somente em idade posterior nas fêmeas. Em contrapartida, nos machos, a exposição ao frio promoveu alterações mais evidentes na resposta glicêmica. Embora as curvas do teste de tolerância a glicose não indiquem diferenças marcantes em todos os pontos, a análise da área sob a curva revelou que a DHL foi capaz de promover piora da tolerância à glicose somente em machos previamente expostos ao frio, porém não naqueles mantidos a 25°C.

Esses dados contrastam com o de estudo prévio (Neri et al., 2023), em que camundongos C57BL/6 foram mantidos a 22°C ou 30°C do nascimento até a 8ª semana de vida e analisados posteriormente quanto ao gasto energético e resposta a dieta hiperlipídica. Foi observado que a exposição anterior a 22°C não modificou o gasto

energético a 30°C, embora o tenha aumentado na vigência de exposição ao frio de forma mais acentuada que nos animais mantidos desde o nascimento em termoneutralidade. Não houve também influência da exposição a 22 ou 30°C sobre o ganho de peso e tolerância à glicose em resposta à DHL, embora a glicemia de jejum dos camundongos previamente expostos a 22°C tenha sido inferior à daqueles mantidos a 30°C (Neri et al., 2023). Embora o protocolo de exposição ao frio e o tempo de dieta hiperlipídica tenha sido diferente no presente estudo, os resultados são inesperados considerando o menor ganho de peso dos animais previamente expostos ao frio, podem ser devidos à tendência de menor área sob a curva do TTG de camundongos machos expostos previamente ao frio e alimentados com dieta controle, embora não significativa. Apesar da alteração da tolerância à glicose nos animais expostos ao frio durante o período de desenvolvimento, não foi observada mudança na sensibilidade à insulina, sugerindo que o aumento da glicemia em resposta à DHL não tenha tido como mecanismo a resistência à insulina. Em conjunto, esses resultados indicam que a exposição ao frio modula de forma distinta o metabolismo da glicose em machos e fêmeas, com efeitos mais pronunciados nos machos.

Foi avaliado, também, o gasto energético na vida adulta. Para interpretar corretamente os dados de gasto energético de camundongos, é necessário realizar uma análise cuidadosa e apropriada, com sistema análise de monitoramento constante. No presente estudo, os dados obtidos foram por meio do CLAMS (*Comprehensive Lab Animal Monitoring System*). O sistema utiliza o princípio da calorimetria indireta para estimar o metabolismo energético a partir das trocas gasosas (Meyer et al., 2015). Nesse sistema, são medidos continuamente o consumo de oxigênio (VO_2) e a produção de dióxido de carbono (VCO_2), razão de troca respiratória (RER), variáveis que refletem as taxas metabólicas do animal ao longo do tempo. A partir delas, o gasto energético total é calculado, permitindo a expressão dos resultados em kcal por unidade de tempo, com possibilidade de normalização pela massa corporal ou massa magra (Meyer et al., 2015). Algumas abordagens fazem a comparação direta de valores não corrigidos (kcal/h), a correção pela massa magra, a correção pelo peso corporal, a correção pelo peso corporal elevado à potência de 0,75. Entretanto, é atualmente consenso na literatura que os resultados devem ser expressos em kcal por unidade de tempo, sem normalização para a massa corporal, e a massa corporal considerada como covariável em análise de covariância (ANCOVA) (Kleinert et al., 2018).

Nossos resultados indicaram que a exposição ao frio durante o desenvolvimento não modifica o gasto energético na vida adulta em machos e fêmeas alimentados com DC

ou DHL. Dessa forma, os dados contrastam com aqueles derivados de análise do metabolismo energético na vigência da exposição ao frio, em que são observados ajustes funcionais na utilização de energia, possivelmente aumentando a eficiência da oxidação de substratos lipídicos e a captação de glicose, sem necessariamente se traduzir em elevação do gasto energético (Stanford et al., 2013).

Uma possível explicação para a ausência de aumento significativo do gasto energético é que a resposta ao frio depende da ativação do tecido adiposo termogênico, tanto marrom quanto bege, bem como de mecanismos de termogênese sem tremores. Esses processos promovem ajustes metabólicos relevantes, como maior captação e utilização de substratos energéticos, sem necessariamente se traduzirem em um aumento global do gasto energético mensurável por calorimetria indireta (Hariri & Thibault, 2010; Kleinert et al., 2018), considerando-se, além disso, que a exposição ao frio foi realizada em período anterior à análise do gasto energético.

Além disso, pesquisas em pequenos mamíferos demonstram que a exposição prolongada ao frio pode promover adaptações metabólicas que compensam parte do aumento inicial de termogênese, como alteração na oxidação de substratos, sem necessariamente se traduzir em incremento contínuo do gasto energético total mensurado (Huo et al., 2022). Esse tipo de compensação foi observado em estudos que, apesar de apresentarem aumento de marcadores termogênicos como UCP1, não sofreram mudanças proporcionais no gasto energético médio de longo prazo, possivelmente devido a ajustes fisiológicos que equilibram o consumo energético e a manutenção da homeostase (Huo et al., 2022). Além disso, protocolos de exposição ao frio com intensidade ou duração moderada podem não ser suficientes para gerar um estímulo robusto de termogênese que seja captado de forma significativa pelo sistema de medição de calorimetria (van der Lans et al., 2013).

Para verificar se houve alteração no tecido adiposo mediante as exposições ao frio, o tecido adiposo foi analisado ao final da exposição ao frio. Constatamos que o tecido adiposo marrom interescapular apresentou redução do tamanho das gotículas lipídicas em machos e fêmeas expostos ao frio, o que sugere a maior atividade termogênica do tecido, uma vez que, com sua ativação, o processo de lipólise ocorre para utilizar os ácidos graxos como combustíveis e reduz o tamanho das referidas gotículas (Shamsi et al., 2021; Wen et al., 2022). Em um estudo realizado por (Suchacki & Stimson, 2021), foi descrito que, em contraste com o tecido adiposo branco, que armazena energia, o tecido adiposo

marrom e adipócito bege são especializados na oxidação de lipídios para produzir calor, favorecendo para um tecido altamente ativo com menores depósitos de gordura.

Além disso, foi possível observar o processo de amarronzamento do tecido adiposo branco inguinal de machos e fêmeas em resposta a exposição ao frio, caracterizado pela presença de adipócitos multiloculares em conjunto com os adipócitos uniloculares tradicionais do tecido adiposo branco. É bem estabelecido na literatura a capacidade de o frio estimular, por diversos mecanismos, inclusive epigenéticos, o aparecimento de adipócitos bege, termogênicos, no tecido adiposo branco (Cheng et al., 2021; Holman et al., 2024).

Em consistência com as alterações histológicas no tecido adiposo, foi observado aumento da expressão de UCP1 nos dois depósitos avaliados, em machos e fêmeas expostos ao frio, em comparação com aqueles mantidos a 25°C. Esse perfil transcricional é compatível com um tecido metabolicamente mais ativo, capaz de aumentar a oxidação de substratos, especialmente lipídios, e de atuar como um importante captador de glicose (Shamsi et al., 2021).

É importante ressaltar que o presente estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, embora o protocolo de exposição ao frio tenha sido aplicado durante um período crítico do desenvolvimento, não foram realizadas análises mecanísticas aprofundadas que permitissem elucidar os processos moleculares ou epigenéticos envolvidos na possível programação metabólica de longo prazo. Além disso, o gasto energético foi avaliado apenas na vida adulta e em condição basal, não sendo investigada a resposta aguda a um novo desafio térmico, o que poderia revelar diferenças funcionais não detectadas pela calorimetria indireta em temperatura ambiente. Outro ponto a considerar é que o teste de tolerância à glicose nas fêmeas foi realizado em fase em que ainda não havia manifestação clara do fenótipo obesogênico induzido pela dieta, o que pode ter limitado a detecção de possíveis diferenças metabólicas. Adicionalmente, apesar do controle do ganho de peso materno durante a gestação, outros fatores maternos e ambientais não mensurados podem ter influenciado a programação metabólica da prole. Por fim, como se trata de um modelo experimental em camundongos, a extrapolação direta dos resultados para humanos deve ser feita com cautela.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo indicou que a exposição de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas ao frio (8-14°C) durante o período de desenvolvimento (PND10-PND50) promoveu:

- Redução do tamanho das gotículas lipídicas no tecido adiposo marrom interescapular de machos e fêmeas no PND50, em comparação com camundongos do mesmo sexo mantidos a 25°C.
- Aumento da quantidade de adipócitos multiloculares no tecido adiposo branco inguinal de machos e fêmeas, em comparação com camundongos do mesmo sexo mantidos a 25°C.
- Aumento da expressão do RNA mensageiro do marcador termogênico UCP1 no tecido adiposo branco inguinal de machos e fêmeas, em comparação com camundongos do mesmo sexo mantidos a 25°C.
- Menor ganho de peso em machos alimentados com DC ou DHL em comparação com machos mantidos a 25°C.
- Efeito neutro sobre o ganho de peso em fêmeas alimentadas com DC, em comparação com fêmeas mantidos a 25°C.
- Menor ganho de peso em fêmeas alimentadas com DHL em comparação com fêmeas mantidos a 25°C.
- Piora da tolerância à glicose de machos alimentados com DHL em relação àqueles também expostos ao frio e alimentados com a mesma dieta.
- Efeito neutro sobre a sensibilidade à insulina de machos alimentados com DHL em relação àqueles mantidos a 25°C e alimentados com a mesma dieta.
- Efeito neutro sobre a tolerância à glicose de fêmeas.
- Efeito neutro sobre o gasto energético.

7. REFERÊNCIAS

- Barros, R. P. A., & Gustafsson, J.-Å. (2011). Estrogen Receptors and the Metabolic Network. *Cell Metabolism*, 14(3), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.005>
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*, 15(4), 798–808. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>
- Caballero, B. (2019). Humans against Obesity: Who Will Win? *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(suppl_1), S4–S9. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy055>
- Chahoud, I., & Paumgarten, F. J. R. (2009). Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: Is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? *Environmental Research*, 109(8), 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.07.015>
- Cheng, L., Wang, J., Dai, H., Duan, Y., An, Y., Shi, L., Lv, Y., Li, H., Wang, C., Ma, Q., Li, Y., Li, P., Du, H., & Zhao, B. (2021). Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte*, 10(1), 48–65. <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1870060>
- Cohen, P., & Kajimura, S. (2021). The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(6), 393–409. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00350-0>
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*, 8(8), 784. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Godfrey, K. M., Reynolds, R. M., Prescott, S. L., Nyirenda, M., Jaddoe, V. W. V., Eriksson, J. G., & Broekman, B. F. P. (2017). Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 5(1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30107-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30107-3)
- Gupta, R. K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R. J., Ye, L., Conroe, H. M., Roby, Y. A., Kulaga, H., Reed, R. R., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*, 464(7288), 619–623. <https://doi.org/10.1038/nature08816>
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
- Heyne, G. W., Plisch, E. H., Melberg, C. G., Sandgren, E. P., Peter, J. A., & Lipinski, R. J. (2015). A Simple and Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 54(4), 368–371.
- Hinte, L. C., Castellano-Castillo, D., Ghosh, A., Melrose, K., Gasser, E., Noé, F., Massier, L., Dong, H., Sun, W., Hoffmann, A., Wolfrum, C., Rydén, M., Mejhert, N., Blüher, M., & von Meyenn, F. (2024). Adipose tissue retains an epigenetic memory of obesity after weight loss. *Nature*, 636(8042), 457–465. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08165-7>
- Hoffman, D. J., Reynolds, R. M., & Hardy, D. B. (2017). Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutrition Reviews*, 75(12), 951–970. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>
- Holman, C. D., Sakers, A. P., Calhoun, R. P., Cheng, L., Fein, E. C., Jacobs, C., Tsai, L., Rosen, E. D., & Seale, P. (2024). Aging impairs cold-induced beige adipogenesis and adipocyte metabolic reprogramming. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.87756>
- Huo, D.-L., Bao, M.-H., Cao, J., & Zhao, Z.-J. (2022). Cold exposure prevents fat accumulation in striped hamsters refed a high-fat diet following food restriction. *BMC Zoology*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40850-022-00122-z>

- Ikeda, K., & Yamada, T. (2020). UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00498>
- Kajimura, S., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell Metabolism*, 11(4), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.005>
- Kazak, L., Chouchani, E. T., Jedrychowski, M. P., Erickson, B. K., Shinoda, K., Cohen, P., Vetrivelan, R., Lu, G. Z., Laznik-Bogoslavski, D., Hasenfuss, S. C., Kajimura, S., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2015). A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell*, 163(3), 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035>
- Kim, S. H., & Plutzky, J. (2016). Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes & Metabolism Journal*, 40(1), 12. <https://doi.org/10.4093/dmj.2016.40.1.12>
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>
- Lustig, R. H., Collier, D., Kassotis, C., Roepke, T. A., Kim, M. J., Blanc, E., Barouki, R., Bansal, A., Cave, M. C., Chatterjee, S., Choudhury, M., Gilbertson, M., Lagadic-Gossman, D., Howard, S., Lind, L., Tomlinson, C. R., Vondracek, J., & Heindel, J. J. (2022). Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 199, 115012. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115012>
- Mandrup, S., & Lane, M. D. (1997). Regulating Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5367–5370. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5367>
- Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002>
- Mauvais-Jarvis, F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of Sex Differences*, 6(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0033-y>
- Meyer, C. W., Reitmeir, P., & Tschöp, M. H. (2015). Exploration of Energy Metabolism in the Mouse Using Indirect Calorimetry: Measurement of Daily Energy Expenditure (DEE) and Basal Metabolic Rate (BMR). *Current Protocols in Mouse Biology*, 5(3), 205–222. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140216>
- Ministério da Saúde. (2022). *Manual de atenção as pessoas com sobrepeso e obesidade no âmbito da atenção primária a saúde (APS) do sistema único de saúde* (Secretaria de Atenção Primária à Saúde & Departamento de Promoção da Saúde, Eds.; 1º Edição). https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_atencao_pessoas_sobrepeso_obesidade.pdf
- Ministério da Saúde, & Vigitel. (2023). *Seis em cada dez adultos brasileiros estão acima do peso*. https://veja.abril.com.br/saude/seis-em-cada-dez-adultos-brasileiros-estao-acima-do-peso-aponta-ministerio-da-saude/?utm_medium=whatsapp#google_vignette
- Mo, Q., Deng, X., Zhou, Z., & Yin, L. (2025). High-Fat Diet and Metabolic Diseases: A Comparative Analysis of Sex-Dependent Responses and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms26104777>
- Neri, D., Ramos-Lobo, A. M., Lee, S., Lafond, A., & Zeltser, L. M. (2023). Rearing mice at 22°C programs increased capacity to respond to chronic exposure to cold but not high fat diet. *Molecular Metabolism*, 73, 101740. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101740>

- Okunogbe, A., Nugent, R., Spencer, G., Powis, J., Ralston, J., & Wilding, J. (2022). Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. *BMJ Global Health*, 7(9). <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2022-009773>
- Otto, T. C., & Lane, M. D. (2005). Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4), 229–242. <https://doi.org/10.1080/10409230591008189>
- Pan, R., Zhu, X., Maretich, P., & Chen, Y. (2020). Combating Obesity With Thermogenic Fat: Current Challenges and Advancements. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00185>
- Rimes-Dias, K. A., Costa, J. C., & Canella, D. S. (2022). Obesity and health service utilization in Brazil: data from the National Health Survey. *BMC Public Health*, 22(1), 1474. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13906-2>
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, 156(1–2), 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
- Scheele, C., & Wolfrum, C. (2020). Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism. *Endocrine Reviews*, 41(1), 53–65. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz007>
- Shamsi, F., Wang, C.-H., & Tseng, Y.-H. (2021). The evolving view of thermogenic adipocytes - ontogeny, niche and function. *Nature Reviews. Endocrinology*, 17(12), 726–744. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00562-6>
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y.-H., & Goodyear, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 215–223. <https://doi.org/10.1172/JCI62308>
- Suchacki, K. J., & Stimson, R. H. (2021). Nutritional Regulation of Human Brown Adipose Tissue. *Nutrients*, 13(6), 1748. <https://doi.org/10.3390/nu13061748>
- Suvorov, A., & Vandenberg, L. N. (2016). To Cull or Not To Cull? Considerations for Studies of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrinology*, 157(7), 2586–2594. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1145>
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, 378(9793), 804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
- van der Lans, A. A. J. J., Hoeks, J., Brans, B., Vijgen, G. H. E. J., Visser, M. G. W., Vosselman, M. J., Hansen, J., Jørgensen, J. A., Wu, J., Mottaghy, F. M., Schrauwen, P., & van Marken Lichtenbelt, W. D. (2013). Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3395–3403. <https://doi.org/10.1172/JCI68993>
- Vishvanath, L., & Gupta, R. K. (2019). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4022–4031. <https://doi.org/10.1172/JCI129191>
- Wen, J., Lv, A., Aihemaitijiang, S., Li, H., Zhou, Y., & Liu, J. (2025). The association of maternal gestational weight gain with cardiometabolic risk factors in offspring: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 83(2), e106–e115. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae027>
- Wen, X., Zhang, B., Wu, B., Xiao, H., Li, Z., Li, R., Xu, X., & Li, T. (2022). Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 298. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01149-x>
- World Health Organization. (2025, March 1). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Yan, J., Liu, L., Zhu, Y., Huang, G., & Wang, P. P. (2014). The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health*, *14*(1), 1267. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>
- Yoneshiro, T., Matsushita, M., Fuse-Hamaoka, S., Kuroiwa, M., Kurosawa, Y., Yamada, Y., Arai, M., Wei, Y., Iida, M., Kuma, K., Kameya, T., Harada, T., Matsumura, Y., Osawa, T., Aoki, Y., Nakamura, H., Hamaoka, T., Sakai, J., & Saito, M. (2025). Pre-fertilization-origin preservation of brown fat-mediated energy expenditure in humans. *Nature Metabolism*, *7*(4), 778–791. <https://doi.org/10.1038/s42255-025-01249-2>
- Yu, H., Dilbaz, S., Coßmann, J., Hoang, A. C., Diedrich, V., Herwig, A., Harauma, A., Hoshi, Y., Moriguchi, T., Landgraf, K., Körner, A., Lucas, C., Brodesser, S., Balogh, L., Thuróczy, J., Karemore, G., Kuefner, M. S., Park, E. A., Rapp, C., ... Röszer, T. (2019). Breast milk alkylglycerols sustain beige adipocytes through adipose tissue macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(6), 2485–2499. <https://doi.org/10.1172/JCI125646>

ANEXO I

Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília



Universidade de Brasília

Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 9 de abril de 2024.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Aquisição de tecido adiposo termogênico na infância e desfechos metabólicos e cognitivos na vida adulta**", SEI nº 23106.001016/2024-32, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Angélica Amorim Amato**, (**angelicamato@unb.br**), 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 de Experimentação Animal – CONCEA. Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 208ª reunião ordinária, em **06/02/2024** para fins de **PESQUISA** e para utilização de **Mus musculus (camundongo C57BL/6, 208 indivíduos, sendo 96 machos e 112 fêmeas)** provenientes do(a) Biotério da Universidade Estadual de Campinas.

O presente certificado é válido pelo período de **09/04/2024 a 01/04/2028**.




Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO II

Composição da dieta controle e da dieta hiperlipídica utilizadas no estudo in vivo

Quadro 2. Composição da dieta controle (AIN 93G).

Produto	Quantidade (%)	Quantidade (g/mL)
Amido de milho	39,75	4,80975
Caseína	20	2,42
Amido dextrinizado	13,2	1,5972
Sacarose	10	1,21
Óleo de soja	7	0,847
Celulose microcristalina	5	0,605
Mix mineral AIN 93G	3,5	0,4235
Mix vitaminas AIN 93G	1	0,121
L cistina	3	0,0363
Bitartarato de colina	0,25	0,03025
Butilhidroxitolueno (conservante)	0,0014	0,000169

Quadro 3. Composição da dieta hiperlipídica.

Produto	Quantidade (%)	Quantidade (g/mL)
Amido de milho	35,35	4,27735
Caseína	20	2,42
Amido dextrinizado	10	1,21
Sacarose	10	1,21
Óleo de soja	4	0,484
Banha	10,6	1,2826
Celulose microcristalina	5	,0605
Mix mineral AIN 93G	3,5	0,4235
Mix vitaminas AIN 93G	1	0,121
L cistina	0,3	0,0363
Bitartarato de colina	0,25	0,03025
Butilhidroxitolueno (conservante)	0,005	0,000605
Corante azul	0,005	0,000605