UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA)

Jessika Geisebel Oliveira Neto

Tratamento com cinamaldeído reprograma danos metabólicos induzidos pela superalimentação precoce em ratos

Niterói/RJ
2020

Jessika Geisebel Oliveira Neto

TRATAMENTO COM CINAMALDEÍDO REPROGRAMA DANOS METABÓLICOS INDUZIDOS PELA SUPERALIMENTAÇÃO PRECOCE EM RATOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biomédicas. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Karen de Jesus Oliveira

Niterói/RJ
2020

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

N469t Neto, Jessika Geisebel Oliveira
Tratamento com cinamaldeído reprograma danos metabólicos induzidos pela superalimentação precoce em ratos / Jessika Geisebel Oliveira Neto ; Karen de Jesus Oliveira, orientador. Niterói, 2020.
87 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020.

DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PPGFF.2020.d.14495321790

1. Obesidade precoce. 2. Cinamaldeído. 3. Programação metabólica. 4. Metabolismo lipídico. 5. Produção intelectual. I. Oliveira, Karen de Jesus, orientador. II. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. III. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Vanja Nadja Ribeiro Bastos - CRB7/2522

Jessika Geisebel Oliveira Neto

TRATAMENTO COM CINAMALDEÍDO REPROGRAMA DANOS METABÓLICOS INDUZIDOS PELA SUPERALIMENTAÇÃO PRECOCE EM RATOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biomédicas. Área de concentração: Fisiologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

_____

Drª Karen de Jesus Oliveira
Universidade Federal Fluminense

_____

Drª Luana Lopes de Souza
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

_____

Drª Isis Hara Trevenzoli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Dr D'Angelo Carlo Magliano
Universidade Federal Fluminense

_____

Drª Eliete Dalla Corte Frantz
Universidade Federal Fluminense

_____

Drª Patricia Cristina Lisboa da Silva (suplente)
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

_____

Drª Elisabeth Marostica (suplente)
Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Karen, por me receber no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabologia, obrigada por acreditar em mim e pela orientação nesses 6 anos de convivência. Obrigada por ser minha inspiração profissional e por todo aprendizado em endocrinologia (seu amor pela tireoide é contagiante). Obrigada pela paciência, confiança, e amizade.

As amigas do laboratório, tudo teria sido infinitamente mais difícil sem vocês. Obrigada Juliana Romão, Ana Luiza Romero, Silvia Boechat, Lia Ballard e Betina Magalhães pela amizade e bons momentos. Agradeço em especial a Silvia, Juliana e Lia, por toda a ajuda com os experimentos.

Agradeço a minha família, vocês são a minha base. Aos meus pais Joana e Roberto, que me ensinaram o amor pelos livros, e o valor do aprendizado, e perseverança. Ao meu marido Fernando pelo apoio incondicional.

RESUMO

Neto, Jessika. **Tratamento com cinamaldeído reprograma danos metabólicos induzidos pela superalimentação precoce em ratos.** 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020.

A nutrição nas fases iniciais da vida é um fator que contribui para a obesidade infantil e está relacionada com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta. O cinamaldeído, principal componente da canela, é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina, modular a adiposidade e o metabolismo lipídico. O objetivo foi analisar o impacto do tratamento com cinamaldeído durante a adolescência em modelo de obesidade precoce (induzido por redução da ninhada) no curto e longo prazo. Ratos Wistar machos foram tratados com cinamaldeído (40mg/Kg PC/dia, gavagem) a partir do 30º dia de vida (início da adolescência) por 30 dias. Aos 60 dias, o tratamento promoveu redução da adiposidade visceral, triacilglicerol sérico e atenuação da eficiência energética e resistência à insulina. O tratamento reduziu o diâmetro do adipócito no tecido adiposo branco (TAB) visceral e subcutâneo, reduziu a lipogênese em ambos, enquanto estimulou marcadores de *browning* no compartimento subcutâneo. No tecido adiposo marrom (TAM), promoveu aumento de marcadores de β-oxidação e termogênese. No fígado, foi observada redução da síntese lipídica, aumento da autofagia e redução do estresse de reticulo endoplasmático (RE). Aos 180 dias (4 meses após o tratamento), os animais apresentaram normalização da adiposidade visceral, do acúmulo de gordura no TAM e eficiência energética, atenuação da hiperfagia, hipertrigliceridemia e do conteúdo de triacilgliceróis hepáticos, com redução de marcadores lipogênicos. No TAB, o tratamento promoveu redução do diâmetro dos adipócitos e redução da lipogênese no TAB visceral, subcutâneo e TAM. No entanto, o efeito benéfico observado aos 60 dias na homeostase glicêmica, ativação do TAM, autofagia e estresse de RE no fígado foram perdidos. Portanto, a suplementação de cinamaldeído durante a adolescência tem efeitos benéficos no curto e longo prazos, destacando seu efeito reprogramador do metabolismo lipídico e potencial como adjuvante no tratamento da obesidade precoce.

Palavras-chave. Obesidade precoce, programação metabólica, metabolismo lipídico, autofagia, estresse de retículo, cinamaldeído.

ABSTRACT

Neto, Jessika. **Treatment with cinnamaldehyde reprograms metabolic damages induced by early overnutrition in rats**. 2020. Thesis (Doctor in Biomedical Science) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020.

Nutrition at the early stages of life contributes to childhood obesity development and is associated with other comorbidities in adult life. Cinnamaldehyde, the major component of cinnamon, increases insulin sensitivity, modulates adiposity and lipid metabolism, therefore this study aimed to analyze the impact of cinnamaldehyde treatment during adolescence in a rat model of early obesity (induced by litter size reduction). At postnatal day 30 (adolescence), the animals received cinnamaldehyde by gavage (40mg/Kg of body weight/day) for 30 days. Male Wistar rats were studied after ending treatment at 60 days of age, or 4 months thereafter (180 days of age). At 60 days of age, the treatment with cinnamaldehyde promoted reduced visceral adiposity, serum triacylglycerol, and attenuation of energy efficiency and insulin resistance. The treatment reduced adipocyte size in visceral and subcutaneous white adipose tissue (WAT), reduced lipogenesis in both, while stimulated browning markers in subcutaneous compartment. In brown adipose tissue (BAT), higher expression of marker of beta oxidation and thermogenesis were observed. In the liver, it was observed reduced lipid synthesis, stimulated autophagy and reduced endoplasmic reticulum (ER) stress. At 180 days of age, animals treated with cinnamaldehyde during the adolescence exhibited normalization of visceral adiposity, BAT lipid accumulation and energy efficiency, attenuation of hyperphagia, of serum hypertriglyceridemia and hepatic triacylglycerol content, with molecular markers indicative of reduced hepatic synthesis. At WAT, the treatment reduced adipocyte size and lipogenesis in visceral, subcutaneous WAT and BAT. However, the beneficial effect observed at 60 days on glucose homeostasis, BAT activation, autophagy and ER stress at liver, were lost. Therefore, the cinnamaldehyde supplementation during the adolescence has short- and long-term metabolic beneficial effects, highlighting its deprogramming effect and potential as an adjuvant in the treatment of early obesity.

Keywords: Early obesity, cinnamaldehyde, lipid metabolism, autophagy, ER stress, metabolic programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, TABELAS E FIGURAS

Ilustração 1. Adipócitos brancos e marrons
Ilustração 2. Metabolismo do triacilglicerol
Ilustração 3. Cadeia respiratória mitocondrial
Ilustração 4. Processo autofágico
Ilustração 5. Estresse de retículo endoplasmático
Ilustração 6. Esquema do desenho experimental
Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos (*primers*) usados para avaliar a expressão de RNAm
Tabela 2. Parâmetros metabólicos e morfométricos dos animais aos 60 dias de idade
Tabela 3. Parâmetros metabólicos e morfométricos dos animais aos 180 dias de idade
Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos aos 60 e 180 dias de idade após tratamento com cinamaldeído durante a fase da adolescência em modelo de obesidade precoce induzida pela superalimentação na lactação
Figura 1. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco epididimal aos 60 dias de idade
Figura 2. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco inguinal aos 60 dias de idade
Figura 3. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo marrom aos 60 dias de idade
Figura 4. Metabolismo de triacilglicerol hepático aos 60 dias de idade
Figura 5. Metabolismo de colesterol hepático aos 60 dias de idade
Figura 6. Marcadores da via autofágica no fígado aos 60 dias de idade
Figura 7. Marcadores do estresse de RE no fígado aos 60 dias de idade
Figura 8. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco epididimal aos 180 dias de idade
Figura 9. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco inguinal aos 180 dias de idade
Figura 10. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo marrom aos 180 dias de idade
Figura 11. Metabolismo do triacilglicerol hepático aos 180 dias de idade
Figura 12. Metabolismo do colesterol hepático aos 180 dias de idade
Figura 13. Marcadores da via autofágica no fígado aos 180 dias de idade
Figura 14. Marcadores do estresse de RE no fígado aos 180 dias de idade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Colesterol aciltransferase 1 (*Cholesterol acyltransferase 1*)
ACC	Acetil-CoA carboxilase 1 (*Acetyl-CoA carboxylase 1*)
AG	Ácido graxo
AKT	Proteína quinase B (*Protein kinase B*)
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)
ARβ3	Receptor adrenérgico beta 3 (*Beta 3 adrenergic receptor*)
ATF	Fator ativador da transcrição (*Activating transcription factor*)
ATG	Gene relacionado à autofagia (*Autophagy related gene*)
ATGL	Lipase de triacilglicerol do adipócito (*Adipose triglyceride lipase*)
Beclin1	Equivalente de mamífero do gene ATG6 (*The mammalian counterpart of the yeast ATG6 gene*)
BIP	Chaperona do retículo endoplasmático (*Endoplasmic reticulum chaperone*)
CHOP	Proteína homóloga C/EBP (*C/EBP homologous protein*)
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1 (*Carnitine palmitoyltransferase 1*)
CT	Grupo controle
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase (*Diacylglycerol acyltransferase*)
eIF2α	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 alfa (*Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*)
ERAD	Degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*)
FAZ	Ácido graxo sintase (*Fatty acid synthase*)
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21 (*Fibroblast growth factor 21*)
GAPDH	Glicerol 3 fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
HMGCoAr	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A*)
HOMA-IR	Índice do Modelo de Avaliação da Homeostase para determinação da resistência à insulina (*Homeostatic model assessment insulin resistant*)
HSL	Lipase hormônio sensível (*Hormone-sensitive lipase*)
IL1β	Interleucina 1 beta (*Interleukin 1 beta*)
IL6	Interleucina 6 (*Interleukin 6*)
IRE1α	Enzima ativada por inositol 1 alfa (*Inositol-requiring enzyme 1 alpha*)
JNK	c-Jun N-terminal quinase (*c-Jun N-terminal kinase*)
LAMP2	Proteína de membrana 2 associada ao lisossomo (*Lysosomal associated membrane protein-2*)
LC3	Proteína leve associada à microtúbulos 3 (*Microtubule-associated protein light chain 3*)
LDLR	Receptor para lipoproteína de baixa densidade (*Low-density lipoprotein receptor*)
LPL	Lipoproteína lipase (*Lipoprotein lipase*)
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (*Mammalian target of rapamycin complex 1*)

NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica (*Nonalcoholic fatty liver disease*)
NRF2	Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
p62	Sequestossomo 1 (*Sequestosome 1*)
PERK	Proteína quinase endoplasmática similar à PKR (*Protein endogenous endoplasmic reticulum kinase similar to PKR*)
PGC1α	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*)
PI3K	Fosfatidilinositol3-quinase (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)
PPARα	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*)
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
PRDM16	Co-regulador de domínio PR 16 (*PR-domain containing 16*)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Quantitative real time polimerase chain reaction*)
RE	Retículo endoplasmático
SL	Grupo superalimentado
SLC	Grupo superalimentado tratado com cinamaldeído
SREBP1c	Proteína ligadora do elemento regulador de esteróis 1c (*Sterol regulatory element-binding protein 1c*)
SREBP2	Proteína de ligação ao elemento regulador do esterol 2 (*Sterol regulatory element-binding protein 2)*
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TLC	Cromatografia em camada fina (*Thin layer chromatography*)
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)
UCP1	Proteína desacopladora 1 (*Uncoupling protein 1*)
UPR	Resposta à proteína não dobrada (*Unfolded protein response*)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very low-density lipoprotein*)
WHO	Organização mundial da saúde (*World Health Organization)*
XBP1s	Proteína de ligação a X-box 1 (*Spliced X-box binding protein 1*)
36β4	*60S acidic ribosomal protein P0*

SUMÁRIO

RESUMO....vi
ABSTRACT....vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, TABELAS E FIGURAS....viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS....ix
1. INTRODUÇÃO....1
1.1. Programação metabólica....1
1.2. Obesidade e disfunções metabólicas....3
1.3. Tecido adiposo branco....4
1.4. Tecido adiposo marrom e bege....5
1.5. Fígado....8
1.6. Metabolismo lipídico celular....9
1.6.1. Regulação....9
1.6.2. Lipogênese....9
1.6.3. Lipólise....11
1.6.4. β-oxidação mitocondrial e produção de ATP/calor....12
1.7. Autofagia e estresse de retículo endoplasmático....14
1.8. Canela e cinamaldeído....19
2. OBJETIVO....22
2.1. Objetivos específicos....22
3. MÉTODO....23
3.1. Desenho experimental....23
3.2. Insulina sérica, perfil lipídico e glicemia....25
3.3. Concentrações lipídicas hepáticas....25
3.4. *Western blot*....26
3.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)....27
3.6. Histologia....29
3.7. Análise estatística....29
4. RESULTADOS....30
4.1. A superalimentação precoce induziu alterações metabólicas nos ratos jovens. 30
4.2. O tratamento com cinamaldeído induziu resultados benéficos no curto prazo. 31

4.3. O tratamento com cinamaldeído reduziu a obesidade hipertrófica e modulou marcadores de função do TAB no compartimento inguinal e epididimal no curto prazo. 31

4.4. O tratamento com cinamaldeído estimulou marcadores de função e regulação do tecido adiposo marrom no curto prazo 35

4.5. O tratamento com cinamaldeído melhorou o metabolismo lipídico hepático, estimulou a autofagia e reduziu o estresse de RE no curto prazo 37

4.6. O tratamento com cinamaldeído durante a adolescência resultou em benefícios metabólicos no longo prazo 41

4.7. O tratamento com cinamaldeído reduziu a obesidade hipertrófica e modulou marcadores de função do TAB no compartimento inguinal e epididimal no longo prazo. 42

4.8. O tratamento com cinamaldeído reduz o *whitening* do tecido adiposo marrom no longo prazo..... 47

4.9. O tratamento com cinamaldeído induziu alterações benéficas no metabolismo lipídico hepático, enquanto os efeitos sobre a autofagia e estresse de RE são perdidos no longo prazo 49

5. DISCUSSÃO 55

6. CONCLUSÃO..... 65

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

1. INTRODUÇÃO

A obesidade está associada ao desenvolvimento de diversas disfunções metabólicas, que quando ocorrem de forma precoce, aumentam a predisposição de manter ou agravar estas disfunções na vida adulta. A programação do metabolismo ocorre devido a alterações epigenéticas que alteram o padrão de expressão gênica de diversos tecidos, sendo estas alterações estáveis, mas potencialmente reversíveis (Engin, 2017; Stefanidis & Spencer, 2012; Barker 2004)

Dentre estes tecidos, o tecido adiposo branco, marrom e o fígado desempenham papéis importantes na manutenção do metabolismo de glicose e lipídeos, e no desenvolvimento das doenças crônicas associadas. Desregulação de vias como as lipogênicas e oxidativas/termogênicas, assim como de seus reguladores, estão diretamente relacionadas ao acúmulo de gordura e a disfunção do tecido (Luo & Liu, 2016). Além disso, o estresse do retículo endoplasmático e alteração do processo autofágico levam a prejuízos no desempenho celular e contribuem para agravar as alterações sistêmicas (Zhang *et al*., 2019).

O cinamaldeído é um composto capaz de modular positivamente o metabolismo lipídico, reduzindo as vias lipogênicas e os depósitos de gordura, além de agir diretamente sobre a sinalização de insulina, aumentando a sensibilidade tecidual (Yazdanpanah *et al*., 2019; Zuo *et al*., 2017). Dessa forma, hipotetizamos que o cinamaldeído suplementado durante a fase da adolescência (ainda considerado uma janela de programação), poderia ser usado para o tratamento das disfunções metabólicas associadas à obesidade precoce, através da reprogramação ou reprogramação do metabolismo.

1.1. Programação metabólica

A plasticidade do desenvolvimento é a capacidade de um organismo de modificar seu fenótipo em resposta a estímulos. Os períodos iniciais da vida, como a gestação, infância e adolescência são muito importantes para o adequado desenvolvimento do organismo. Nestes períodos críticos do desenvolvimento, observa-se grande capacidade plástica de resposta aos estímulos ambientais, hormonais e/ou alimentares. Quando as respostas adaptativas geram fenótipos com alterações nas funções

endócrino-metabólicas, este fenômeno é chamado de programação metabólica, e pode ser resultado de alterações no número de células ou na estrutura dos tecidos, na produção hormonal, no padrão de expressão gênica, entre outros fatores (Barker, 2004; Moura & Passos, 2005). Alterações nutricionais qualitativas ou quantitativas podem promover alterações epigenéticas e desequilíbrio metabólico precoce, com a exibição de disfunções metabólicas que perduram até a idade adulta (Conceição *et al*., 2013; Franco *et al*., 2012; Habbout *et al*., 2013; Stefanidis & Spencer, 2012).

Alterações quantitativas e qualitativas na alimentação materna e da prole durante os períodos críticos do desenvolvimento como a gestação, lactação e infância tem grande impacto para o desenvolvimento e metabolismo da prole que podem perdurar por toda a vida. A desnutrição materna, por exemplo, leva ao nascimento de bebês com baixo peso, o que está relacionado com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, como obesidade e diabetes tipo 2 (Moura & Passos, 2005). Em concordância, restrição calórica de 20 a 40% durante a gestação e/ou lactação levam a obesidade, resistência à insulina e resistência a leptina na vida adulta (Ayala-Moreno *et al*., 2013; Palou *et al*., 2012).

Por outro lado, a obesidade materna durante a gestação e/ou lactação também podem ter consequências graves no desenvolvimento. Modelos animais de obesidade materna durante a gestação e lactação mostraram o desenvolvimento de obesidade e hiperinsulinemia, e doenças cardio-metabólicas na prole adulta (Fan *et al*., 2013; Franco *et al*., 2015). Além disso, a superalimentação durante o período da lactação programa a prole para o desenvolvimento de obesidade, hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemia e NAFLD (Habbout *et al*., 2013)

Estas alterações adaptativas são possíveis através das modificações epigenéticas, que provocam alterações nos padrões de expressão gênica. A regulação epigenética consiste em mudanças na estrutura da cromatina, sem alterar o código genético, que ocorrem principalmente em regiões promotoras. A metilação do DNA, acetilação de histonas e RNAs de interferência são as principais alterações epigenéticas que alteram a atividade de determinado gene (Attig *et al*., 2010; Pinney & Simmons, 2012).

As alterações epigenéticas podem ser revertidas através de alterações na dieta e estilo de vida (Cheng *et al*., 2018), evidenciando a importância de buscar estratégias para minimizar ou reverter a programação metabólica. Já foi mostrado que intervenções

na dieta podem ter efeitos benéficos. O consumo de óleo de peixe, rico em lipídios poli-insaturados n-3 EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexanoico), melhora a adiposidade, dislipidemia e a tolerância a glicose em modelos de obesidade (Albracht-Schulte *et al*., 2018). Souza e colaboradores (2019) mostraram que a obesidade materna programa a prole para o desenvolvimento de obesidade e esteatose hepática na vida adulta. No entanto, ao fazer uma intervenção com óleo de peixe apenas durante a fase da adolescência (período crítico do desenvolvimento) foi capaz de atenuar os desfechos deletérios da obesidade materna. Os autores mostraram que óleo de peixe foi capaz de reprogramar o metabolismo da prole durante a exposição na adolescência levando a um fenótipo de menor adiposidade visceral e acúmulo de gordura hepática na vida adulta.

1.2. Obesidade e disfunções metabólicas

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso de acúmulo de gordura no tecido adiposo branco, que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. A gênese da doença é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e sociais, e está associada a desordens metabólicas e ao desenvolvimento de comorbidades como resistência à insulina, dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease* - NAFLD), doenças cardiovasculares e câncer (Arroyo-Johnson & Mincey, 2016; Engin, 2017). Na progressão da doença, observam-se desequilíbrios moleculares e celulares que comprometem a função de diversos tecidos metabolicamente ativos, como tecido adiposo branco e marrom, e fígado. No tecido adiposo branco, observa-se capacidade de expansão comprometida, hipertrofia, aumento da inflamação, e metabolismo lipídico e glicídico alterado (Goossens, 2017).

A obesidade infantil é ainda mais preocupante, pois o número de crianças e adolescentes obesos aumentou de forma alarmante nas últimas quatro décadas (WHO, 2016). Um estudo da *NCD Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC, 2017) avaliou o índice de obesidade e sobrepeso em crianças e adolescentes de todas as partes do mundo (entre 1975 e 2016) e identificou que a prevalência aumentou de 0,7% para cerca de

7,8% em ambos os sexos. Em 2016 cerca de 50 milhões de meninas, e cerca de 74 milhões de meninos ao redor do mundo eram obesos (NCD-RisC, 2017).

O período pós-natal e da adolescência são determinantes para o correto desenvolvimento da massa tecido adiposo. Nesses 2 períodos, ocorre a proliferação e aumento do tamanho do adipócito (Knittle *et al*., 1979; Lemonnier, 1972). A nutrição nessas fases é de extrema importância e impactam a fisiologia do tecido adiposo, levando a efeitos deletérios prolongados que contribuem para a disfunção metabólica sistêmica associada à obesidade infantil (Holtrup *et al*., 2017).

1.3. Tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco (TAB) é formado por adipócitos, pré-adipócitos, e também por células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos e leucócitos. É um tecido especializado no armazenamento da gordura na forma de triacilglicerol (TAG), que ocorre na forma de uma única gotícula que ocupa 80 a 90% do citoplasma do adipócito, deslocando o núcleo e outras organelas para a periferia (Ilustração 1). Além do armazenamento de energia, os adipócitos brancos possuem um importante papel endócrino, produzindo diversos hormônios com ações metabólicas e fisiológicas, como a leptina, adiponectina, entre outros (Galic *et al*., 2010).

A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos cuja função é sinalizar para o sistema nervoso central a massa adiposa do organismo, de forma que sua produção é proporcional ao tamanho do adipócito. A leptina atua principalmente no hipotálamo estimulando a saciedade e aumentando o gasto energético. Na obesidade, observa-se resistência central à ação da leptina, um dos fatores que contribui para o desenvolvimento da hiperfagia (Galic *et al*., 2010; Gruzdeva *et al*., 2019). Por outro lado, o aumento do adipócito é inversamente proporcional à produção de adiponectina, importante hormônio sensibilizador da insulina (Fang & Judd, 2018).

O TAG pode ser armazenado em diferentes compartimentos, localizados principalmente na região subcutânea (TAB subcutâneo), ou na cavidade torácica e abdominal (TAB visceral). O armazenamento no compartimento visceral é muito mais deletério para o organismo, sendo esse compartimento o principal responsável pela inflamação crônica de baixo grau característico da obesidade (Crujeiras *et al*., 2019).

Isso acontece por que o compartimento visceral é mais propenso à hipertrofia (aumento do tamanho do adipócito), levando a compressão dos vasos que irrigam o tecido adiposo, e ao desenvolvimento de hipóxia, e consequentemente, morte celular. Em resposta, ocorre a infiltração de macrófagos, com mudança de perfil anti-inflamatório para pró-inflamatório, e produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos, fator de necrose tumoral alfa (TNFα), interleucina 1 beta (IL1β) e interleucina 6 (IL6). Além disso, a hipóxia também leva ao aumento da produção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos, principalmente devido ao estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático (RE) (Masoodi *et al*., 2015; Shimizu & Walsh, 2015). A inflamação que ocorre no tecido adiposo branco visceral é um fator importante para o desenvolvimento de resistência à insulina sistêmica devido à interferência negativa na via de sinalização da insulina em tecidos como músculo e fígado (Crujeiras *et al*., 2019).

Na obesidade, o aumento de lipídeos circulantes provenientes da alimentação estimula não só a hipertrofia, mas também a hiperplasia (aumento do número de células) do TAB, principalmente durante a infância e adolescência devido intensa adipogênese, favorecendo ainda mais o acúmulo de gordura na vida adulta. Além disso, o aumento de lipídeos circulantes favorece o depósito de TAG em outros tecidos metabolicos como fígado, pâncreas, músculo e tecido adiposo marrom (TAM), comprometendo o funcionamento celular (van Herpen & Schrauwen-Hinderling, 2008).

1.4. Tecido adiposo marrom e bege

Os adipócitos marrons são células especializadas na produção de calor através da termogênese. Essas células são caracterizadas pela morfologia multilocular no armazenamento do TAG, são ricos em mitocôndrias e possuem alta taxa de oxidação (Ilustração 1). A produção de calor ocorre devido a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) na membrana interna das mitocôndrias, o que permite que a energia seja dissipada na forma de calor (Luo & Liu, 2016).

A função termogênica do TAM é regulada principalmente pelo sistema nervoso simpático, via ativação dos receptores adrenérgicos presentes na membrana do adipócito. A ativação tanto do receptor adrenérgico, quantos dos receptores para hormônios tireoidianos levam a transcrição de genes como UCP1, Co-ativador 1 alfa do

receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1α), receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARα) e gama (PPARγ) (Bargut *et al*., 2016).

Um terceiro tipo de adipócito foi identificado recentemente e classificado como bege. Os adipócitos bege estão presentes principalmente no TAB subcutâneo e apresentam morfologia multilocular e expressão de UCP1 (Montanari *et al*., 2017). O recrutamento e a diferenciação dos adipócitos bege podem ser induzidos por diversos fatores como a norepinefrina, PPARγ, pelo fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), irisina, hormônios tireoidianos, entre outros. Este processo de diferenciação de pré-adipócitos, ou transdiferenciação de adipócitos brancos maduros para adipócito bege (com características termogênicas) é chamado de *browning* (Ilustração1). O co-regulador de domínio PR 16 (PRDM16) é um fator de transcrição que controla a diferenciação para adipócito bege, através da ligação com o PPARγ e PGC1α, que estimula a biogênese mitocondrial e a expressão de UCP1. O PRDM16 também atua reprimindo a expressão de genes característicos dos adipócitos brancos (Barquissau *et al*., 2016; Montanari *et al*., 2017).

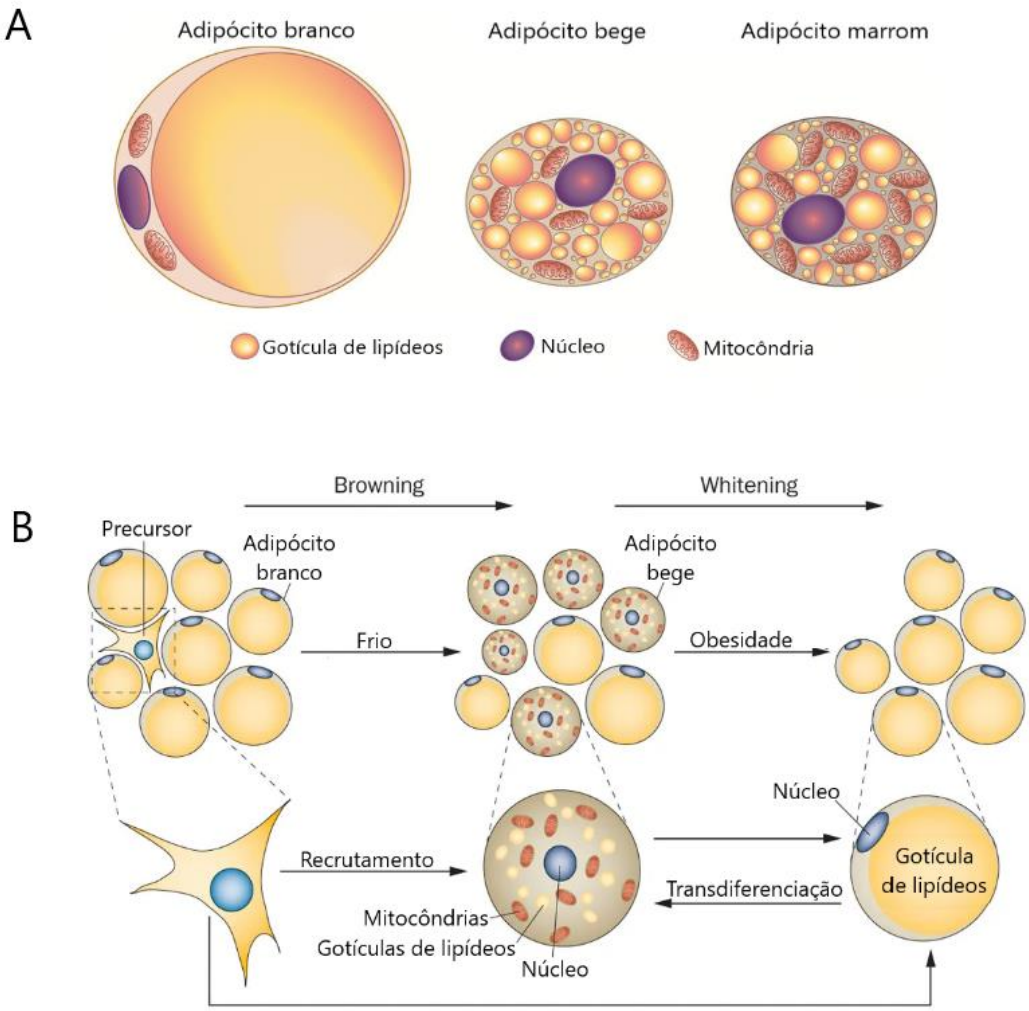


Ilustração 1. A: Adipócitos branco, bege e marrons. Os adipócitos brancos possuem a função primária de armazenamento, caracterizado pelo acúmulo unilocular do triacilglicerol e poucas mitocôndrias. Os adipócitos marrons possuem a função primária de produzir calor através da termogênese, e são caracterizados pelo acúmulo de triacilglicerol multilocular e rico em mitocôndrias. Adaptado de Paul, 2018. **B:** Os adipócitos brancos podem ser estimulados a se diferenciarem/transdiferenciarem a adipócitos bege (com característica de marrom e capacidade termogênica) através do processo de *browning*. Quando expostos a um quadro obesogênico, tanto os adipócitos marrons, quanto os bege podem se transdiferenciam a branco (com perda da capacidade termogênica) através do processo de *whitening*. Adaptado de Bartelt e Heeren 2013.

Além de participar do processo de *browning* e da indução da termogênese, o FGF21 é uma molécula expressa no fígado, pâncreas, músculo e tecido adiposo, e que têm chamado atenção devido aos seus efeitos anti-diabéticos e anti-obesogênicos (Sonoda *et al*., 2017). O FGF21 melhora a sensibilidade à insulina, aumenta a secreção de adiponectina pelo tecido adiposo branco, além de promover perda de peso em modelos de obesidade (Coskun *et al*., 2008; Xu *et al*., 2009). A estimulação do

processo de *browning* no TAB e ativação do TAM, têm sido apontado como uma estratégia para aumentar o gasto energético e atuar na prevenção e tratamento da obesidade (Barquissau *et al*., 2016; Montanari *et al*., 2017; Poher *et al*., 2015).

1.5. Fígado

O fígado é um órgão metabólico importante para o metabolismo de carboidratos e lipídeos. Ele recebe substratos provenientes da alimentação através do sistema porta-hepático, e capta a glicose por um processo de difusão facilitada pelo transportador de glicose que é usado principalmente para formar o estoque de glicogênio. A glicose também é direcionada para a síntese de ácidos graxos (AG) através da lipogênese *de novo*. Em situação de demanda energética, os estoques de glicogênio hepático são quebrados para liberar glicose na circulação. A glicose também pode ser sintetizada a partir de substratos como aminoácidos, lactato e glicerol através da gliconeogênese (Rui, 2014).

Tanto os AGs provenientes da lipogênese *de novo* quanto os captados da circulação (provenientes da lipólise do TAB ou da alimentação) são esterificados a TAG e armazenados e/ou usados para a formação das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são liberados na circulação e transportados para outros tecidos. O colesterol presente na circulação pode ser proveniente da alimentação, através da absorção intestinal, ou pela síntese de colesterol *de novo*. No fígado, o colesterol é esterificado para ser armazenado nas gotículas de lipídeos, ou são usados para formar VLDL. O processo de formação do VLDL ocorre no RE, em que TAG, fosfolipídeos e colesterol são transportados para a apolipoproteína B. Uma vez na circulação, os VLDLs perdem TAG ao passar pelos tecidos, formando as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em colesterol. O transporte reverso do colesterol periférico para o fígado ocorre através das lipoproteínas de alta densidade (HDL), onde é excretado pela bile fezes (Rui, 2014; Yu *et al*., 2019).

No fígado, o acúmulo intracelular de triacilglicerol é chamado de esteatose hepática, o processo inicial para o desenvolvimento da NAFLD. A esteatose está diretamente relacionada com o desenvolvimento de resistência à insulina e inflamação, aumentando o risco de desenvolvimento de fibrose, cirrose e até carcinoma hepatocelular (Byrne &

Targher, 2015). A prevalência mundial de NAFLD é alta em pacientes que apresentam obesidade e diabetes tipo 2, chegando a 64% (Younossi *et al*., 2019).

1.6. Metabolismo lipídico celular

1.6.1. Regulação

O metabolismo lipídico celular nos adipócitos e hepatócitos compartilha vias em comum. O acúmulo de gordura ocorre devido a diversas alterações, que levam ao aumento da captação, síntese e armazenamento de gordura e/ou diminuição da lipólise e oxidação/liberação (Masoodi *et al*., 2015). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são membros de uma grande família de receptores nucleares que desempenham papel fundamental no metabolismo lipídico em diversos tecidos. O PPARγ é expresso principalmente no tecido adiposo (branco e marrom) em que atua na indução da adipogênese, lipogênese e sensibilidade à insulina, além de estar envolvido com a termogênese e o processo de *browning*. Já o PPARα, é um importante indutor da β-oxidação lipídica, expresso predominantemente no fígado, mas também no TAM e TAB. O PPARα expresso no TAM atua em conjunto com PGC1α (fator de transcrição que estimula a biogênese mitocondrial) para indução da termogênese (Corrales *et al*., 2018). A proteína ligadora do elemento regulador de esteróis 1c (SREBP1c), estimulada principalmente pela insulina, e a proteína de ligação do elemento responsivo à carboidratos (ChREBP) atuam na transcrição de enzimas lipogênicas envolvidas na etapa de captação dos ácidos graxos livres da circulação, e na síntese de triacilglicerol a partir dos ácidos graxos (lipogênese) e a partir da glicose (lipogênese *de novo*). O SREBP1c age na indução da lipogênese principalmente no fígado, enquanto ChREBP age principalmente no TAB e TAM junto ao PPARγ (Song *et al*., 2018).

1.6.2. Lipogênese

Os lipídeos são obtidos pelos hepatócitos e adipócitos (branco e marrom) através de duas vias: pela captação direta dos ácidos graxos circulantes, e através da lipogênese *de novo*. A energia é armazenada na forma de TAG, onde é necessária uma fonte de glicerol-3-fosfato (obtido a partir da glicose, proveniente principalmente da via glicolítica) e de AG livres complexados a coenzima A. O AG livre pode ser captado direto da

circulação a partir dos TAGs presentes nas VLDL e quilomícrons produzidos no fígado e intestino, respectivamente. A hidrólise dos TAGs presentes nas VLDL e quilomícrons, é catalisada pela enzima lipoproteína lipase (LPL) presente no endotélio vascular, que libera AG livres e glicerol. Os AG livres entram na célula através de transportadores de AG como o CD36 e a proteína transportadora de ácido graxo (FATP), que atuam como um facilitador da difusão. Uma vez dentro da célula, os AGs são carreados através do citosol pela proteína de ligação aos ácidos graxos (FABP) até a enzima acil-CoA sintase que adiciona uma coenzima A ao AG para formar acil-CoA. O acil-CoA é transportado pela proteína de ligação ao acil-CoA (ACBP) para o local de esterificação ao glicerol 3 fosfato (Calderon-Dominguez *et al*., 2016; Engin, 2017b) (Ilustração 2).

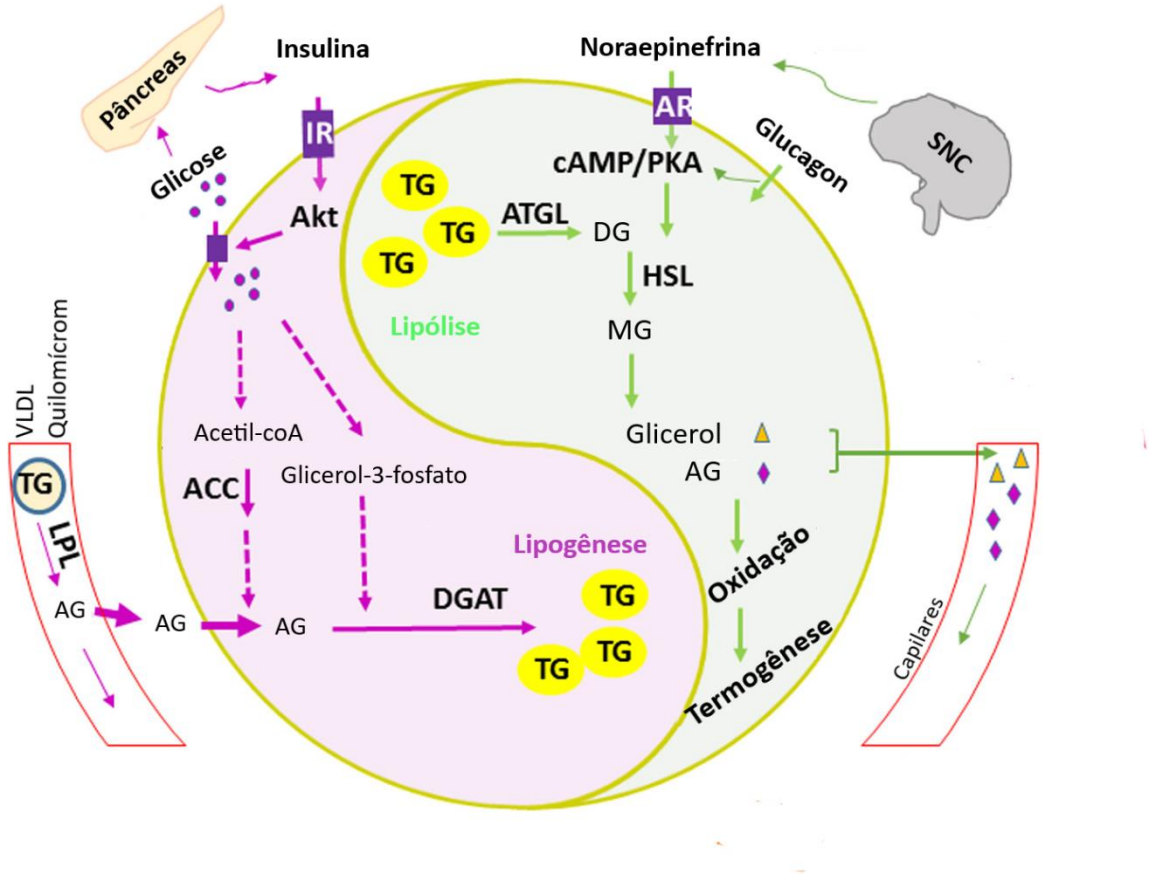


Ilustração 2. Metabolismo do triacilglicerol. No estado alimentado, ocorre o estímulo para a lipogênese: captação do AG a partir da circulação, e esterificação para formar TAG. Síntese de AG a partir da glicose pela via da lipogênese *de novo*. Durante o jejum, ocorre o estímulo para a lipólise: quebra dos estoques de TAG e liberação de ácidos graxos e glicerol na circulação, ou oxidação/termogênese. ACC: acetil-CoA carboxilase. AG: ácido graxo. AKT: proteína quinase B. AR: receptor adrenérgico. ATGL: Lipase de triacilglicerol do adipócito. DG: diacilglicerol. DGAT: diacilglicerol aciltransferase. HSL: lipase hormônio sensível. IR: receptor de insulina. LPL: lipoproteína lipase. MG: monoacilglicerol. PKA: proteína quinase A. SNC: sistema nervoso central. TG: triacilglicerol. Adaptado de Luo & Liu 2016.

Na lipogênese *de novo*, o TAG é formado a partir da glicose. O fígado é o principal local de formação de TAG a partir da lipogênese *de novo*, mas ela também ocorre nos adipócitos (Song *et al*., 2018). Nessa via, a glicose captada da circulação entra principalmente na via glicolítica e na via do ácido tricarboxílico para produzir citrato na mitocôndria, que é então transportado para o citosol e convertido a acetil-CoA pela enzima ATP-citrato liase (ACLY). A enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) catalisa a formação do acetil-CoA a malonil-CoA, que é convertido a ácido palmítico (palmitato) pela ácido graxo sintase (FAS). Por último, o ácido palmítico é convertido a ácido graxo monoinsaturado pela enzima estearoil-CoA desnaturase 1 (SCD1), e a seguir esterificado para formar TAG. Durante o processo de esterificação, a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) é responsável pela última etapa de formação do TAG, onde o terceiro acil-CoA é adicionado e o TAG armazenado. A DGAT está presente na membrana do retículo endoplasmático, mitocôndria e das gotículas de lipídeos (Calderon-Dominguez *et al*., 2016; Song *et al*., 2018)(Ilustração 2).

As gotículas de lipídeos são uma forma eficiente e segura de armazenar o excesso de energia na forma de tracilgliceróis neutros. Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de TAG, e o fazem nas gotículas compostas por uma monocamada de fosfolipídeos, que se originam no RE (Barneda & Christian, 2017). O acúmulo de TAG, e suas frações, em outros tecidos levam ao desenvolvimento da lipotoxicidade e consequentemente ao comprometimento da função celular. O fígado é um órgão chave no metabolismo de lipídeos, e também é capaz de armazenar TAG em pequenas gotículas. No entanto, o conteúdo de lipídeos no fígado é baixo, e não excede 5% de gordura/massa de fígado. Quando esse valor é ultrapassado, o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos pode ser danoso para o tecido, e o processo passa a ser chamado de esteatose (van Herpen & Schrauwen-Hinderling, 2008).

1.6.3. Lipólise

O TAG armazenado nas gotículas de lipídeos é hidrolisado pela via lipolítica para liberar ácidos graxos livres e glicerol em situações de demanda energética. Os ácidos graxos livres provenientes da lipólise do TA servem como substrato para a β-oxidação em diversos tecidos, enquanto o glicerol é captado pelo fígado para formar glicose

através da gliconeogênese. A lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) está presente na membrana da gotícula de gordura e catalisa o primeiro passo da lipólise, em que ocorre a quebra do TAG a diacilglicerol. A lipase hormônio sensível (HSL) é recrutada para a gotícula e catalisa a quebra a monoacilglicerol. A lipase de monoacilglicerol (MGL), presente tanto no citosol quanto na membrana da gotícula, quebra o monoacilglicerol e libera o glicerol e o terceiro AG livre (Luo *&* Liu, 2016) (Ilustração 2).

1.6.4. β-oxidação mitocondrial e produção de ATP/calor

A mitocôndria é uma organela chave para o metabolismo celular e geração de energia, além de participar da manutenção da homeostase de cálcio e dinâmica redox (Picard *et al*., 2018). Ácidos graxos livres entram na via de β-oxidação que ocorre na matriz mitocondrial, e para isso os AG são esterificados a Acil-CoA pela ACSL, presente na membrana da mitocôndria, para então ser transportado para o interior da organela. Acil-CoA interage com a enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), localizada na membrana externa da mitocôndria e responsável por produzir Acil-carnitina, que é conduzido para dentro da mitocôndria por uma translocase, onde volta a ser acil-CoA pela ação da CPT2 (Mashek, 2013). Acil-CoA passa por ciclos de β-oxidação que levam a formação de NADH e $FADH_2$ e acetil-CoA. NADH e $FADH_2$ transferem elétrons a cadeia respiratória presente nas cristas da membrana interna mitocondrial. Ao final da cadeia respiratória, o oxigênio é usado como aceptor final de elétron e reage com prótons para formar água. A passagem dos elétrons pelas proteínas da cadeia respiratória promove o bombeamento dos prótons para o espaço inter-membranas. O gradiente de prótons formado retorna para a matriz através da ATP sintase, que usa a força próton-motriz para sintetizar ATP (Nsiah-Sefaa & McKenzie, 2016; Picard *et al*., 2018)(Ilustração 3).

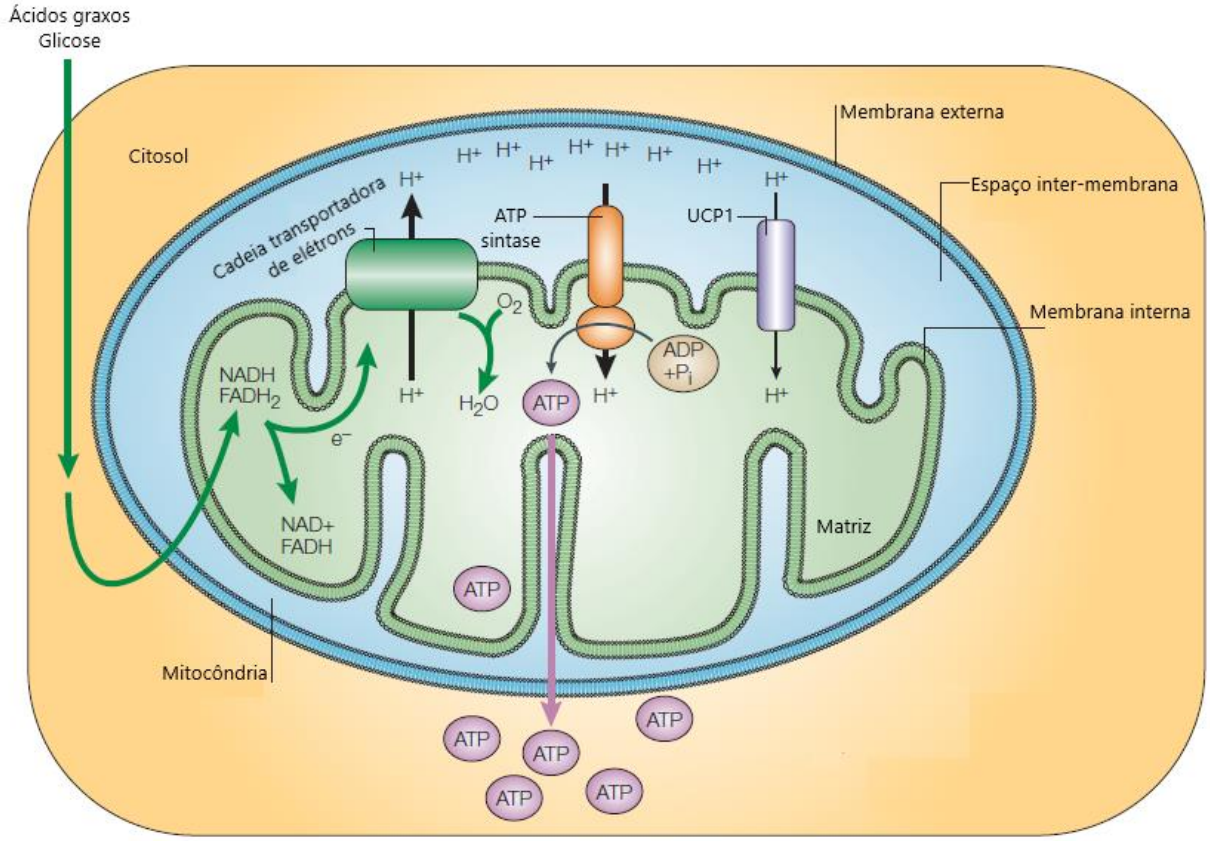


Ilustração 3. Cadeia respiratória mitocondrial. NADH e $FADH_2$ provenientes da metabolização dos substratos energéticos doam elétrons e prótons para a cadeia respiratória. A passagem dos elétrons pelos complexos da cadeia respiratória promove o bombeamento dos prótons presente na matriz, para o espaço inter-membrana. Os prótons retornam para a matriz pela ATP sintase e a força próton-motriz é usada para formar ATP. A presença da UCP1 na membrana interna desacopla a cadeia respiratória e permite o retorno dos prótons por ela, e a energia é dissipada na forma de calor. UCP1: proteína desacopladora 1. NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio. $FADH_2$: Flavina-Adenina-Dinucleótidio. ATP: Adenosina trifosfato. ADP: Adenosina difosfato. H^+: Próton. e^-: Elétron. Adaptado de Krauss *et al*., 2005.

Nos adipócitos marrons e bege, a presença de UCP1 na membrana interna da mitocôndria desacopla a cadeia respiratória, desviando o retorno de prótons pela UCP1 e a energia gerada se dissipa na forma de calor (Bargut *et al*., 2016)(Ilustração 3). Dessa forma, uma disfunção na fisiologia mitocondrial tem sido associada a uma redução da oxidação dos substratos energéticos como os lipídeos, podendo contribuir para o acúmulo de gordura dentro da célula e contribuir para a progressão da obesidade e doenças associadas (López-Lluch, 2017).

1.7. Autofagia e estresse de retículo endoplasmático

Autofagia é um processo catabólico intracelular fisiológico, essencial para a manutenção do controle de qualidade celular. O processo ocorre pela digestão e reciclagem de organelas velhas ou danificadas, agregados proteicos e gotículas de lipídeos. Na macroautofagia, ocorre a formação de um autofagossomo, formado por dupla membrana que engloba partes do citoplasma e organelas inteiras. Posteriormente, o autofagossomo se funde ao lisossomo, e o seu conteúdo é hidrolisado pela ação das enzimas lisossomais liberando aminoácidos, glicose e AG livres para serem reutilizados pela célula (Eskelinen, 2019).

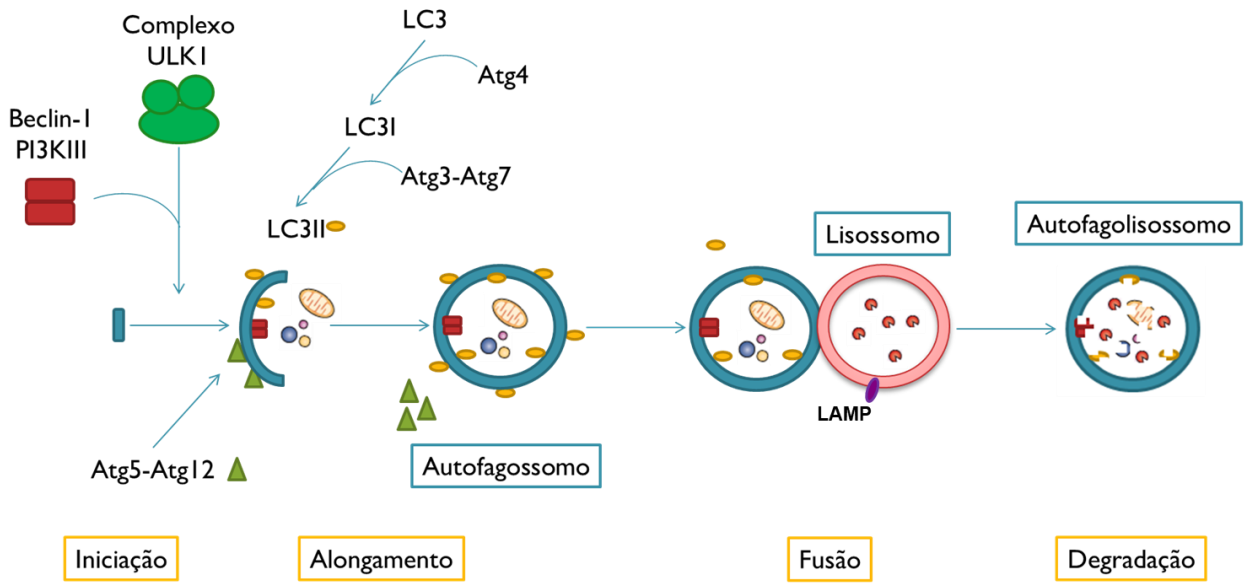


Ilustração 4: Processo autofágico. Iniciação: dupla membrana é recrutada. Alongamento: a vesícula se forma ao redor do material a ser degradado. Fusão: o autofagossomo se funde ao lisossomo. Degradação: o conteúdo é degradado pelas enzimas lisossomais. ATG: proteínas relacionadas à autofagia. LC3I: forma inativa da proteína leve associada à microtúbulos 3. LC3II: forma ativa da proteína leve associada à microtúbulos 3. LAMP: proteína de membrana associada ao lisossomo. PI3KIII: fosfatidilinositol-3-quinase classe III. Arquivo pessoal.

A maquinaria molecular básica da autofagia envolve a atividade das proteínas relacionadas à autofagia (ATG), que participam da formação de autofagossomo. O processo se inicia com o complexo quinase ativadora de autofagia 1 semelhante a unc-51 (ULK1) que se liga a uma dupla membrana isolada (fagófaro) para dar início a formação do autofagossomo. A proteína fosfatidilinositol-3-quinase classe III (PI3KIII), a qual se encontra complexada a proteína Beclin1 (equivalente de mamífero do gene ATG6), produz o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), uma molécula lipídica

sinalizadora essencial para recrutamento de outros complexos e alongamento do autofagossomo. No alongamento, o complexo ATG5-ATG12 é recrutado até o fagófaro. Enquanto isso, a proteína leve associada à microtúbulos 3 (LC3), sintetizada numa forma precursora, é clivada pela ATG4 resultando na forma citosólica LC3I. LC3I é então conjugada a fosfatidiletanolamida pela ação do complexo ATG7-ATG3, para formar o LC3II, que se une a membrana do fagófaro. O alongamento do fagófaro se inicia ao redor das moléculas/organelas a serem degradadas, e então o complexo ATG5/ATG12 é clivado, enquanto LC3II permanece ligado à membrana interna e externa do autofagossomo. A LAMP2 (proteína de membrana 2 associada ao lisossomo) está presente na membrana do lisossomo e do autofagolisossomo e participa do processo de fusão. Ao se fundir com o lisossomo, ATG4 cliva o LC3II na membrana externa, enquanto o LC3II presente na membrana interna é degradado dentro do autolisossomo (Galluzzi *et al*., 2017)(Ilustração 4).

Os principais reguladores do processo autofágico são o complexo mTOR1 (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e o AMPK (proteína quinase ativada por AMP). O complexo mTOR1 inibe a autofagia, e é ativado principalmente pela via Insulina/ Fosfatidilinositol3-quinase (PI3K)/Proteína quinase B (AKT). A AMPK é sensível ao estado energético da célula, sendo ativado pelo aumento da relação AMP/ATP. A AMPK ativada, inibe mTOR1 levando ao aumento da autofagia (Codogno & Meijer, 2005).

Na obesidade, a autofagia pode estar tanto aumentada, quanto reduzida, dependendo do tecido estudado e do estágio de desenvolvimento da obesidade. Essa variação torna o estudo da autofagia na obesidade complexo, e a desregulação do processo autofágico está diretamente relacionado com a disfunção tecidual e o desenvolvimento das doenças metabólicas (Zhang *et al*., 2018). No fígado, tem sido mostrado que a obesidade se correlaciona com a diminuição da lipofagia, processo autofágico envolvido com a degradação das gotículas de lipídeos (Christian *et al*., 2013). A redução da lipofagia contribui para o aumento do acúmulo de gordura no fígado e consequentemente para o desenvolvimento da esteatose hepática (Lavallard & Gual, 2014). No TAM, a obesidade está correlacionada com a redução da lipofagia, mas principalmente com o aumento da mitofagia, processo que degrada e recicla mitocôndrias disfuncionais, contribuindo para a redução do número de mitocôndrias e

perda da função termogênica (Shimizu & Walsh, 2015). Já no TAB, o estímulo da autofagia é importante para diferenciação celular e atua em conjunto com a lipólise para degradação dos estoques de TAG (Ferhat *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2018).

Além das modificações no padrão da autofagia, tem sido mostrado que a disfunção do RE pode levar a alteração no metabolismo celular e contribuir para o acúmulo de gordura e a resistência à insulina em diversos tecidos. Em situações patológicas e/ou de estresse metabólico, como acúmulo de lipídeos e estresse oxidativo, a demanda por síntese proteica aumenta e pode ocorrer uma queda na qualidade das proteínas produzidas pelo retículo e consequentemente um acúmulo de proteínas malformadas e mal enoveladas (Senft & Ronai, 2015).

Com o objetivo de restaurar a homeostase, o RE inicia uma resposta adaptativa denominada resposta à proteína não dobrada (UPR), que ocorre a partir da ativação de três diferentes vias de sinalização mediadas por receptores presentes na membrana RE: proteína quinase endoplasmática similar à PKR (PERK); enzima ativada por inositol 1 alfa (IRE1α) e fator ativador de transcrição 6 (ATF6). Esses 3 receptores estão acoplados a chaperona BIP (chaperona do retículo endoplasmático). A medida que as proteínas malformadas se acumulam no lúmem do RE, as BIP se ligam a essas proteínas, liberando IRE1α, PERK e ATF6 para ativação. De forma geral, essas três vias regulam a transcrição gênica de vários fatores envolvidos na expansão do RE, diminuição na síntese de proteínas, aumento da síntese de chaperonas, degradação de proteínas malformadas e resposta inflamatória e anti-oxidante (Hetz *et al*., 2015; Senft & Ronai, 2015)(Ilustração 5).

A PERK fosforila e ativa o fator de iniciação da tradução eucariótica 2 alfa (eIF2α), que inibe a tradução global de proteínas, enquanto facilita a transcrição do fator ativador da transcrição 4 (ATF4). O ATF4 é responsável pela indução de fatores pré-apoptóticos como a proteína homóloga C/EBP (CHOP) e consequentemente a proteína de parada de crescimento celular induzida por danos ao DNA (GADD34) durante o estresse crônico. A PERK também é responsável pela forsforilação do fator nuclear eritróide 2-relacionado ao fator 2 (NRF2), um importante fator anti-oxidante. Quando ativada, a IRE1α age como endonuclease levando ao *splicing* do RNAm da XBP1 (proteína de ligação a X-box 1), cuja proteína estimula a transcrição de chaperonas, componentes da degradação de proteínas associada ao RE (ERAD) e a biossíntese de

fosfolipídios, que contribui para a expansão do RE. IRE1α também pode agir como RNAse, degradando RNAm presentes na membrana do RE e também reduzindo o aporte de proteínas. Já o ATF6 quando liberado, é transportado pra o complexo de Golgi onde é clivado e ativado. O ATF6 também age como fator de transcrição e regula componentes do ERAD, expansão do RE e transcrição de chaperonas (Cnop *et al*., 2012).

A disfunção crônica da organela contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina através principalmente da via da lRE1α, no qual leva a ativação da c-Jun N-terminal quinase (JNK) e fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina tipo 1 (sítio inibitório) (Sun *et al*., 2015). Além disso, o estresse do retículo pode levar a clivagem e maturação do SREBP1c presente na membrana do RE, o que contribui para ativação da maquinaria lipogênica (Fang *et al*., 2013; Kammoun *et al*., 2009).

O estresse de RE está diretamente relacionado a progressão da NAFLD no fígado, devido ao estabelecimento de um estado inflamatório durante a UPR. A Via da PERK leva a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB), que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IL1β e IL6. Dessa forma estresse de RE estimula a inflamação, que por sua vez contribui para a permanência do estado de estresse, gerando um ciclo vicioso (Passos *et al*., 2015).

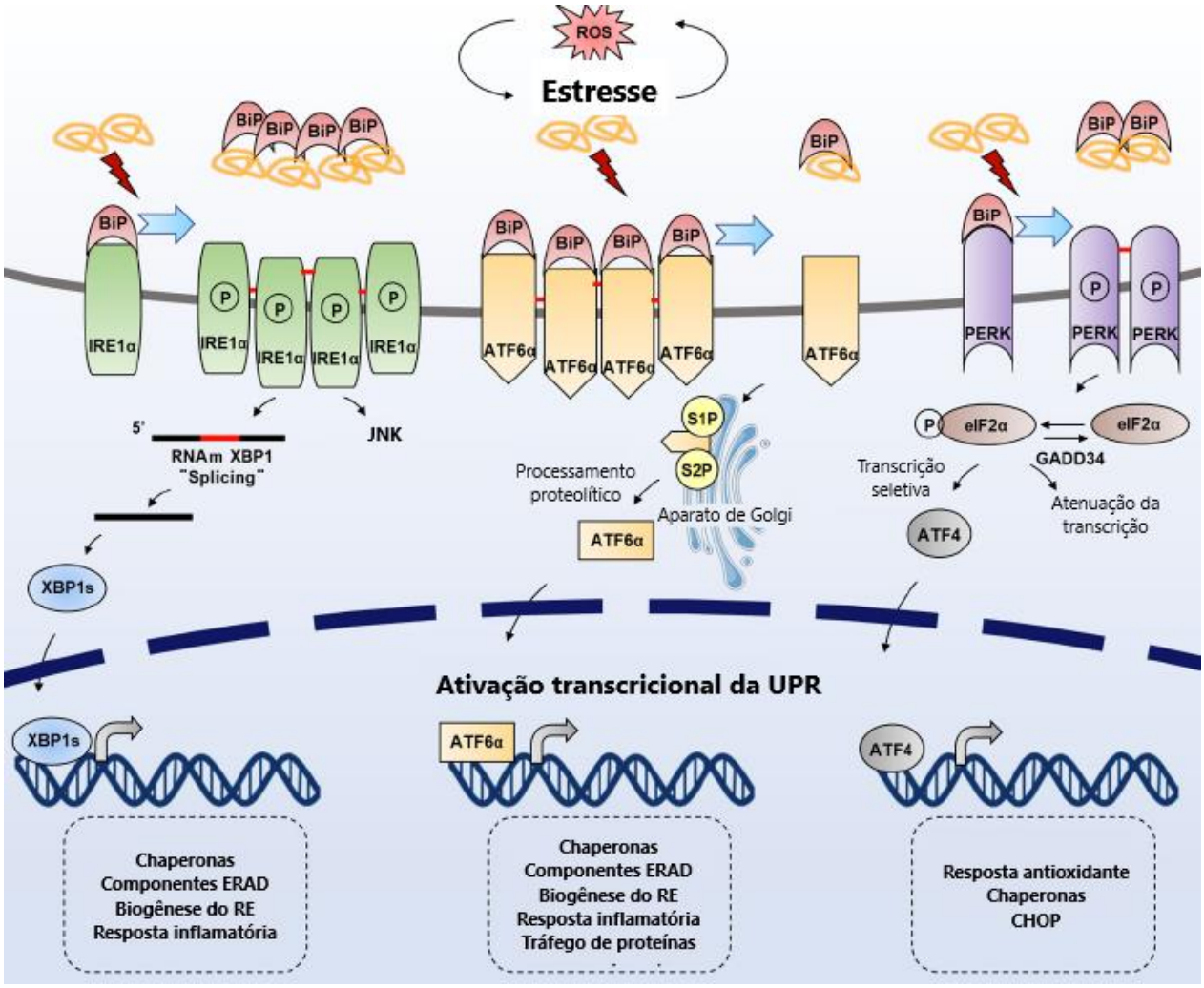


Ilustração 5. Estresse de retículo endoplasmático. Em situação de estresse, a Bip se desacopla dos 3 receptores presentes na membrana e permite a ativação das vias de sinalização. Via ATF6, que precisa ser clivado no Aparato de Golgi para sua ativação. Via IRE1-XBP1. Via PERK-eIF2α-ATF4. ATF4, ATF6, XBP1 atuam como fatores de transcrição e regulam a expressão de diversos genes. ATF4: fator ativador da transcrição 4. ATF6: fator ativador de transcrição 6. BIP: chaperona do retículo endoplasmático. CHOP: proteína homóloga C/EBP. eIF2α: fator de iniciação da tradução eucariótica 2 alfa. IRE: enzima ativada por inositol. JNK: c-Jun N-terminal quinase. NRF2: fator nuclear eritróide 2-relacionado ao fator 2. PERK: proteína quinase endoplasmática similar à PKR. XBP1: proteína de ligação a X-box 1. Adaptado de Zhang *et al*., 2019.

Disfunção na via autofágica contribui para o estabelecimento do estresse de RE. Por outro lado, a UPR estimula o processo autofágico como um mecanismo complementar de degradação para a remoção de agregados proteicos, gotículas de lipídeos, mitocôndrias disfuncionais, e partes do retículo danificado e contribuir para o restabelecimento da homeostase. Durante a UPR, a ativação da IRE1α-JNK fosforila a linfoma de células B (Bcl2); esta se encontra complexada a Beclin1, e quando ativada, libera a Beclin1 para a formação do autofagossomo. Além disso, a XBP1s estimula a

transcrição da Beclin1, enquanto o ATF4 regula a expressão da ATG5 e ATG12, que participam junto ao LC3 do alongamento do autofagossomo (Zhang *et al*., 2019).

1.8. Canela e cinamaldeído

A canela (*Cinnamomun verum*) é uma das especiarias mais consumidas no mundo, com efeitos benéficos comprovados, principalmente quanto à melhora da homeostase glicêmica, atuando como insulina-símile e potencializando os efeitos da insulina (Allen *et al*., 2013; Khan *et al*., 2003; Hlebowicz *et al*., 2007; Ranasinghe *et al*., 2013) Trabalhos também demonstram os benefícios da canela quanto a composição corporal, redução do ganho de peso e do perfil lipídico (Couturier *et al*., 2010; Khan *et al*., 2003; Lopes *et al.*, 2015; Yazdanpanah *et al*., 2019) , além de apresentar importante ação anti-oxidante (Kaur *et al*., 2019) e anti-inflamatória (Khare *et al*., 2016). Dessa forma, o uso da canela tem sido apontado como uma especiaria capaz de reduzir complicações associadas à obesidade e comorbidades (Kwan *et al*., 2017; Mollazadeh & Hosseinzadeh, 2016), que ocorre via modulação de vias lipogênicas e de lipólise e oxidação no TAB e fígado (Lopes *et al*., 2015; Kwan *et al*., 2017).

A canela é considerada um nutracêutico de baixa toxicidade, em que é possível observar efeitos benéficos no metabolismo na dose entre 1 a 6 gramas de canela por dia, como demostrado em estudos em humanos (Allen *et al*., 2013; Hlebowicz *et al*., 2007). É importante ressaltar que os estudos explorando os efeitos da canela tanto na homeostase glicêmica, quanto na composição corporal são feitos em animais/indivíduos adultos. Esses efeitos em modelo de obesidade em idades como a infância e adolescência nunca foram investigados.

Dentre os componentes bioativos da canela, o cinamaldeído se destaca devido a sua alta concentração (~90% do óleo essencial da canela) (Ranasinghe *et al*., 2013, 2012), e sua capacidade de mediar os efeitos benéficos da canela como anti-diabetogênico e anti-obesogênico (Camacho *et al*., 2015; Huang *et al*., 2007), anti-oxidante (Subash Babu *et al*., 2007) e anti-inflamatório (Khare *et al*., 2016).

De forma interessante, a canela é amplamente divulgada como uma especiaria termogênica, entretanto, são poucas e recentes as evidências na literatura sobre seu papel sobre a termogênese no TAM e *browning* no TAB subcutâneo (Kwan *et al.,* 2017).

Quanto à atividade do TAM, já foi mostrado que o cinamaldeído estimula a termogênese através do aumento de marcadores como PPARγ, PRDM16, PGC1α e UCP1 (Khare *et al*., 2016; Tamura *et al*., 2012; Zuo *et al*., 2017). Além disso, o cinamaldeído é capaz de estimular o *browning* no tecido adiposo branco, aumentando a expressão de genes relacionados à termogênese, como o FGF21 e a UCP1 (Jiang *et al*., 2017; Zuo *et al*., 2017). No trabalho de Jiang e colaboradores (2017), foi mostrado que o cinamaldeído, em cultura primária de adipócitos subcutâneos (murino e humano), o componente é capaz de aumentar a expressão de genes relacionados à termogênese, de forma dependente do FGF21.

Os efeitos da canela e/ou cinamaldeído sobre a termogênese pode ser um mecanismo complementar que contribua para redução da gordura e melhora da composição corporal. Ainda é preciso explorar os mecanismos envolvidos na ativação do tecido adiposo marrom e avaliar em modelo de obesidade precoce se a termogênese estimulada pelo cinamaldeído possa contribuir para a reversão desse quadro. Quanto aos mecanismos de ação, já foi descrito que componentes do extrato de canela (Sheng *et al*., 2008) e o cinamaldeído (Li *et al*., 2015) atuam como agonistas dos PPARs, sendo esse possivelmente um dos mecanismos envolvidos na indução da β-oxidação, termogênese e redução da lipogênese e consequentemente de modulação da composição corporal e sensibilidade à insulina.

A canela vem sendo apontada na literatura como um nutracêutico com potencial para ser um adjuvante no tratamento de desordens metabólicas devido ao seu efeito benéfico no metabolismo energético. Sabendo da importância da obesidade infanto-juvenil e sua associação com diversas doenças metabólicas, a busca por tratamentos curativos e preventivos é de extrema importância. Intervenções durante a fase da adolescência pode ser uma estratégia para o tratamento da obesidade precoce, uma vez que o período da adolescência ainda possui grande capacidade plástica adaptativa, sendo considerada uma janela de programação. Além disso, avaliar alterações moleculares de vias relacionadas ao metabolismo lipídico, autofagia e estresse de RE em tecidos metabólicos é essencial para compreender os mecanismos associados ao desenvolvimento e tratamento da doença. Dessa forma, é possível que tratamentos na fase da adolescência revertam as alterações metabólicas induzidas pela obesidade precoce e reduzam o risco de desenvolver doenças associadas a longo prazo.

Hipotetizamos que tratamento com cinamaldeído durante a adolescência seja capaz de melhorar o quadro da obesidade infanto-juvenil e comorbidades associadas tais como dislipidemia e resistência à insulina. Além disso, é possível que os efeitos benéficos do cinamaldeído perdurem após a suspensão do tratamento, revertendo de forma permanente alterações negativas associadas à obesidade infanto-juvenil.

2. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar o potencial do cinamaldeído como tratamento da obesidade precoce, caracterizando os mecanismos moleculares no fígado, tecido adiposo branco e marrom no curto e longo prazo.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar os seguintes parâmetros nos animais aos 60 dias de idade (logo após o tratamento) e aos 180 dias de idade (4 meses após o fim do tratamento):

- Massa corporal dos animais, ingestão alimentar, eficiência energética e massa dos tecidos (fígado, tecido adiposo branco visceral, tecido adiposo marrom);
- Glicemia, perfil lipídico e insulina;
- Morfologia do tecido adiposo branco (subcutâneo e visceral) e tecido adiposo marrom por histologia;
- Conteúdo de triacilglicerol, ácidos graxos livres, colesterol total e esterificado no fígado por cromatografia em camada fina;
- Expressão de RNAm de genes envolvidos no metabolismo do tecido adiposo branco subcutâneo e visceral por PCR em tempo real;
- Expressão de RNAm de genes envolvidos no metabolismo, regulação e fluxo autofágico no tecido adiposo marrom por PCR em tempo real;
- Expressão de RNAm de genes envolvidos no metabolismo de triacilglicerol, colesterol, marcadores da autofagia e estresse de RE no fígado por PCR em tempo real;
- Expressão proteica de marcadores da autofagia e estresse de RE no fígado por *Western blot*.

3. MÉTODO

3.1. Desenho experimental

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (nº 711/2015). Ratos Wistar foram mantidos no biotério do Instituto Biomédico da UFF, com temperatura de aproximadamente 24°C, ciclo claro (12h) e escuro (12h) controlados (luzes acesas às 7h), e livre acesso à água e ração comercial (Nuvilab, Brasil).

Os animais, com idade de 2 a 3 meses, foram colocados para acasalamento na proporção de três fêmeas para um macho. Quando identificada a gestação, as fêmeas foram separadas e alocadas em gaiolas individuais. Para a indução da obesidade precoce, 72h após o nascimento, as ninhadas foram reduzidas para 3 machos por mãe (grupo superalimentado - SL - N=38; total de 14 mães)(Ilustração 6). As ninhadas do grupo controle foram ajustadas para 10 machos (grupo controle - CT - N=23; total de 7 mães). Foram utilizadas somente ninhadas com 8 filhotes ou mais.

Os filhotes foram desmamados aos 21 dias de idade e alocados em gaiolas com 4 animais cada. Aos 30 dias de idade (início da adolescência) (Schneider, 2013), iniciou-se o tratamento com cinamaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) em metade do grupo SL (grupo superalimentado tratado com cinamaldeído - SLC). O tratamento foi feito na dose de 40mg/Kg de massa corporal/dia, por gavagem, ao longo de 30 dias (Huang *et al*., 2011). O grupo controle e o restante do grupo SL recebeu veículo (Dimetilsulfóxido [DMSO] 0,5%) por gavagem. Após 24h da última dose de tratamento, parte dos animais foi sacrificado (60 dias de idade) (Ilustração 6). Os grupos analisados aos 60 dias de idade foram chamados: CT60 (N=10); SL60 (N=10); SLC60 (N=10). A outra parte foi mantida até a idade adulta (180 dias de idade), com livre acesso a água e comida (Ilustração 6). Os grupos analisados aos 180 dias de idade foram chamados: CT180 (N=13); SL180 (N=9); SLC180 (N=9). Cada grupo foi formado usando animais machos de diferentes ninhadas, de forma que todos os grupos possuem ao menos um animal de cada mãe utilizada no estudo.

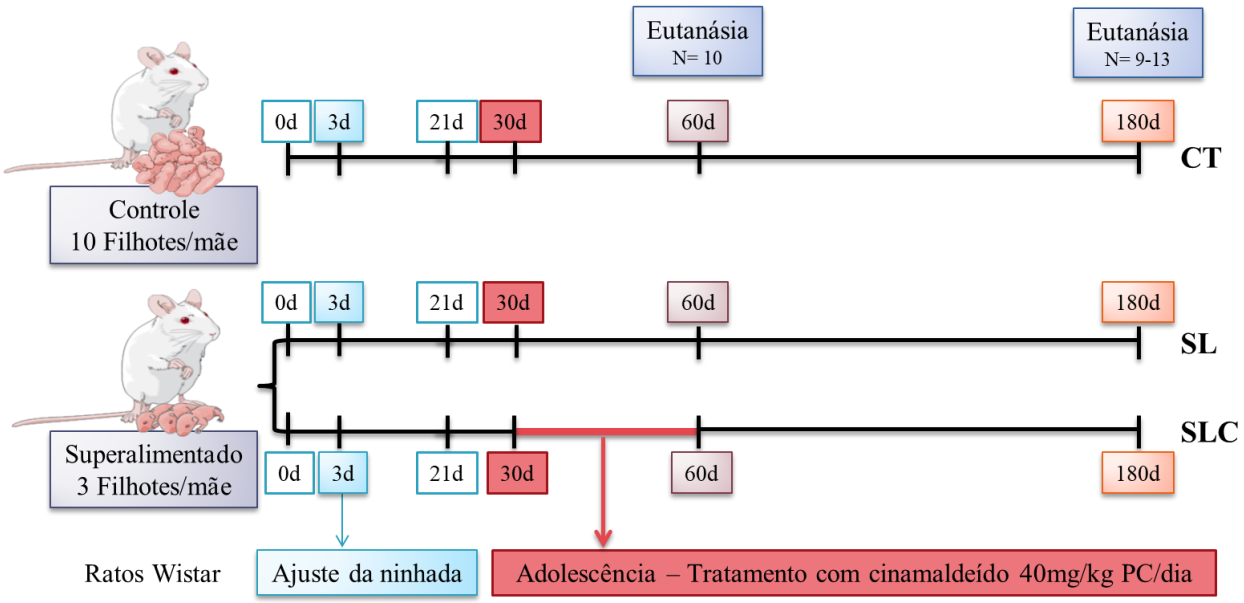


Ilustração 6. Esquema do desenho experimental. 0d - dia do nascimento; 3d - dia do ajuste da ninhada para 3 filhotes/mãe ou 10 filhotes/mãe; 21d - dia do desmame; 30d - início do tratamento com cinamaldeído; 60d - eutanásia dos grupos aos 60 dias de idade; 180d - eutanásia dos grupos aos 180 dias de idade. CT: grupo controle. SL: grupo superalimentado. SLC: grupo superalimentado tratado com cinamaldeído.

Durante a lactação os animais foram pesados diariamente. Após o desmame a massa corporal e a ingestão alimentar foram monitorados 3 vezes por semana. O tratamento e cuidado dos animais foram realizados com a colaboração da aluna Silvia Karl Boechat.

Os animais aos 60 e 180 dias de idade foram sacrificados por decapitação após 3h de jejum e o sangue do tronco foi coletado e centrifugado (1600*g*, 4º C, 15 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado a -70º C. O fígado, tecido adiposo branco (compartimento epididimal) e tecido adiposo marrom foram coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70º C para análises moleculares. O tecido adiposo branco inguinal (compartimento subcutâneo) foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70º C. O tecido adiposo branco retroperitoneal também foi dissecado e pesado. A soma das massas dos compartimentos epididimal e retroperitoneal representa a massa do tecido adiposo branco visceral (Mann *et al*., 2014). A eficiência energética foi calculada usando a massa de tecido adiposo branco visceral dividido pela ingestão total de alimentos (massa de tecido adiposo branco visceral [mg]/ingestão total de alimento [g]). Para os grupos analisados aos 60 dias de idade, o consumo total de alimentos

compreendeu o período do tratamento (30 a 60 dias), e para os grupos analisados aos 180 dias de idade, o consumo total compreendeu o período do tratamento até 180 dias de vida.

3.2. Insulina sérica, perfil lipídico e glicemia

As concentrações séricas de insulina foram analisadas por radioimunoensaio através de kit comercial (Linco Research, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram medidas no mesmo ensaio e a variação intra-ensaio foi de 3,5% e o resultado foi expresso em µIU/mL. O colesterol, triacilglicerol e glicose no soro foram medidos por meio de ensaios colorimétricos utilizando kits comerciais (Colesterol Liquiforme, Triglicerídeo Liquiforme e Glucose Liquiforme, Labtest, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL. A resistência à insulina foi medida de acordo com a avaliação Índice do Modelo de Avaliação da Homeostase para determinação da resistência à insulina (HOMA-IR) pela equação: glicemia em jejum em [mg/dL] × insulina em jejum [µIU/mL] /405 (Antunes *et al*., 2016).

3.3. Concentrações lipídicas hepáticas

As concentrações de lipídios hepáticos foram avaliadas pela técnica de cromatografia em camada fina (TLC). Homogeneização do tecido foi feita em tampão de lise por tampão de lise (Hepes 50mM, $MgCl_2$ 1mM, EDTA 10 mM e Triton X 1%) a partir de 30 mg de fígado e posteriormente normalizado pela concentração de proteínas. Após quantificação, o equivalente a 3000 µg de proteína foi misturado a uma solução de clorofórmio-metanol (1:2 v/v) e agitado de forma intermitente (durante a noite). A mistura foi centrifugada (1000*g* durante 20 minutos a 20° C), e ao sobrenadante foram adicionados 1mL de água e 1mL de clorofórmio. Após centrifugação (1000*g* durante 20 minutos, em temperatura ambiente), a fase orgânica (contendo os lipídeos) foi removida e seca usando nitrogênio gasoso (N_2). Os lipídeos extraídos foram analisados por TLC unidimensional para lipídeos neutros. Os lipídeos foram separados numa placa de sílica (Silicagel, Merck Millipore, HE, Alemanha), usando uma solução de hexano/éter dietílico/ácido acético na proporção 60:40:1. As soluções padrão: triacilglicerol,

colesterol, éster de colesterol e ácido graxo foram usados como referência. Para visualização dos lipídeos, as placas foram carbonizadas após serem imersas numa solução de 10% de $CuSO_4$ e 8% de H_3PO_4 (v/v) e aquecidas a 150 °C durante 10 minutos. As placas foram analisadas por densitometria (software ImageJ, EUA). Os resultados foram expressos em micrograma por micrograma de proteína. Para análise do TLC, foram utilizadas 9 amostras por grupo.

3.4. *Western blot*

Para a análise proteica, 50 mg fígado foram homogeneizados em tampão de lise contendo inibidores de protease e fosfatase (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor mini Tablet, Thermo Scientifc, EUA). A concentração total de proteínas foi quantificada utilizando kit de ensaio de proteínas BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientifc). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10-15% SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond, GE, Alemanha). A membrana foi então bloqueada em 3% de albumina sérica bovina (BSA, INLAB), ambos diluídos em TBS-T (tampão salina com Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%, com 0,1% de Tween) em temperatura ambiente, durante 1 hora para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário. Sequencialmente, a membrana foi incubada overnight a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: anti-LC3B (1:1000, cód 3868, Cell Signaling, EUA), anti-Beclin1 (1:1000, cód 3495, Cell Signaling), anti-ATG12 (1:1000, cód 4180, Cell Signaling), anti-AMPK fosforilado (1:500, cód sc-101630, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-IRE1α (1:200, cód sc-20790, Santa Cruz Biotechnology), anti-Xbp1s (1:500, cód 12782, Cell Signaling), anti-PERK fosforilada (1:400, cód sc-32577, Santa Cruz Biotechnology), anti-eIF2α fosforilado (1:400, cód 3398, Cell Signaling). A ciclofilina (1:1000, cód sc-20361, Santa Cruz Biotechnology) foi usada como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos. Após o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, específico para a origem do anticorpo primário (diluição de 1:10.000 a 1:40.000), durante 2 horas em temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL Prime (Healthcare, GE) e as imagens das bandas foram

obtidas com o sistema ChemiDoc (Bio-Rad, EUA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi determinada utilizando o software ImageJ, versão 1.48.

3.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Análise da expressão de RNAm foi feita no fígado, tecido adiposo marrom e branco (compartimento epididimal e inguinal) por PCR em tempo real. Aproximadamente 50 a 60 mg de tecido foram usados para extração de RNA total usando o reagente Trizol (TRIzol Reagent®, Invitrogen®, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado através da leitura em absorbância de 260nm e a pureza foi avaliada pela razão 260/280nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 06 a 1µg de RNA total usando a enzima Transcriptase Reversa (Superscript III, Invitrogen®, EUA). O PCR em tempo real, foi feita com o kit GoTaq® qPCR Master Mix (DNA polimerase, Promega, EUA), equipamento Step One Real-Time PCR system (Applied Biosystems, EUA), para quantificação dos genes seguindo os seguintes parâmetros: 95°C por 2 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos; 60°C por 60 segundos. Após os 40 ciclos, os amplicons foram avaliados quanto à sua especificidade pela curva de dissociação (*melting*). As sequências dos oligonucleotídeos usados para os genes de interesse estão descritos na tabela 1. O gene de referência *Rplp0* (36β4) foi usado no fígado e TAM, e o *Gapdh* (GAPDH) no TAB epididimal e inguinal. A expressão dos genes de referência não apresentou variação entre os grupos experimentais em nenhum dos tecidos estudados. A quantificação relativa foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos (*primers*) usados para avaliar a expressão de RNAm.

Gene	Proteína	Sequência
Acaca	ACC1	Forward 5'-GCCTTACAGGATGGTTTGGCCTTT-3' Reverse 5'-AACAAATTCTGCTGGCGAAGCCAC-3'
Acat	ACAT1	Forward 5'-GCTGAAGTGAACTACCCCTT-3' Reverse 5'-GAGCCATGCCTCTAGTACCT-3'
Adrb3	ARβ3	Forward 5'-CGTTGCTTGTCTTTCTGTCTT-3' Reverse 5'-AGAACTCACCGCTCAACAG-3'
Atf6	ATF6	Forward 5'-CACTAGCATCAGTAGGA-3' Reverse 5'-GGTGGTAGCTGGTAATA-3'
Atg5	ATG5	Forward 5'-CTGAAGACGGAGAGAAGAAGAG-3' Reverse 5'-TGTGAAGGAAGTTGTCTGGATAG-3'
Atg7	ATG7	Forward 5'-CAGCCCTGCCATACTTCTTAT-3' Reverse 5'-CCGACTGTTAACTTTGTCCTTTG-3'

Becn1	Beclin1	Forward 5'-GCTCAGTACCAGCGAGAATATAG-3' Reverse 5'-CATAGCGCATCTGGTTCTCTAC-3'
Cpt1a	CPT1a	Forward 5'-GAGCCAGACCTTGAAGTACC-3' Reverse 5'-AGCGACTCTTCAATACTTCCC-3'
Ddit3	CHOP	Forward 5'-GAAGCCTGGTATGAGGATCTG-3' Reverse 5'-TGATTCTTCCTCTTCGTTTCCT-3'
Eif2a	eIF2α	Forward 5'-CTCTCTGTTCTCAATCAGGCTATG-3' Reverse 5'-ACTTTGGGCTCCATCTGAAC-3'
Eif2ak3	PERK	Forward 5'-GCGGCAGGTCCTTAGTAATC-3' Reverse 5'-CCAGATCCCACGTCCAAATC-3'
Ern1	IRE1α	Forward 5'-CTCCGAGCCATGAGGAATAAG-3' Reverse 5'-GAAGTAGCGCACGAAGTCA-3'
Fasn	FAS	Forward 5'-GTCACAGTGTCCTCAGAGTTG-3' Reverse 5'-AGGCCAGTGCATTAAGGATG-3'
Fgf21	FGF21	Forward 5'-CAAATCCTGGGTGTCAAAGC-3' Reverse 5'-GCCTCAGACTGGTACACATTG- 3'
Gapdh	GAPDH	Forward 5'-TCTCTGCTCCTCCCTGTT-3' Reverse 5'-GTAACCAGGCGTCCGATA-3'
Hmgcr	HMGCoA redutase	Forward 5'-CCAGGATGCAGCACAGAATGT-3' Reverse 5'-CCAATTCGGGCAAGCTGCCG-3'
Hspa5	BIP	Forward 5'-GTTGTGACTGTACCAGCTTACT-3' Reverse 5'-AGCTGCTGTTGGCTCATT-3'
Il1b	IL1β	Forward 5'-TTGTCGTTGCTTGTCTCTCC-3' Reverse 5'-GTGCTGTCTGACCCATGT-3'
Il6	IL6	Forward 5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3' Reverse 5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'
Lamp2	LAMP2	Forward 5'-AGCACTATTGGGGCATTCAC-3' Reverse 5'-GGTGTGAATGATGGGTGCTA-3'
Ldlr	LDLR	Forward 5'-CCAGTGCGGCGTAGGATT-3' Reverse 5'-GGGACTCATCGGAGCCAT-3'
Lep	Leptina	Forward 5'-CCATCTTGGACAAACTCAGAATG-3' Reverse 5'-GACCATTGTCACCAGGATCA-3'
Lipe	HSL	Forward 5'-AGATCCAGTCCACTAATCCCA-3' Reverse 5'-GCTCCATCCACTTGTCAT-3'
Lpl	LPL	Forward 5'-GCTTGTCATTCTCAGTTCCAGA-3' Reverse 5'-AGCCAAGAGAAGCAGTAAGATG-3'
Map1b	LC3B	Forward 5'-GAGCGATACAAGGGTGAGAAG-3' Reverse 5'-GCAGGCGCCTTCTAATTATCT-3'
Ppara	PPARα	Forward 5'-TTCAATGCCCTCGAACTGGA-3' Reverse 5'-GCACAATCCCCTCCTGCAAC-3'
Pparg	PPARγ	Forward 5'-AGCAGGTTGTCTTGGATGTC-3' Reverse 5'-GAATTAGATGACAGTGACTTGGC-3'
Ppargc1a	PGC1α	Forward 5'-ACTGAGCTACCCTTGGGATG-3' Reverse 5'-TAAGGATTTCGGTGGTGACA-3'
Rplp0	36β4	Forward 5'-TTCCCACTGGCTGAAAAGGT-3' Reverse 5'-CGCAGCCGCAAATGC-3'
Sqstm1	p62	Forward 5'-GGGAACTCGCTATAAG-3' Reverse 5'-GAGAGAAGCTATCAGAG-3'
Srebf1c	SREBP1c	Forward 5'-AAAACCAGCCTCCCCAGAGC-3' Reverse 5'-CCAGTCCCCATCCACGAAGA-3'
Srebf2	SREBP2	Forward 5'-CACTCACGCTCCTCGGTCAC-3' Reverse 5'-CGGATAAGCAGGTCTGTAGGTTGG-3'
Tnf	TNFα	Forward 5'-GTCTTTGAGATCCATGCCATTG-3' Reverse 5'-AGACCCTCACACTCAGATCA-3'
Ucp1	UCP1	Forward 5'-TCAACACTGTGGAAAGGGACGACT-3' Reverse 5'-TCTGCCAGTATGTGGTGGTTCACA-3'

3.6. Histologia

Uma parte do tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco (epididimal e inguinal) armazenado foi descongelado e fixado em formalina 10% (v/v) durante 24 horas. Os tecidos foram desidratados em álcoois de concentração crescente até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, EUA). O material foi seccionado com 5 µm de espessura e então os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas do TAB e TAM foram escaneadas pelo aparelho Pannoramic Midi – 3D Histech. As lâminas do TAM foram fotografadas (com objetiva de 30x) entre 4 a 6 campos por amostra (n=5 animais por grupo) no programa Pannoramic Viewer. A gordura no TAM foi quantificada por pixels pelo programa Image-Pro Plus® e o resultado foi normalizado pela área da imagem (Mandarim-de-Lacerda *et al*., 2010). As lâminas do TAB inguinal e epididimal foram analisadas pelo programa Aperio ImageScope (versão 12.4), em que a altura e a largura de 50 adipócitos por animal (com objetiva de 20x) foi mensurada, e a média usada para determinar o diâmetro expresso em µm. O diâmetro dos adipócitos também foi usado para determinar a classificação dos adipócitos por tamanho de acordo com as seguintes medidas: <35µm - pequeno; >35µm e <71µm - médio; >71µm - grande (Alexandre-Santos *et al*., 2018; Mandarim-de-Lacerda *et al*., 2010).

As análises histológicas do tecido adiposo marrom fizeram parte da dissertação de mestrado da aluna Silvia Karl Boechat e integram os resultados desta tese para fins de contextualização com análises moleculares.

3.7. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e analisada por One-way ANOVA seguida do pós-teste de Holm-Sidak e Tukey ou análise não paramétrica de Krustal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn. Os valores P pós-testes foram descritos na subseção dos resultados. O teste t de Student foi usado para comparar o ganho de massa corporal entre os grupos CT e SL durante o período de lactação. O software GraphPad Prism 6 (versão 6.01, EUA) foi utilizado para esta análise e as diferenças foram consideradas significativas em $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. A superalimentação precoce induziu alterações metabólicas nos ratos jovens.

O modelo de superalimentação precoce induzido pela redução do tamanho da ninhada levou a um maior ganho de massa corporal no grupo SL durante a lactação, a partir do 6º dia (CT 32,84g ± 1,44; SL 40,27g ± 0,88; P<0,001). No desmame (21 dias de idade), o grupo SL continuou apresentando maior massa corporal em relação ao controle (CT 42,31g ± 1,74; SL 50,18g ± 0,91; P<0,001) e esse fenótipo persistiu até a idade adulta (Tabela 2: P=0,017, SL60 *vs* CT60). Aos 60 dias de idade, o grupo SL60 também apresentou maior massa de TAB visceral (P<0,001, SL60 *vs* CT60), maior ingestão alimentar acumulada (P=0,007, SL60 *vs* CT60), resistência à insulina (HOMA-IR: P=0,047, SL60 *vs* CT60), maior eficiência energética (P=0,006, SL60 *vs* CT60), aumento na massa do TAM (P=0,006, SL60 *vs* CT60) e uma tendência para aumentar o colesterol sérico (P=0,064, SL 60 *vs* CT60) (Tabela 2). Apesar das alterações metabólicas observadas no grupo SL60, não houve outras alterações importantes no triacilglicerol sérico e massa hepática (Tabela 2) e conteúdo de AG e triacilglicerol hepático nessa idade (Fig4A e 4B).

Tabela 2. Parâmetros metabólicos e morfométricos dos animais aos 60 dias de idade.

Parâmetros	Grupos			One-way ANOVA
	CT60	SL60	SLC60	
Massa corporal (g)	270,6 ± 5,07	288,6 ± 4,46*	287,4 ± 1,93*	P=0,006
Massa de tecido adiposo visceral (g)	3,45 ± 0,21	5,29 ± 0,29*	4,52 ± 0,23*#	P<0,001
Ingestão alimentar acumulada (kg)[a]	0.320 ± 0,003	0,338 ± 0,04*	0,333 ± 0,002*	P=0,006
Eficiência energética (mg/g)	11,58 ± 0,45	15,62 ± 1,17*	13,97 ± 0,56	P=0,007
Insulina sérica (µIU/mL)	14,06 ± 0,84	19,47 ± 2,18	15,25 ± 1,53	P=0,062
Glicose sérica (mg/dL)	128,9 ± 4,7	136,2 ± 4,34	129,3 ± 5,34	P=0,200
HOMA-IR	4,43 ± 0,24	6,66 ± 0,97*	4,93 ± 0,62	P=0,035
Triacilglicerol sérico (mg/dL)	82,31 ± 7,47	99,63 ± 8,61	71,81 ± 5,09#	P=0,035
Colesterol sérico (mg/dL)	103,7 ± 4,06	117,1 ± 4,46	108,7 ± 3,06	P=0,065
Massa do fígado (g)	12,05 ± 0,29	12,28 ± 0,28	12,18 ± 0,25	P=0,968
Massa do tecido adiposo marrom (g)	0,22 ± 0,008	0,28 ± 0,017*	0,25 ± 0,006	P=0,008

Resultados são expressos como média ± erro padrão da média.
* Diferença estatística *vs* grupo CT60.
# Diferença estatística *vs* grupo SL60.
[a] Durante o tratamento.

4.2. O tratamento com cinamaldeído induziu resultados benéficos no curto prazo.

Aos 60 dias de idade (após o término do tratamento com cinamaldeído), os animais SLC60 apresentaram menor massa de tecido adiposo visceral (P=0,010, SLC60 *vs* CT60; P=0,040, SLC60 *vs* SL60), sem apresentar alteração na ingestão alimentar e massa corporal quando comparado ao grupo SL60. Os animais SLC60 também apresentaram atenuação da eficiência energética e da massa do TAM (Tabela 2). Além disso, o tratamento com cinamaldeído foi capaz de atenuar a resistência à insulina, conforme indicado pelos valores HOMA-IR e reduzir o triacilglicerol sérico em comparação com o grupo SL60 (P=0,032) (Tabela 2).

4.3. O tratamento com cinamaldeído reduziu a obesidade hipertrófica e modulou marcadores de função do TAB no compartimento inguinal e epididimal no curto prazo.

Avaliamos a morfologia do tecido adiposo branco epididimal (representando o compartimento visceral), através de cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina (Fig1A), e vimos que os animais SL60 apresentaram adipócitos com diâmetro maior (P<0,0001, SL60 *vs* CT60) (Fig1B). Corroborando com a redução na massa de tecido adiposo visceral, o grupo tratado com cinamaldeído apresentou redução no diâmetro dos adipócitos (P<0.0001, SLC60 *vs* SL60) (Fig1B).

Avaliamos diversos genes relacionados ao metabolismo do TAB epididimal e inflamação por qPCR e não vimos alteração na expressão do *Tnfa* (TNFα), *Il1b* (IL1β) e *Il6* (IL6) (Fig1C), *Lep* (Leptina), *Pparg* (PPARγ), *Srebp1c* (SREBP1c), *Fasn* (FAS), *Lpl* (LPL) e *Dgat2* (DGAT2) (Fig1D). A única alteração estatística encontrada foi a redução da *Acaca* (ACC) no grupo SLC60 *vs* SL60 (P=0,0378) (Fig1D).

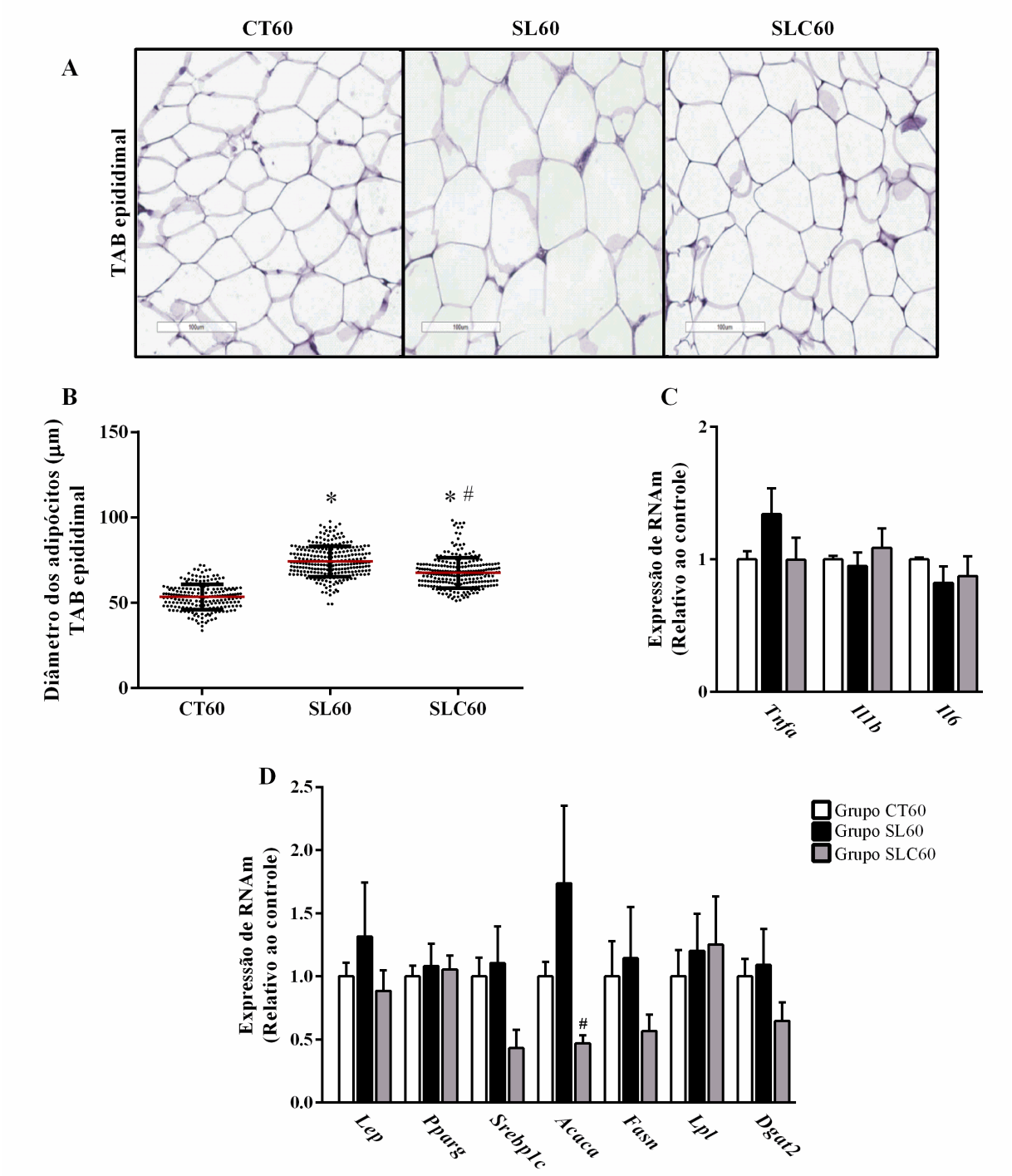


Figura 1. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco epididimal aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 20X; Barra de escala em 100µm. **B**: Diâmetro dos adipócitos (µm). **C**: Expressão de RNAm de citocinas inflamatórias (*Tnfa, Il1b, Il6*). **D**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo (*Lep, Pparg, Srebp1c, Acaca, Fasn, Lpl, Dgat2*). **E**:. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT60; # Diferença estatística *vs* grupo SL60.

Ao avaliarmos o compartimento inguinal, observamos o mesmo perfil morfológico (Fig2A): hipertrofia dos adipócitos (P<0,0001, SL60 *vs* CT60) no grupo SL60, e redução no grupo SLC60 comparado ao SL60 (P<0,0001) (Fig2B). Nesse tecido não vimos alteração na expressão de RNAm da *Lep*, *Fasn*, *Lpl*, *Dgat2*. No entanto, o grupo SLC60 apresentou redução significativa do *Srebp1c* (P=0,0037, SLC60 *vs* CT60; P=0,0114, SLC60 *vs* SL60) e uma tendência a redução na expressão da *Acaca* (P= 0,0759, SLC60 *vs* CT60) (Fig2C). Além disso, o grupo SLC apresentou aumento na expressão do *Pparg* (P= 0,0498, SLC60 vs SL60; P= 0,0780, SLC60 *vs* CT60), *Ppargc1a* (PGC1α) (P= 0,0523, SLC60 *vs* SL60; P= 0,0142, SLC60 *vs* CT60) e *Fgf21* (FGF21) (P= 0,0327, SLC60 *vs* SL60) (Fig2C).

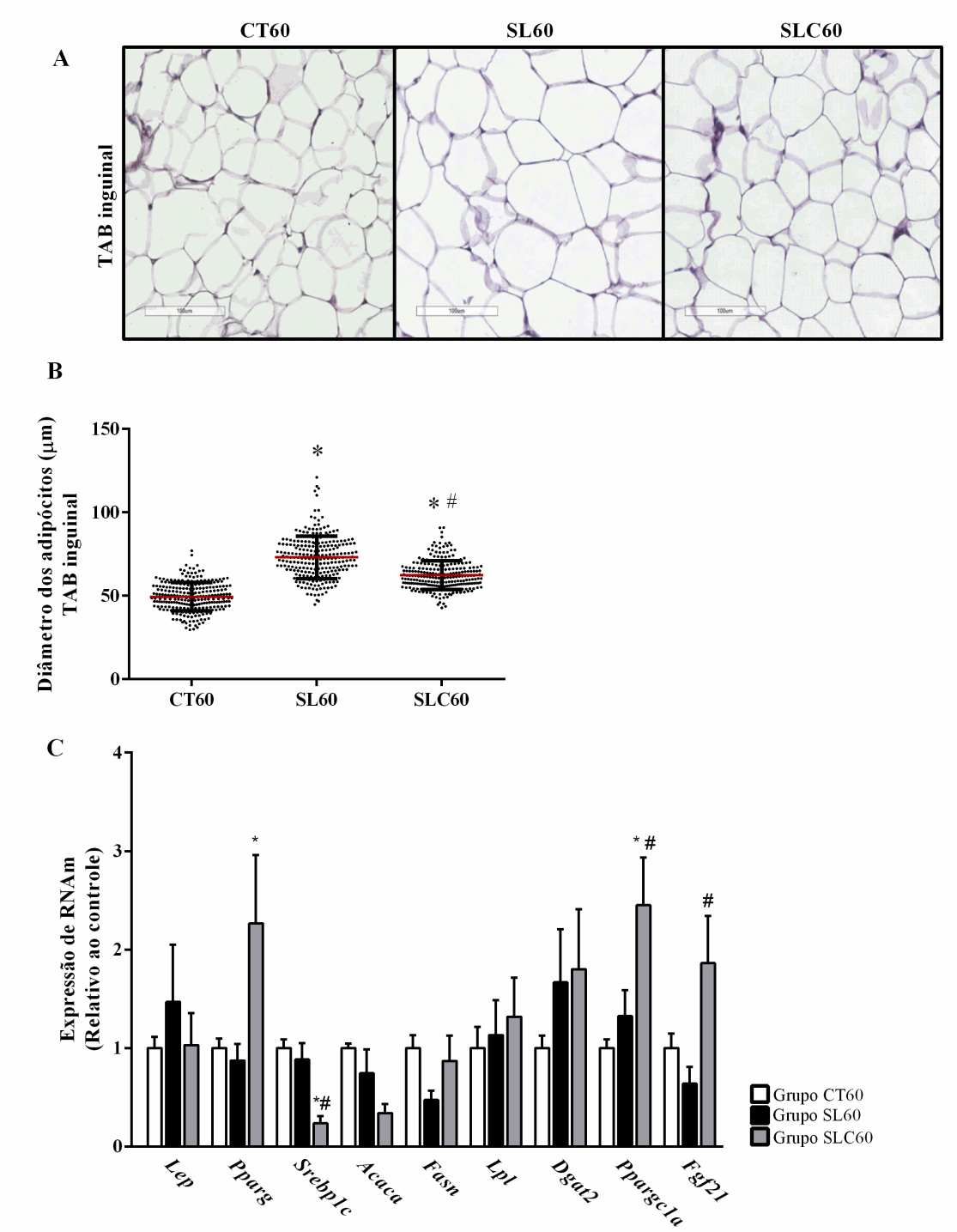


Figura 2. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco inguinal aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 20X; Barra de escala em 100µm. **B**: Diâmetro dos adipócitos (µm). **C**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo (*Lep, Pparg, Srebp1c, Acaca, Fasn, Lpl, Dgat2, Ppargc1a, Fgf21*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT60; # Diferença estatística *vs* grupo SL60.

4.4. O tratamento com cinamaldeído estimulou marcadores de função e regulação do tecido adiposo marrom no curto prazo

A avaliação histológica do TAM (Fig3A) não mostrou diferença estatística no acúmulo de lipídeos entre os grupos aos 60 dias de idade (Fig3B). Na expressão de RNAm do *Ppargc1a*, *Pparg* e do *Adrb3* (ARβ3 - receptor adrenérgico beta 3), não encontramos alteração entre os grupos. No entanto, o tratamento com cinamaldeído estimulou a transcrição do *Ppara* (PPARα) (P<0,0418, SLC60 *vs* CT60), da *Ucp1* (UCP1) (P=0,0193, SLC60 *vs* CT60) e do *Fgf21* (P=0,0092, SLC60 *vs* SL60) (Fig3C).

A expressão de RNAm dos genes da autofagia *Becn1* (Beclin1), *Atg5* (ATG5), *Map1b* (LC3) não variou nem no grupo SL60, nem no grupo SLC60. No entanto, o tratamento estimulou a expressão do *Lamp2* (LAMP2) nos animais SLC60 (P=0,0493, SLC60 *vs* CT60) (Fig3D).

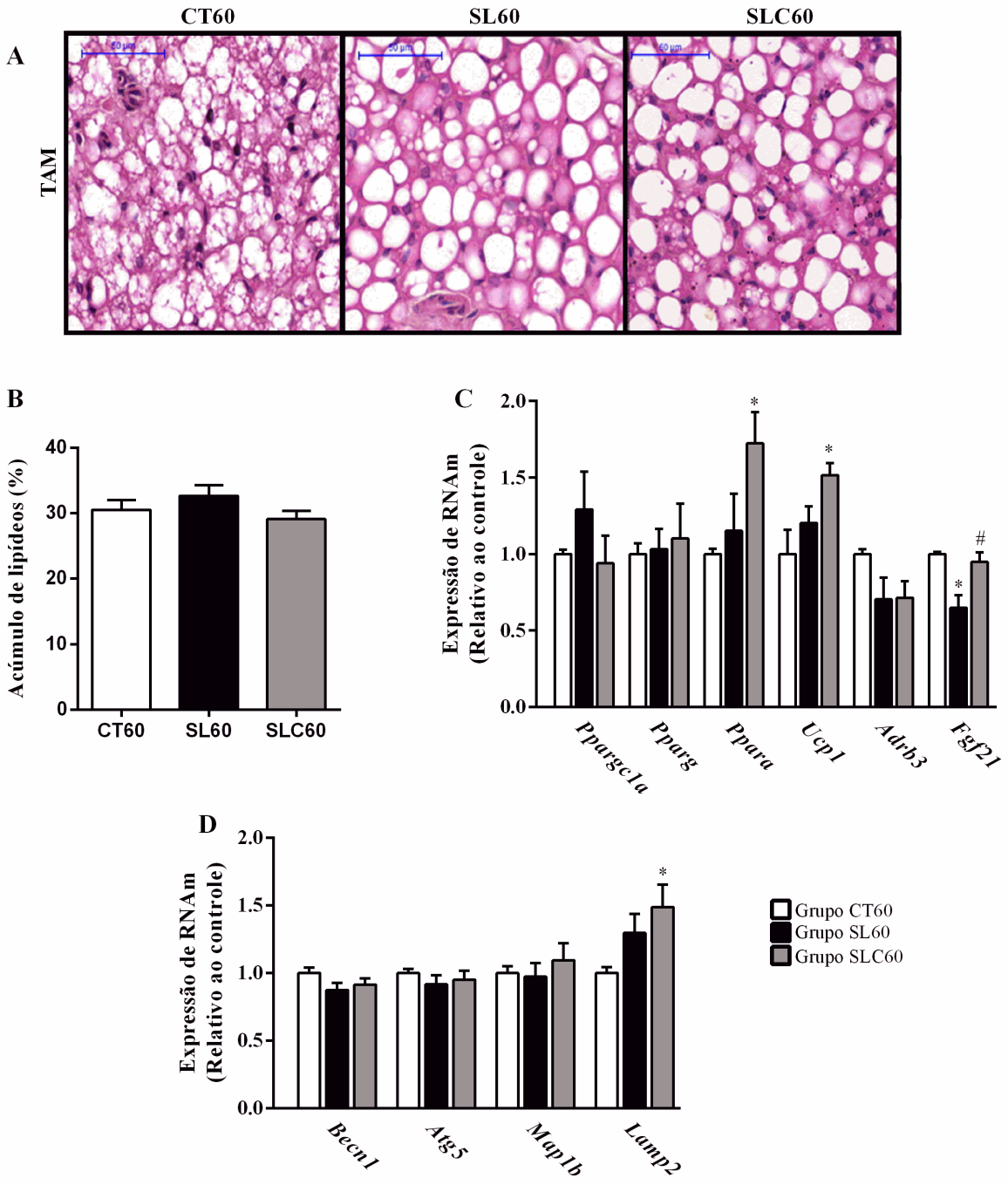


Figura 3. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo marrom aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 30X; Barra de escala em 50µm. **B**: Quantificação da porcentagem de lipídeos. **C**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo (*Ppargc1a, Pparg, Ppara, Ucp1, Adrb3, Fgf21*). **D**: Expressão de RNAm de marcadores da autofagia (*Becn1*, *Atg5*, *Map1b*, *Lamp2*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT60. # Diferença estatística *vs* grupo SL60.

4.5. O tratamento com cinamaldeído melhorou o metabolismo lipídico hepático, estimulou a autofagia e reduziu o estresse de RE no curto prazo

O perfil lipídico hepático avaliado pelo TLC não mostrou alteração nos níveis de ácidos graxos livres ou triacilgliceróis (Fig4A e 4B). Quando os marcadores de síntese de triacilgliceróis foram analisados, o grupo SL60 não apresentou alterações na expressão de RNAm do *Srebf1c*, *Acaca*, *Fasn* e *Lpl* (Fig4C). Já os animais SLC60 apresentaram menor expressão do *Srebf1c* (P=0,003, SLC60 *vs* SL60; P=0,037, SLC60 *vs* CT60) e *Acaca* (P=0,003, SLC60 *vs* SL60) (Fig4C).

Foi observada uma redução na expressão da *Lipe* (HSL) nos grupos SL60 (P=0,001) e SLC60 (P=0,001) em comparação com o controle (Fig4D). Além disso, não houve alteração na expressão gênica de marcadores de oxidação lipídica, como *Ppara* e *Cpt1a* (CPT1a) (Fig4D).

Não houve alterações significativas no colesterol livre e no colesterol esterificado no fígado dos grupos SL60 ou SLC60, comparados ao grupo controle (Fig5A e 5B). Além disso, não houve alteração na expressão de RNAm de *Srebf2* (SREBP2), *Hmgcr* (HMG-CoA redutase), *Acat* (ACAT) e *Ldlr* (LDLR) (Fig5C).

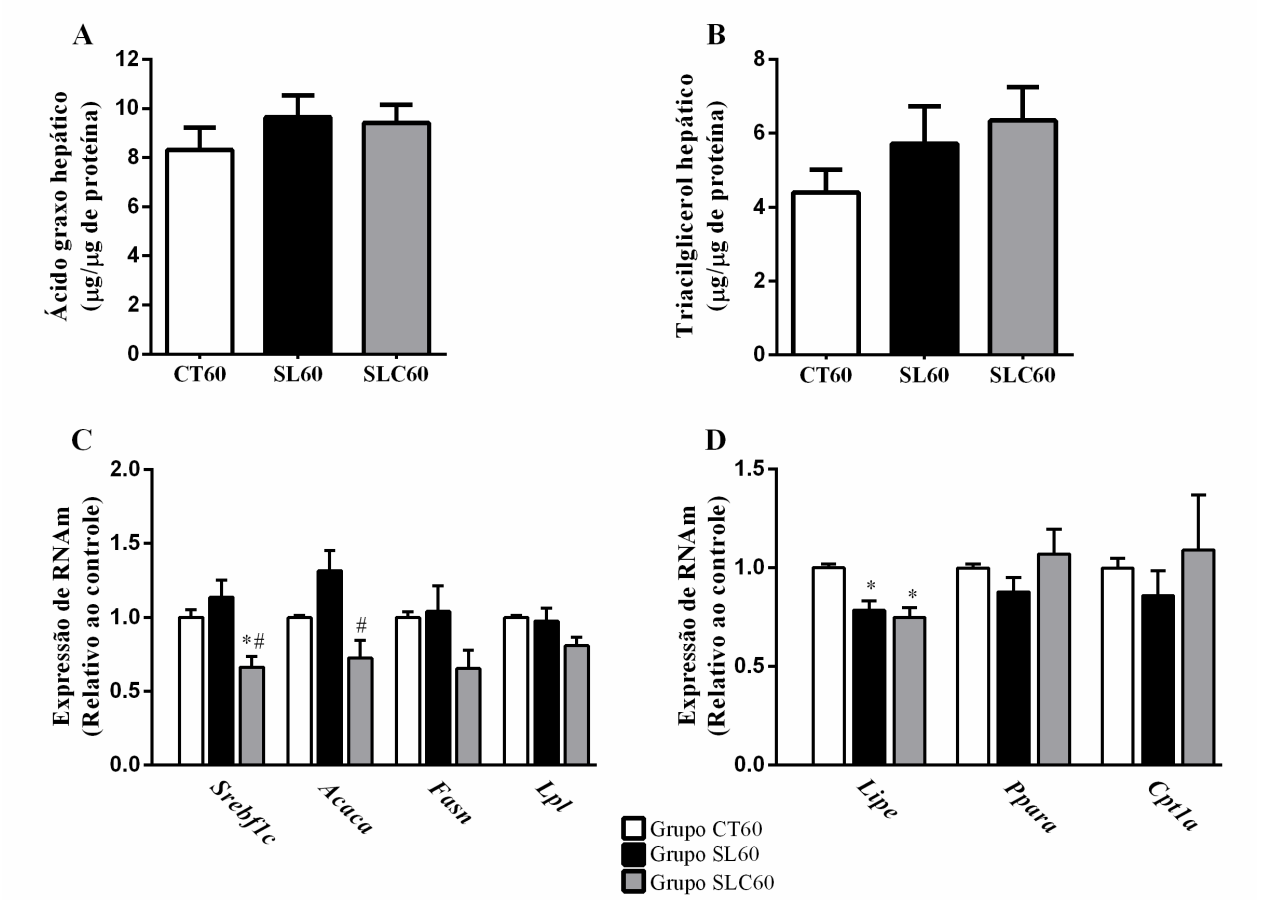


Figura 4. Metabolismo de triacilglicerol hepático aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta) e grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Conteúdo de ácidos graxos livres. **B**: Conteúdo de triacilglicerol. **C**: Expressão de RNAm de genes envolvidos na síntese lipídica (*Srebf1c*, *Acaca*, *Fasn*, *Lpl*). **D**: Expressão de RNAm de genes envolvidos na quebra e oxidação lipídica (*Lipe*, *Ppara*, *Cpt1a*). Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo controle, que foi ajustado para 1. N= 7-9. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. *Diferença estatística *vs* grupo CT60. #Diferença estatística *vs* grupo SL60.

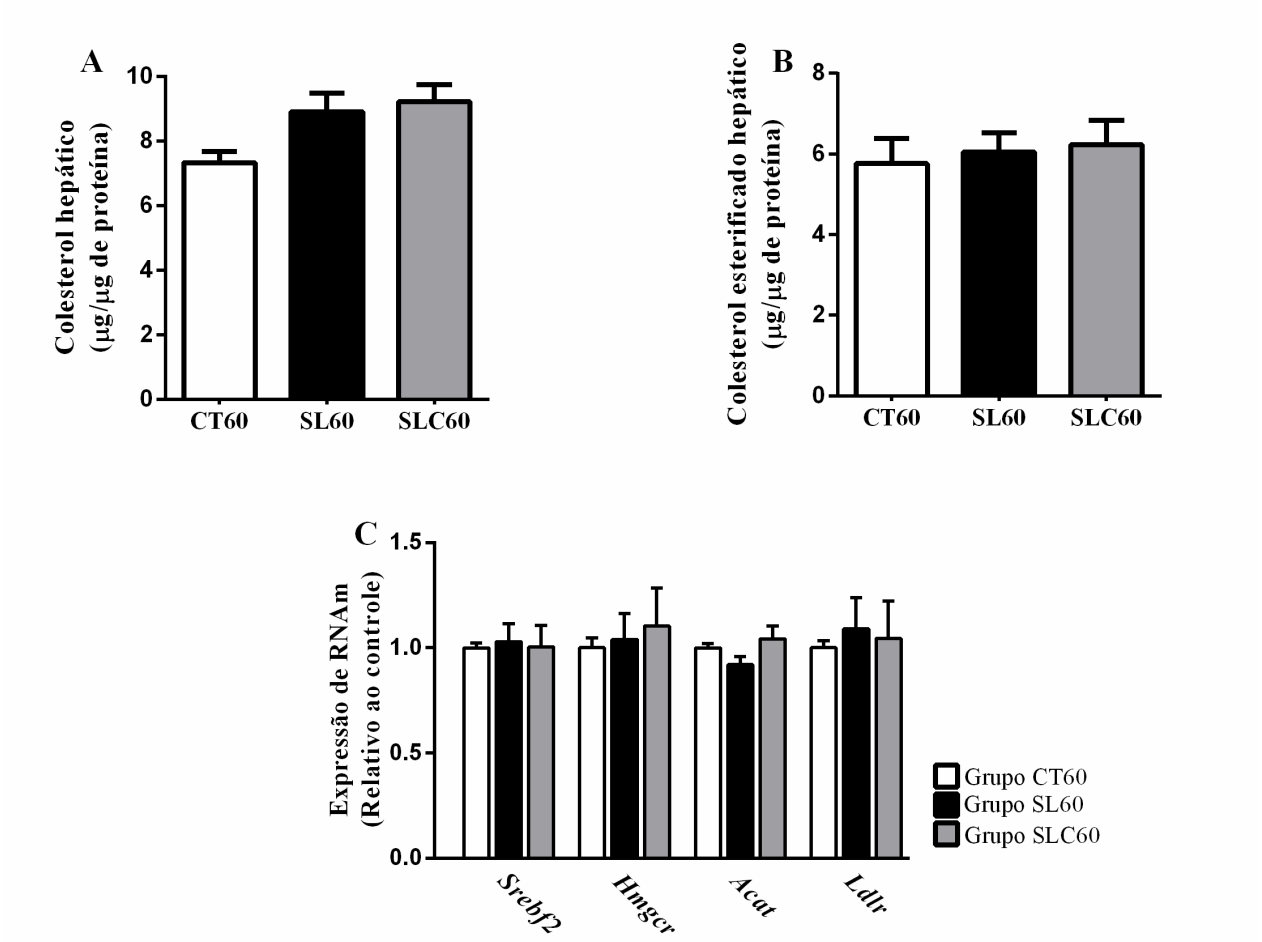


Figura 5. Metabolismo de colesterol hepático aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta) e grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Conteúdo de colesterol livre. **B**: Conteúdo de ésteres de colesterol. **C**: Expressão de RNAm dos genes envolvidos no metabolismo do colesterol (*Srebf2*, *Hmgcr*, *Acat*, *Ldlr*). Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo controle, que foi ajustado para 1. N= 7-9. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

Avaliando a via autofágica no fígado, o grupo SL60 não apresentou alterações na expressão de RNAm da *Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1b* e *Lamp2* (Fig6A), nem alteração na expressão proteica de Beclin1, ATG12 e AMPK fosforilado (Fig6B). No entanto, a superalimentação precoce induziu a uma maior expressão de RNAm de *Sqstm1* (p62) (P=0,050, SL60 *vs* CT60) (Fig6A), enquanto reduziu a razão da proteína LC3II/I (P=0,012, SL60 *vs* CT60) (Fig6B).

De forma interessante, o tratamento com cinamaldeído estimulou expressão proteica da razão LC3II/I (P=0,019, SLC60 *vs* SL60) (Fig6B), enquanto reduziu a expressão de RNAm do *Sqstm1* (P=0,010, SLC60 *vs* SL60) (Fig6A). Além disso, a

expressão da proteína ATG12 apresentou um perfil semelhante de expressão de LC3II/I, apresentando um aumento não significativo no grupo SLC60 comparado ao grupo SL60 (P=0,064, SLC60 *vs* SL60). Além disso, o grupo SLC60 apresentou maior expressão do AMPK fosforilado (P=0,053, SLC60 *vs* CT60; P=0,053, SLC60 *vs* SL60) (Fig6B).

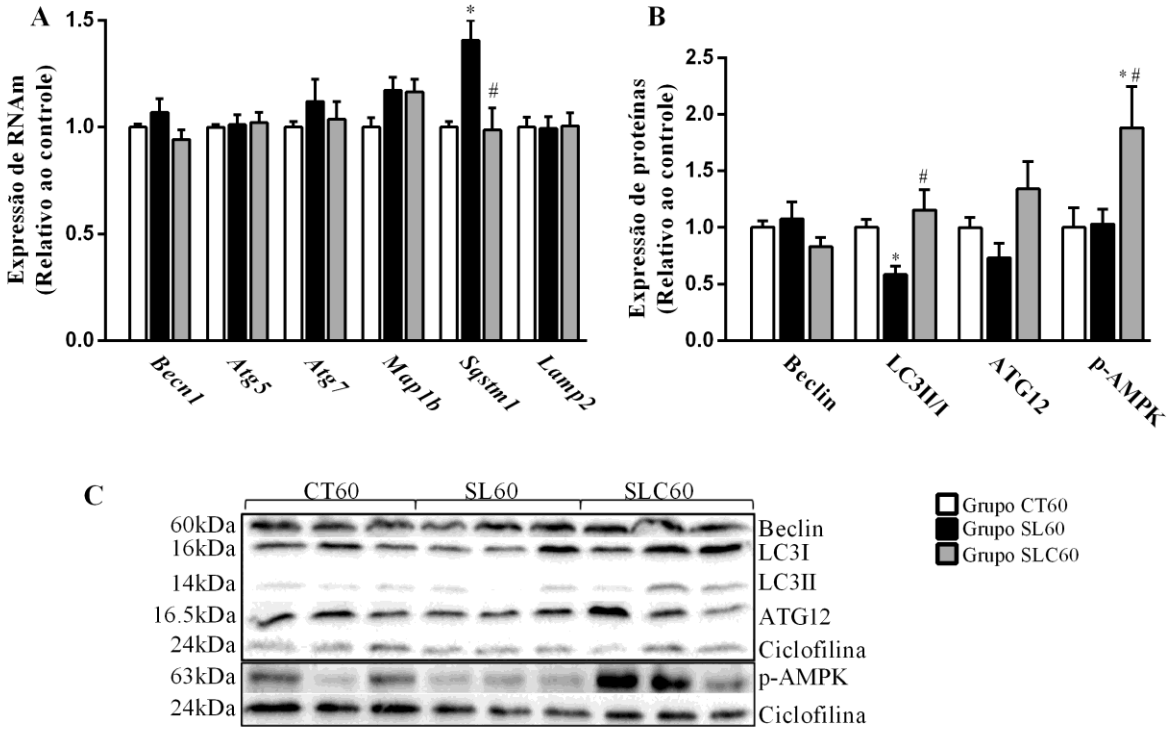


Figura 6. Marcadores da via autofágica no fígado aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta) grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Expressão de RNAm (*Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Maplb*, *Sqstm1*, *Lamp2*). **B**: Expressão proteica (Beclin, LC3II/I, ATG12, p-AMPK). **C**: Bandas representativas obtidas por *Western blot*. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 7-9.Valores expressos como média ± erro padrão da média * Diferença estatística *vs* grupo CT60. # Diferença estatística *vs* grupo SL60.

Avaliando marcares de estresse de retículo, nenhuma alteração na expressão de RNAm de, *Atf6* (ATF6), *Eif2ak3* (PERK), *Eif2a* (eIF2α), *Hspa5* (BIP) e *Ddit3* (CHOP) foram observados entre os grupos (Fig7A). O grupo SL60 apresentou uma tendência de aumento da IRE1α (P=0,080, SL60 *vs* CT60). O tratamento com cinamaldeído levou a uma tendência de redução da *Ern1* (IRE1α)(P=0,085, SLC60 *vs* SL60) e a uma menor expressão da proteína IRE1α (P=0,041, SLC60 *vs* SL60) e eIF2α fosforilado (P=0,009, SLC60 *vs* CT60; P=0,016, SLC60 *vs* SL60) (Fig7B). Não foram encontradas alterações

na expressão proteica da PERK fosforilada e XBP1s em nenhum dos grupos nesta idade (Fig7B).

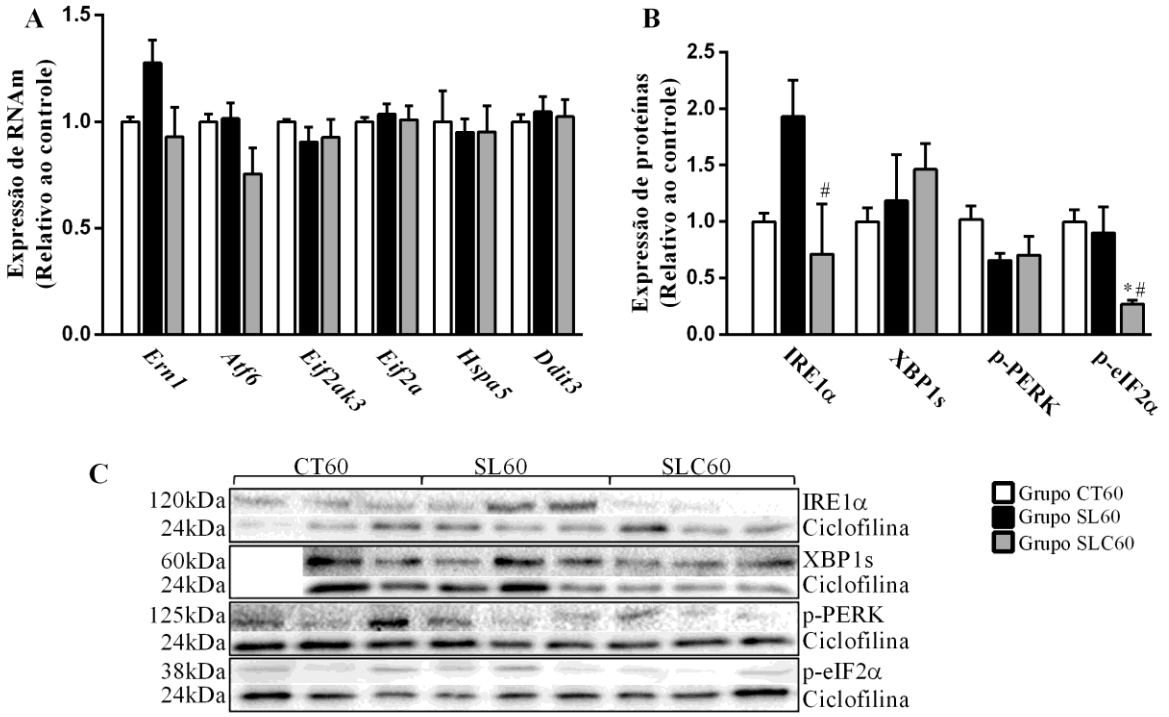


Figura 7. Marcadores do estresse de RE no fígado aos 60 dias de idade. Grupo controle (CT60, barra branca), grupo superalimentado (SL60, barra preta) grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC60, barra cinza). **A**: Expressão de RNAm (*Ern1*, *Atf6*, *Eif2ak3*, *Eif2α*, *Hspa5, Ddit3*). **B**: Expressão proteica (IRE1α, XBP1s, p-PERK, p-eIF2α). **C**: Bandas representativas obtidas por *Western blot*. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 7-9.Valores expressos como média ± erro padrão da média * Diferença estatística *vs* grupo CT60. # Diferença estatística *vs* grupo SL60.

Os resultados referentes ao metabolismo lipídico, autofagia e estresse de retículo no fígado aos 60 dias, estão descritos no artigo recentemente publicado pela *Journal of Nutritional Biochemistry* (J Nutr Biochem. 2020. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108321).

4.6. O tratamento com cinamaldeído durante a adolescência resultou em benefícios metabólicos no longo prazo

Aos 180 dias de idade, como esperado, o grupo SL180 manteve maior massa corporal (P=0,033, SL180 *vs* CT180), apresentando maior obesidade visceral (P<0,001, SL180 *vs* CT180), maior ingestão alimentar (P<0,001, SL180 *vs* CT180) associada a maior eficiência energética (P=0,005, SL180 *vs* CT180), e um aumento não significativo do HOMA-IR (P=0,065, SL180 *vs* CT180) e da insulina sérica (P=0,065, SLC180 *vs*

CT180). Além disso, os animais apresentaram aumento da massa do TAM (P<0,001, SL180 *vs* CT180), da massa do fígado (P=0,001, SL180 *vs* CT180), e do triacilglicerol sérico (P=0,004, SL180 *vs* CT180)(Tabela 3).

Surpreendentemente, o tratamento com cinamaldeído (apenas na fase adolescente) foi capaz de normalizar a adiposidade visceral (P=0,007, SLC180 *vs* SL180), a eficiência energética (P=0,033, SLC180 *vs* SL180), e normalizar a massa do TAM (P=0,043, SLC180 *vs* CT180; P=0,043, SLC180 *vs* SL180), enquanto reduziu a hiperfagia (P<0,001, SLC180 *vs* SL180) no longo prazo (Tabela 3). O cinamaldeído também foi capaz de atenuar o aumento de triacilglicerol sérico, no entanto, não foi capaz de prevenir a maior massa hepática induzida pela superalimentação precoce (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros metabólicos e morfométricos dos animais aos 180 dias de idade.

Parâmetros	Grupos			One-way ANOVA
	CT180	SL180	SLC180	
Massa corporal (g)	467,9 ±10,78	507 ±11,18*	487,4 ± 7,36	P=0,003
Massa de tecido adiposo visceral (g)	12,08 ± 1,07	18,92 ± 1,39*	13,75 ± 0,65#	P<0,001
Ingestão alimentar acumulada (kg)[a]	0,697 ± 0,003	0,796 ± 0,012*	0,745 ± 0,007*#	P<0,001
Eficiência energética (mg/g)	17,1 ± 1,3	23,73 ± 1,6*	18,46 ± 0,8#	P=0,005
Insulina sérica (µIU/mL)	9,29 ± 0,44	11,91 ± 0,79	11,21 ± 1,00	P=0,056
Glicose sérica (mg/dL)	121,4 ± 3,16	110,9 ± 4,76	112,2 ± 7,61	P=0,250
HOMA-IR	2,79 ± 0,15	3,23 ± 0,19	3,15 ± 0,43	P=0,460
Triacilglicerol sérico (mg/dL)	54,85 ± 5,37	100,4 ± 15,20*	84,66 ± 7,36	P=0,004
Colesterol sérico (mg/dL)	107,4 ± 2,39	112,5 ± 3,07	104,5 ± 1,07	P=0,116
Massa do fígado (g)	14,40 ± 0,43	16,81 ± 0,45*	15,75 ± 0,32*	P=0,001
Massa do tecido adiposo marrom (g)	0,28 ± 0,01	0,42 ± 0,02*	0,36 ± 0,01#	P<0,001

Resultados são expressos como média ± erro padrão da média.
* Diferença estatística *vs* grupo CT60.
# Diferença estatística *vs* grupo SL60.
[a] Do dia 30 ao dia 180 de idade (durante e após o tratamento).

4.7. O tratamento com cinamaldeído reduziu a obesidade hipertrófica e modulou marcadores de função do TAB no compartimento inguinal e epididimal no longo prazo.

Aos 180 dias de idade, a avaliação histológica do TAB epididimal (Fig8A) mostrou hipertrofia dos adipócitos no grupo SL180 (P<0,0001, SL180 *vs* CT180) (Fig8B). O tratamento com cinamaldeído durante a adolescência promoveu redução do diâmetro dos adipócitos comparado ao grupo SL180 (P<0,0001) e ao grupo CT180 (P<0,0001) (Fig8B).

Na avaliação da expressão gênica, não encontramos alteração na expressão de citocinas inflamatórias *Tnfa*, *Il1b* e *Il6* (Fig8C). No entanto, observamos aumento da *Lep* (P=0,0026), *Lpl* (P=0,049) e *Dgat2* (P=0,035) no grupo SL180 comparado ao CT180 (Fig8D). De forma interessante, o grupo SLC180 apresentou atenuação na expressão da *Lep*, *Lpl* e *Dgat2* e redução na expressão do *Pparg* (P=0,034, SLC180 *vs* SL180) (Fig8D).

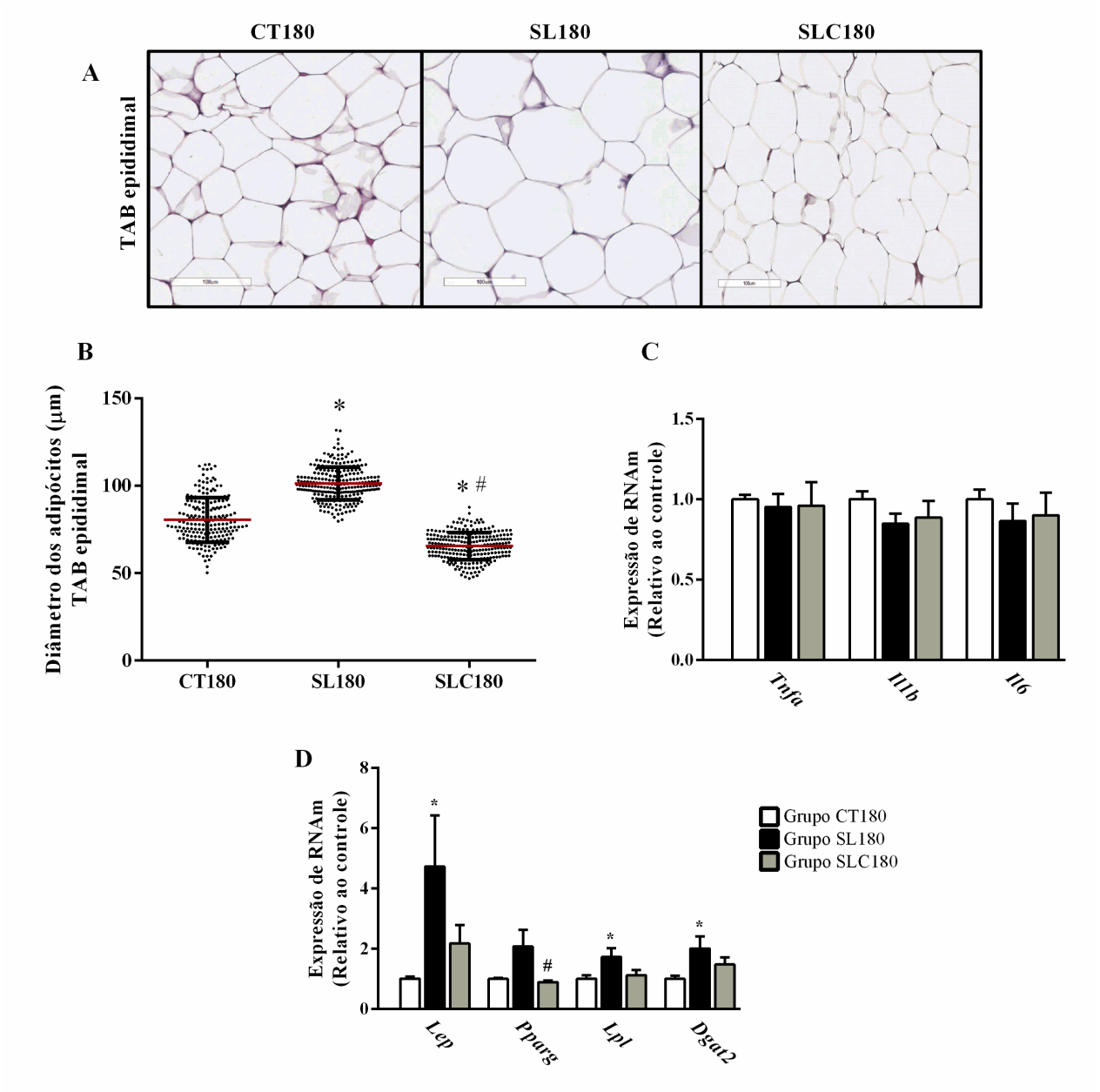


Figura 8. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco epididimal aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, barra branca), grupo superalimentado (SL180, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 20X; Barra de escala em 100µm. **B**: Diâmetro dos adipócitos (µm). **C**: Expressão de RNAm de citocinas inflamatórias (*Tnfa, Il1b, Il6*). **D**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo (*Lep, Pparg, Lpl, Dgat2*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT180; # Diferença estatística *vs* grupo SL180.

A avaliação histológica do compartimento inguinal (Fig9A) também mostrou aumento do diâmetro dos adipócitos no grupo SL180 (P<0,0001, SL180 *vs* CT180), e o grupo SLC180 apresentou redução desse parâmetro em comparação ao grupo CT180 (P<0,0001) e SL180 (P<0,0001) (Fig9B).

Na avaliação da expressão de RNAm, o grupo tratado com cinamaldeído na adolescência apresentou redução do *Pparg* (P=0,022, SLC180 *vs* CT180) e da *Dgat2* (P=0,008, SLC180 vs CT180; P=0,052, SLC180 *vs* SL180), enquanto aumentou a expressão *Ppargc1a* (P=0,028, SLC180 vs CT180; P=0,056, SLC180 *vs* SL180). Não vimos alteração na expressão da *Lep, Lpl*, e *Fgf21* (Fig9C).

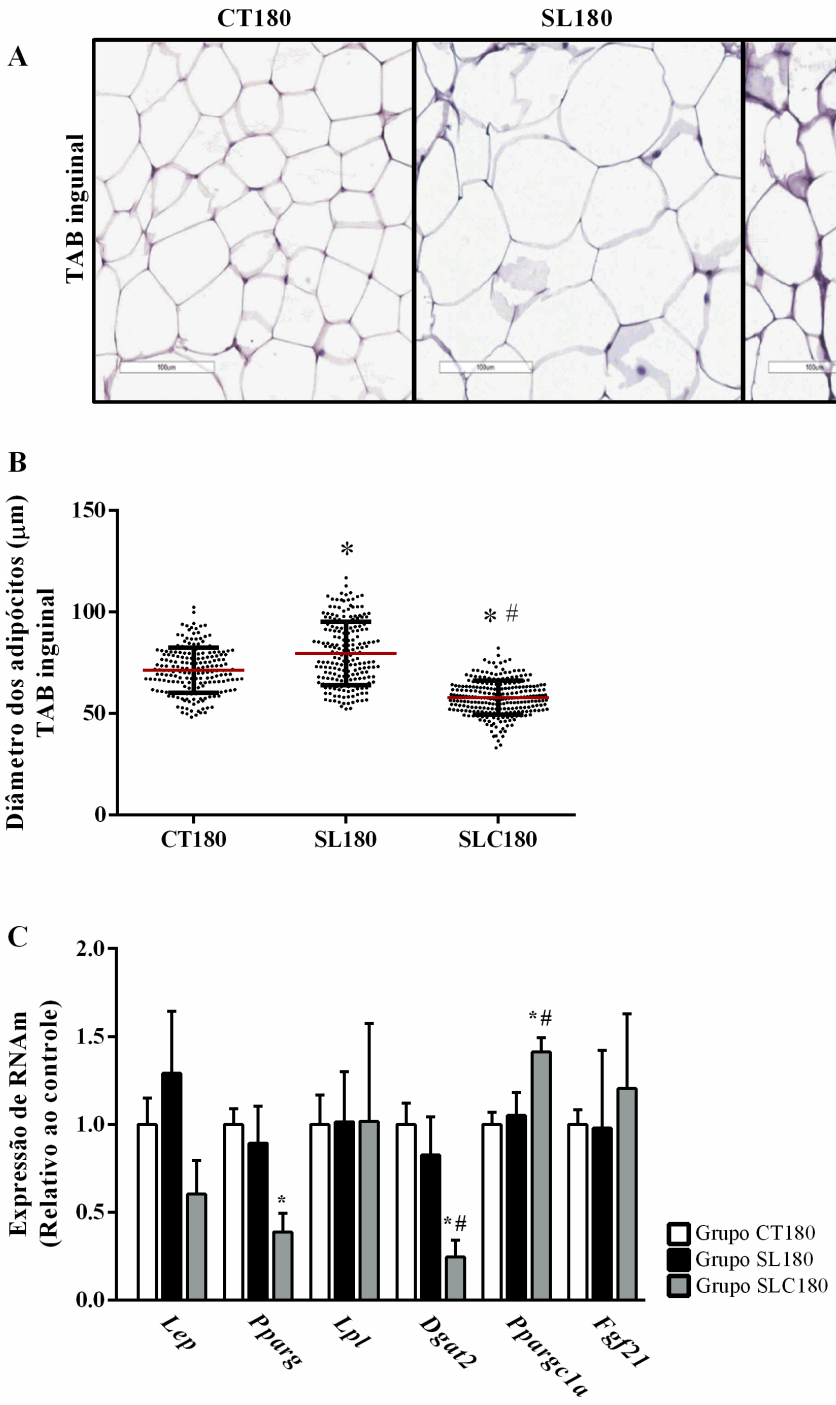


Figura 9. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo branco inguinal aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, barra branca), grupo superalimentado (SL180, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 20X; Barra de escala em 100µm. **B**: Diâmetro dos adipócitos (µm). **C**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo (*Lep, Pparg, Lpl, Dgat2, Ppargc1a, Fgf21*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT180; # Diferença estatística *vs* grupo SL180.

4.8. O tratamento com cinamaldeído reduz o *whitening* do tecido adiposo marrom no longo prazo.

Aos 180 dias de idade, a avaliação histológica do TAM mostrou acúmulo de lipídeos no grupo SL180 (P=0,007, SL180 *vs* CT180) (Fig10B), com morfologia similar a dos adipócitos brancos (Fig10A). O grupo tratado com cinamaldeído apresentou redução do acúmulo de lipídeos em comparação ao grupo SL180 e em comparação ao grupo CT180 (P=0,002, SLC180 *vs* CT180; P<0,001, SLC180 *vs* SL180) (Fig10B), com redução do tamanho e número de gotículas de gordura (Fig10A).

Ao avaliarmos a expressão de RNAm, não vimos alteração no *Ppargc1a*, *Ppara* e *Ucp1*(Fig10C). No entanto, o grupo tratado com cinamaldeído apresentou redução na expressão do *Pparg* (P=0,039) e do *Adrb3* (P=0,050) comparado ao grupo SL180, e aumento na expressão de Fgf21 (P<0,0001, SLC180 *vs* CT180; P=0,0013, SLC180 *vs* SL180) (Fig10C). A expressão dos genes relacionados ao processo autofágico *Becn1*, *Atg5*, *Map1b* e *Lamp2* não apresentou alteração em nenhum dos grupos (Fig10D).

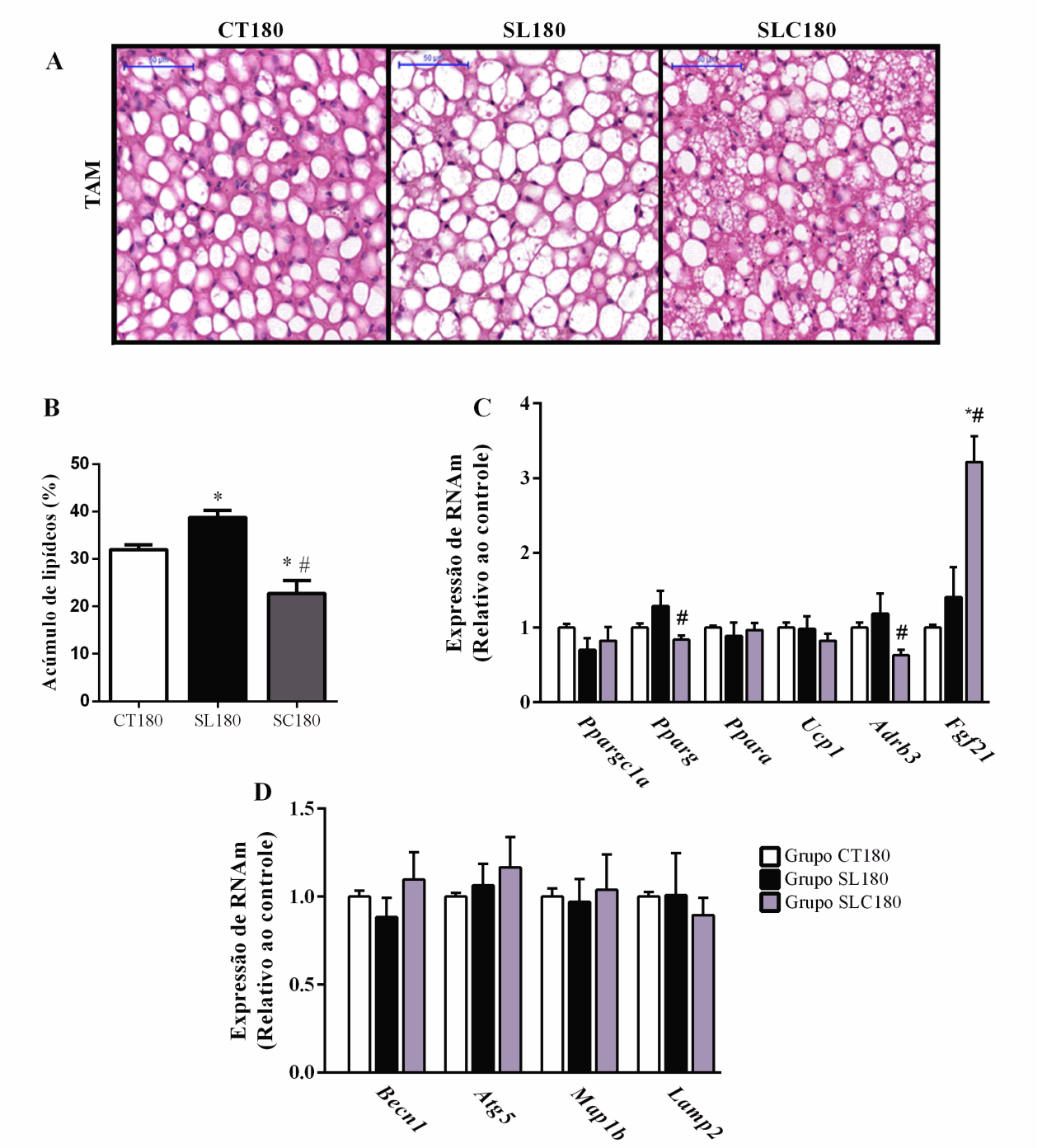


Figura 10. Avaliação histológica e da expressão de RNAm no tecido adiposo marrom aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, barra branca), grupo superalimentado (SL180, barra preta), grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Imagem representativa dos cortes histológicos. Objetiva de 30X; Barra de escala em 50µm. **B**: Quantificação da porcentagem de lipídeos. **C**: Expressão de RNAm de marcadores do metabolismo e regulação (*Ppargc1a, Pparg, Ppara, Ucp1, Adrb3, Fgf21*). **D**: Expressão de RNAm de marcadores da autofagia (*Becn1*, *Atg5*, *Map1b*, *Lamp2*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 5-8. * Diferença estatística *vs* grupo CT180. # Diferença estatística *vs* grupo SL180.

4.9. O tratamento com cinamaldeído induziu alterações benéficas no metabolismo lipídico hepático, enquanto os efeitos sobre a autofagia e estresse de RE são perdidos no longo prazo

O grupo SL180 apresentou maior conteúdo de triacilglicerol hepático (P=0,057, SL180 *vs* CT180) (Fig11B), sem alterações no conteúdo de ácidos graxos livres (Fig11A). O tratamento com cinamaldeído foi capaz de atenuar o teor de triacilglicerol hepático (Fig11B). Investigando os mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo lipídico, observamos que a expressão de RNAm do *Srebf1c* (P=0,055, SL180 *vs* CT180) e *Acaca* (P=0,012, SL180 *vs* CT180) foi maior no grupo SL180 (Fig11C), e o tratamento foi capaz de atenuar a expressão de ambos os genes (Fig11C). Não foram observadas alterações na expressão do RNAm de *Fasn*, *Lpl* (Fig8C), *Lipe*, *Ppara* e *Cpt1a* (Fig10D) entre os grupos aos 180 dias de idade.

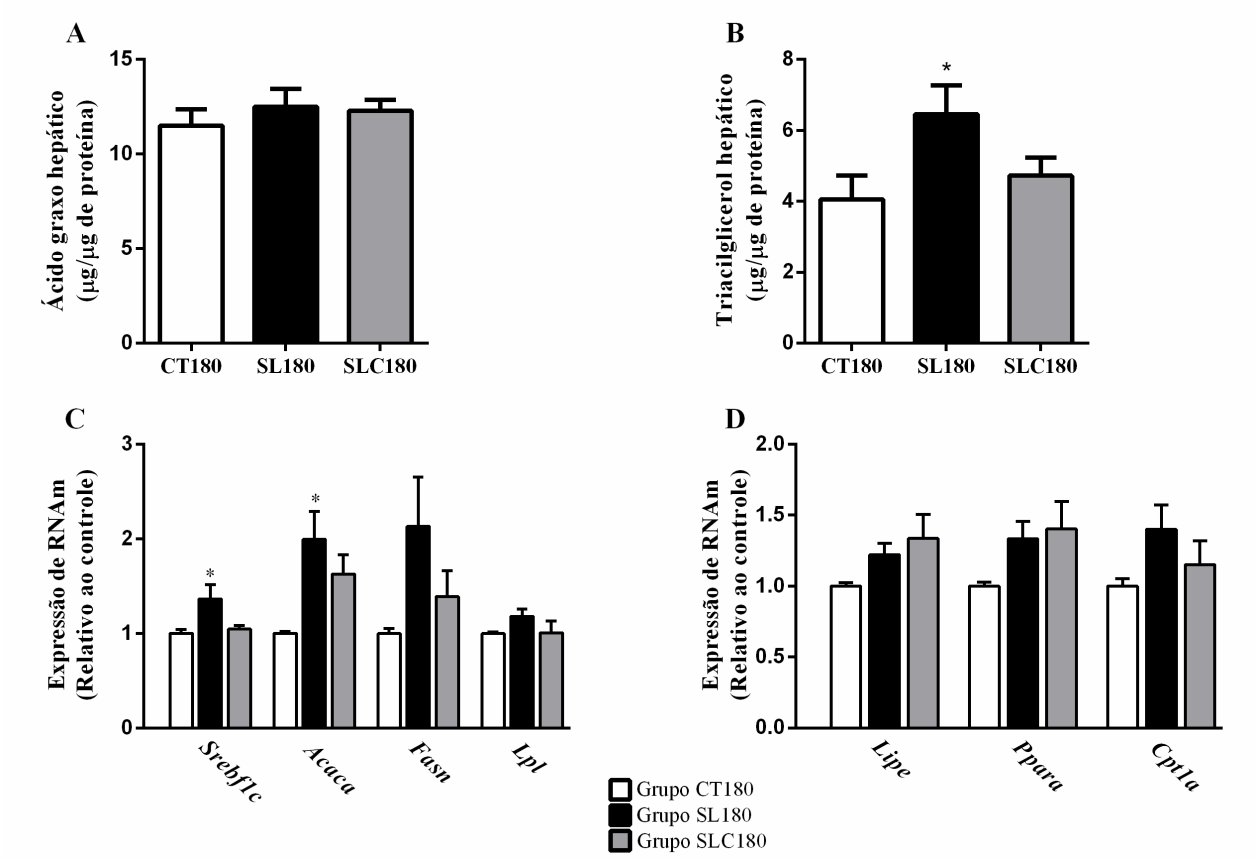


Figura 11. Metabolismo do triacilglicerol hepático aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, barra branca), grupo superalimentado (SL180, barra preta) e grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Conteúdo de ácidos graxos livres. **B**: Conteúdo de triacilglicerol. **C**: Expressão de RNAm de genes envolvidos na síntese lipídica (*Srebf1c*, *Acaca*, *Fasn*, *Lpl*). **D**: Expressão de RNAm de genes envolvidos na quebra e oxidação lipídica (*Lipe*, *Ppara*, *Cpt1a*). Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo controle, que foi ajustado para 1. N= 7-9. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. * Diferença estatística *vs* grupo CT180.

Da mesma forma do que foi descrito aos 60 dias de idade, não foram observadas alterações nos marcadores de síntese de colesterol (*Srebf2*, *Hmgcr*, *Ldlr*, *Acat*) entre os grupos (Fig12C), nem alterações no colesterol total e colesterol esterificado no fígado (Fig12A e 12B), ou no colesterol sérico (Tabela 3).

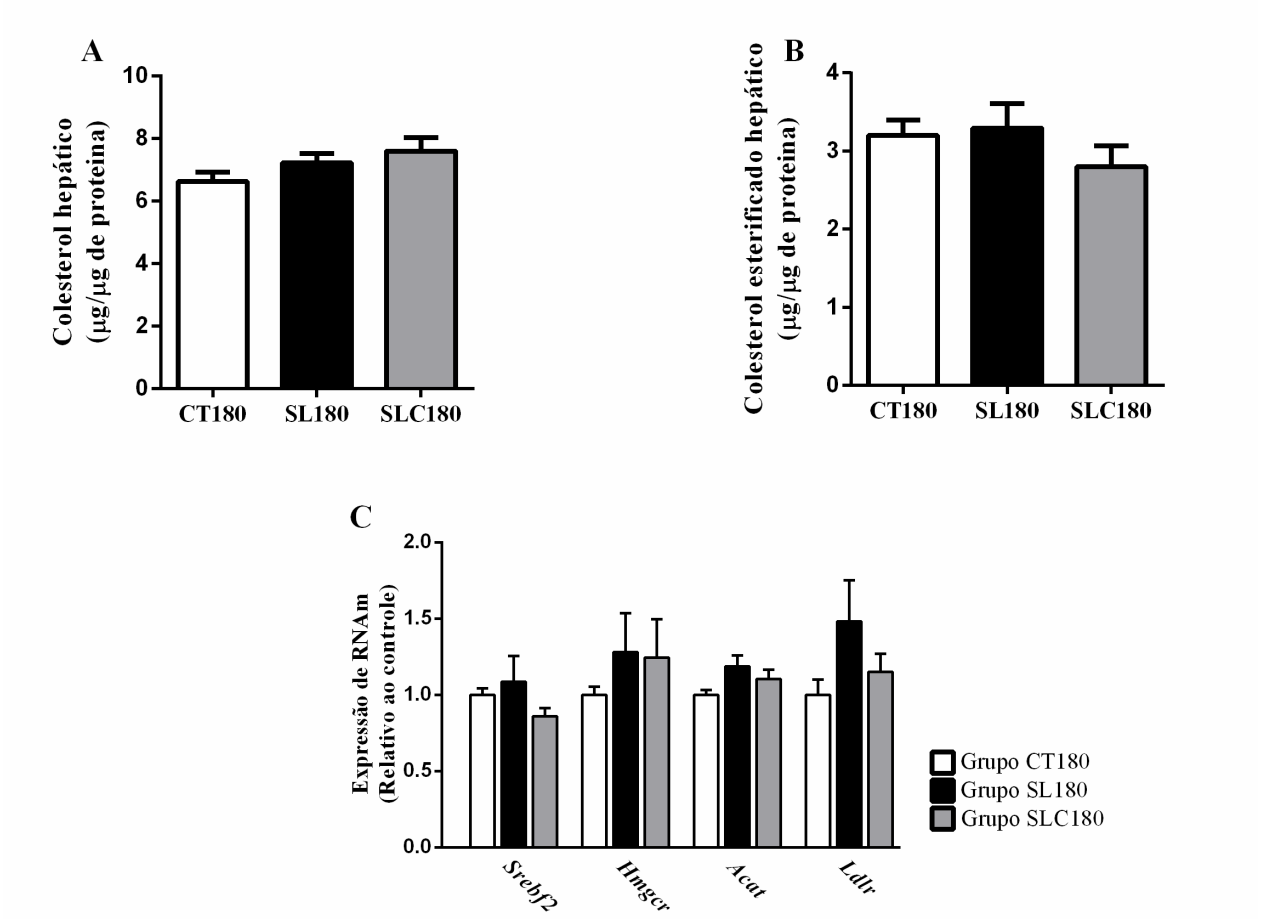


Figura 12. Metabolismo do colesterol hepático aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, barra branca), grupo superalimentado (SL180, barra preta) e grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Conteúdo de colesterol livre. **B**: Conteúdo de ésteres de colesterol. **C**: Expressão de RNAm dos genes envolvidos no metabolismo do colesterol (*Srebf2*, *Hmgcr*, *Acat*, *Ldlr*). Os resultados do qPCR são expressos em relação aos valores do grupo controle, que foi ajustado para 1. N= 7-9. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

Quando os marcadores de autofagia foram avaliados por qPCR, não foram observadas alterações na expressão de RNAm da *Becn1*, *Atg7*, *Map1b*, *Sqstm1* e *Lamp2* (Fig13A). Apesar de ser de baixa magnitude, o grupo SLC180 apresenta um aumento na expressão do RNAm do *Atg5* (P=0,042, SLC180 *vs* CT180) (Fig13A). Em relação à expressão proteica, o grupo SLC180 apresentou redução de Beclin1 (P=0,055, SLC180 *vs* CT180), enquanto os grupos SL180 (P=0,007) e SLC180 (P=0,001) apresentaram aumento significativo na razão LC3II/I em relação ao controle (Fig13B). Não foram observadas alterações na expressão proteica do AMPK fosforilado ou ATG12 nesta idade entre os grupos (Fig13B).

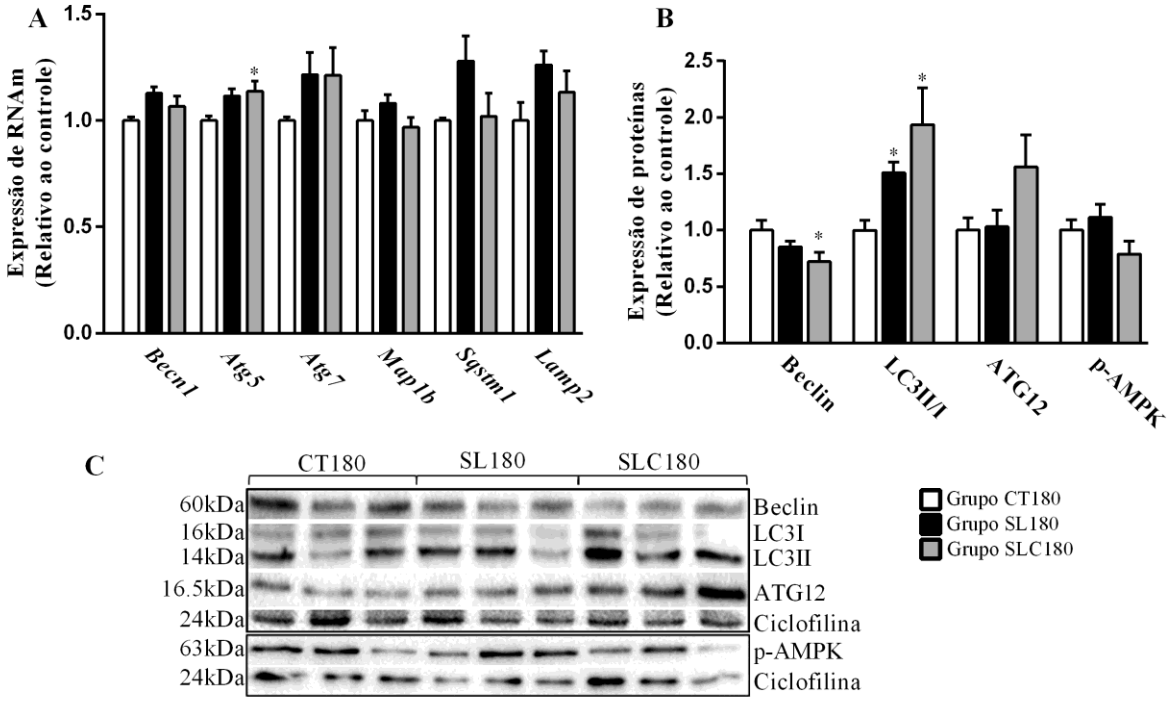


Figura 13. Marcadores da via autofágica no fígado aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, linha CT), grupo superalimentado (SL180, barra preta) grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Expressão de RNAm (*Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Maplb*, *Sqstm1*, *Lamp2*). **B**: Expressão proteica (Beclin, LC3II/I, ATG12, fosfo-AMPK). **C**: Bandas representativas obtidas por *Western blot*. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 7-9.Valores expressos como média ± erro padrão da média. * Diferença estatística *vs* grupo CT180.

Aos 180 dias de idade, nenhuma alteração na expressão de RNAm da *Ern1*, *Eif2ak3*, *Eif2a* e *Hspa5* foi encontrada entre os grupos (Fig14A). Contudo, o RNAm de *Ddit3* estava aumentado nos grupos SL180 (P=0,033) e SLC180 (P=0,009) em comparação com o controle. Já a expressão do *Atf6* estava aumentada apenas no SLC180 (P=0,004, SLC180 *vs* CT180) (Fig14A). Em relação à expressão proteica, não foram observadas alterações significativas em IRE1α, eIF2α fosforilada e XBP1s entre os grupos (Fig14B), enquanto o grupo SLC180 apresentou uma alta expressão de PERK fosforilada (P=0,010, SLC180 *vs* CT180; P=0,004, SLC180 *vs* SL180) (Fig14B).

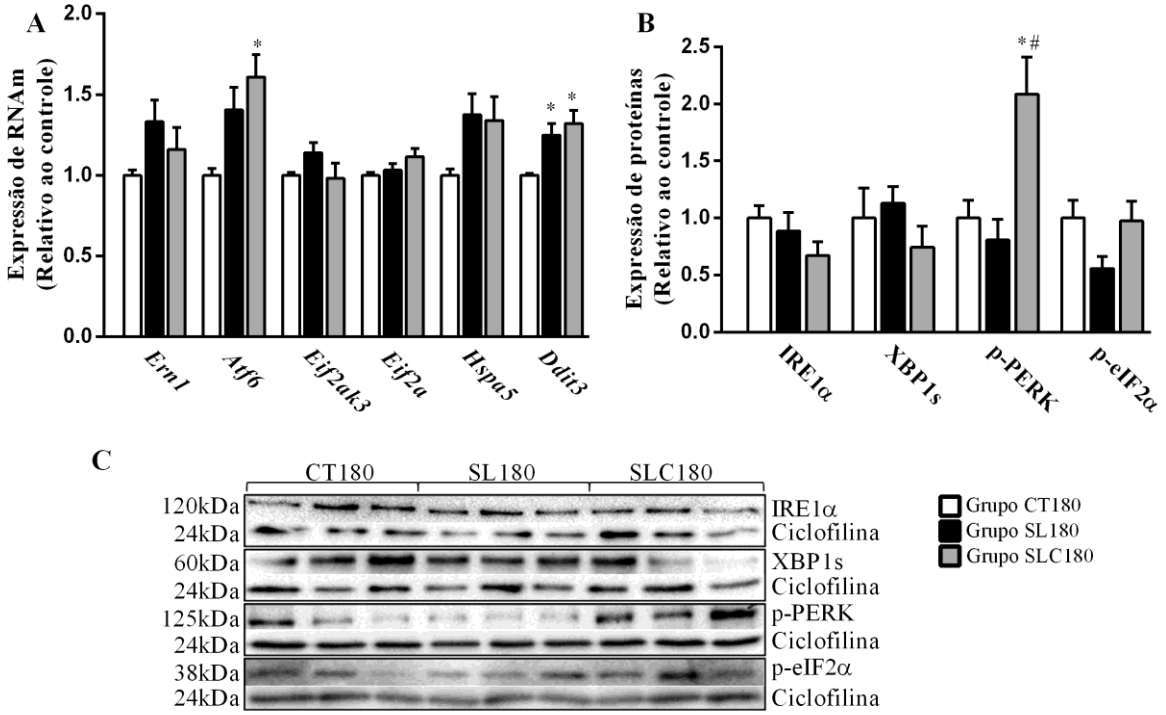
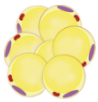
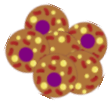


Figura 14. Marcadores do estresse de RE no fígado aos 180 dias de idade. Grupo controle (CT180, linha CT), grupo superalimentado (SL180, barra preta) grupo superalimentado tratado com cinamaldeído (SLC180, barra cinza). **A**: Expressão de RNAm (*Ern1*, *Atf6*, *Eif2ak3*, *Eif2α*, *Hspa5, Ddit3*). **B**: Expressão proteica (IRE1α, XBP1s, fosfo-PERK, fosfo-eIF2α). **C**: Bandas representativas obtidas por *Western blot*. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo de controle, que foi definido como 1. N= 7-9.Valores expressos como média ± erro padrão da média. * Diferença estatística *vs* grupo CT180. # Diferença estatística *vs* grupo SL180.

Os resultados referentes ao metabolismo lipídico, autofagia e estresse de retículo no fígado aos 180 dias, estão descritos no artigo recentemente publicado pela *Journal of Nutritional Biochemistry* (J Nutr Biochem. 2020. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108321).

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos aos 60 e 180 dias de idade após tratamento com cinamaldeído durante a fase da adolescência no modelo de obesidade precoce induzida pela superalimentação na lactação.

Efeito do cinamaldeído			
		60 dias de idade (logo após o final do tratamento)	**180 dias de idade** (4 meses após o fim do tratamento)
		↓Eficiência energética ↓HOMA-IR ↓Massa de TAB visceral ↓Triacilglicerol sérico	↓ Massa corporal ↓Eficiência energética ↓ Hiperfagia ↓Massa de TAB visceral ↓Triacilglicerol sérico
TAB		↓Tamanho do adipócito	↓Tamanho do adipócito
		Epididimal: ↓*Acaca*	**Epididimal:** ↓*Lep* ↓*Pparg* ↓*Lpl* ↓*Dgat2*
		Inguinal: ↓*Srebp1c* ↑*Pparg* ↑*Ppargc1a* ↑*Fgf21*	**Inguinal:** ↓*Pparg* ↓*Dgat2* ↑*Ppargc1a*
TAM		↑*Ppara* ↑*Fgf21* ↑*Ucp1*	↓Acúmulo de triacilglicerol ↓*Pparg* ↓*Adrb3* ↑*Fgf21*
Fígado		↓*Srebp1c* ↓*Acaca* ↓*Lipe* ↑p-AMPK ↑LC3II/I ↓*Sqstm1* ↓IRE1α ↓p-eIF2α	↓Acúmulo de triacilglicerol ↓*Srebp1c* ↓*Acaca* ↓*Becn1* ↑LC3II/I ↑p-PERK ↑*Ddit3* ↑*Atf6*

Acaca: Acetil-CoA carboxilase 1. ***Adrb3***: Receptor adrenérgico beta 3. ***Atf6***: Fator ativador de transcrição 6. **Becn1**: Equivalente de mamífero do gene ATG6. ***Ddit3***: Proteína homóloga C/EBP. ***Dgat2***: Diacilglicerol aciltransferase. ***Fgf21***: Fator de crescimento de fibroblastos 21. **HOMA-IR**: Índice do Modelo de Avaliação da Homeostase para determinação da resistência à insulina. **IRE1α**: Enzima ativada por inositol 1 alfa. **LC3II/I**: Proteína leve associada à microtúbulos 3 ativada. ***Lep***: Leptina. ***Lipe***: Lipase hormônio sensível. ***Lpl***: Lipoproteína lipase. **p-AMPK**: Proteína quinase ativada por AMP fosforilada. **p-eIF2α**: Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 alfa. ***Ppara***: Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa. ***Pparg***: Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama. ***Ppargc1a***: Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma. **p-PERK**: Proteína quinase endoplasmática similar à PKR fosforilada. ***Sqstm1***: Sequestossomo 1. ***Srebp1c***: Proteína ligadora do elemento regulador de esteróis 1c. **TAB**: Tecido adiposo branco. **TAM**: Tecido adiposo marrom.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou pela primeira vez o potencial efeito reprogramador do cinamaldeído sobre o metabolismo energético em modelo animal de obesidade precoce. Além disso, descrevemos pela primeira vez o impacto tanto do modelo de superalimentação precoce, quanto do cinamaldeído sobre a modulação do processo autofágico e estresse de RE.

O modelo de superalimentação precoce, induzido pela redução da ninhada, levou a diversas alterações metabólicas, como maior massa de TAB visceral, maior ingestão alimentar e resistência à insulina aos 60 dias de idade, como descrito na literatura (Bei *et al*., 2015; Conceição *et al*., 2013; Habbout *et al*., 2013; Rodrigues *et al*., 2007). Além disso, os animais do grupo SL60 apresentaram maior eficiência energética, indicando maior armazenamento de gordura na região visceral para a mesma ingestão calórica. Os animais superalimentados também apresentaram hipertrofia dos adipócitos tanto no compartimento epididimal (representante do tecido adiposo branco visceral) quanto no compartimento inguinal (representante do tecido adiposo branco subcutâneo), como descrito no modelo ao desmame (Conceição *et al*., 2015; Kayser *et al*., 2015).

O tratamento com cinamaldeído durante a adolescência foi capaz de reduzir a massa de TAB visceral sem alterar a ingestão alimentar, resultando em uma atenuação da eficiência energética. A capacidade de cinamaldeído como um nutracêutico anti-obesidade, diminuindo a adiposidade visceral foi demonstrada anteriormente em modelos de obesidade (Camacho *et al*., 2015; Khare *et al*., 2016), e o presente estudo é o primeiro a mostrar esse efeito em animais jovens. Os estudos na literatura sobre o efeito do cinamaldeído sobre a saciedade são pouco conclusivos, uma vez que trabalhos descrevem redução da ingestão (Khare *et al*., 2016; Zuo *et al*., 2017) enquanto outros autores não veem alteração (Camacho *et al*., 2015; Huang *et al*., 2011), como observado no presente estudo nessa idade.

Aos 180 dias, o grupo SL180 manteve o fenótipo de maior massa corporal, apresentando maior obesidade visceral, e hipertrofia dos adipócitos brancos, maior acúmulo de gordura nos adipócitos marrons, maior ingestão alimentar associado a maior eficiência energética, e maior nível sérico de insulina, evidenciando a eficiência

deste modelo de programação na indução de alterações metabólicas no longo prazo (Bei *et al*., 2015; Conceição *et al*., 2017, 2015, 2013).

O cinamaldeído e o ácido cinâmico (produto da metabolização do cinamaldeído) são encontrados em diversos tecidos 12 horas após a administração do cinamaldeído em ratos. Após 24h, nenhum dos compostos pode ser encontrado no organismo (Zhao *et al*., 2015). Porém, sendo a fase da adolescência um dos períodos críticos do desenvolvimento, com importante capacidade plástica de adaptação (Holtrup *et al*., 2017), é possível que a intervenção com cinamaldeído nessa fase pudesse gerar alterações epigenéticas estáveis e duradouras que promovessem benefícios metabólicos para os animais no longo prazo.

Surpreendentemente, aos 180 dias (4 meses após o fim da intervenção) o cinamaldeído usado na fase da adolescência foi capaz de normalizar a adiposidade visceral, e a eficiência energética, e reduzir a hiperfagia. Não podemos descartar a possibilidade de o cinamaldeído ter alterado mecanismos de saciedade, como descrito por alguns autores (Khare *et al*., 2016; Zuo *et al*., 2017), que gerasse esse fenótipo aos 180 dias. Portanto, a redução da adiposidade e hiperfagia observado nessa idade pode ser consequência de diversos mecanismos centrais e periféricos, que sugerem um efeito programador do cinamaldeído sobre o metabolismo. A partir desse resultado, objetivamos explorar os mecanismos moleculares que poderiam estar envolvidos no metabolismo lipídico do tecido adiposo aos 60 e 180 dias.

No grupo SL60 não vimos alteração na expressão da *Lep,* e de genes relacionados à lipogênese e adipogênese como *Pparg*, *Srebp1c*, *Acaca*, *Fasn*, *Lpl* e *Dgat2* em ambos os compartimentos. Apesar desse grupo ter apresentado aumento da massa adiposa visceral e do diâmetro dos adipócitos epididimais e inguinais, não identificamos as alterações moleculares que levaram a esse fenótipo. Outros autores já relataram aumento na expressão proteica da ACC e FAS ao desmame (Conceição *et al*., 2015), e aumento da atividade da FAS no TAB visceral ao desmame e 84 dias de idade (Balonan & Sheng, 2000). Esses dados sugerem aumento da lipogênese ao desmame, que podem ter gerado o acúmulo de gordura observado por nós aos 60 dias de idade.

No grupo tratado, vimos que o cinamaldeído reduziu a obesidade hipertrófica nos dois compartimentos do TAB, através da redução do diâmetro do adipócito, enquanto

reduziu significativamente a expressão da *Acaca* (marcador da lipogênese *de novo*) (Song *et al*., 2018) no TAB epididimal, sugerindo redução dessa via. Já no compartimento inguinal, o tratamento reduziu significativamente a expressão do *Srebp1c* (fator de transcrição indutor da lipogênese *de novo*) (Song *et al*., 2018), sugerindo também redução da lipogênese nesse compartimento. Em cultura de adipócito, já foi mostrado que o cinamaldeído reduz a lipogênese e acúmulo de TAG (Huang *et al*., 2007; Khare *et al*., 2016). A redução da lipogênese induzida pelo cinamaldeído no TAB epididimal e inguinal parece ser um dos mecanismos responsáveis pela redução do acúmulo de TAB visceral e do tamanho do adipócito, como observado aos 60 dias.

Não vimos alteração na expressão do *Ppargc1a* e *Fgf21* no grupo SL60 no TAB inguinal. No entanto, o cinamaldeído estimulou a expressão do *Pparg*, *Ppargc1a* e *Fgf21* nesse compartimento, sugerindo aumento do *browning* e termogênese. O PPARγ, PGC1α e FGF21 são fatores essenciais na indução do *browning*, que ocorre principalmente no compartimento subcutâneo do TAB (Cuevas-Ramos *et al*., 2019; Merlin *et al*., 2018). O FGF21 é importante para o recrutamento e ativação dos adipócitos bege (Cuevas-Ramos *et al*., 2019; Sonoda *et al*., 2017), além de estimular a transcrição de diversos genes relacionados à termogênese, dentre eles PGC1α e UCP1 (Fisher *et al*., 2012). O cinamaldeído estimula em adipócitos primários, a transcrição da *Ucp1* de forma dependente do FGF21 (Jiang *et al*., 2017). O efeito do cinamaldeído sobre o *browning* do tecido adiposo branco também foi mostrado em modelo de obesidade por dieta hiperlipídica, em que foi visto aumento da expressão proteica de UCP1, PGC1α, PPARγ (Zuo *et al*., 2017).

O grupo SL180 mostrou aumento da expressão da *Lpl* e *Dgat2* no compartimento epipidimal, sugerindo aumento na captação e formação de TAG e que pode ter contribuído para o aumento do volume do adipócito (Yang *et al*., 2018). Além disso, o aumento da expressão da *Lep* é coerente com o fenótipo de maior tamanho do adipócito observado nestes animais (Guo *et al*., 2004), e o aumento da expressão corrobora a hiperleptinemia já vista neste modelo por outros autores (Liu *et al*., 2013; Stefanidis & Spencer, 2012). O grupo SLC180 manteve a redução do tamanho dos adipócitos no compartimento epididimal, em concordância com a normalização da adiposidade visceral aos 180 dias de idade. Este fenótipo pode ser consequência da

atenuação na expressão da *Lpl* e *Dgat2,* enzimas envolvidas na captação e síntese de TAG (Song *et al*., 2018), além da menor expressão do *Pparg*, fator de transcrição que regula a maquinaria lipogênica (Ahmadian *et al*., 2013), além de estar envolvido com a regulação da adipogênese (Lefterova *et al*., 2014). O efeito do cinamaldeído sobre o PPARγ foi descrito no trabalho de Huang e colaboradores (2011), em que foi visto redução da atividade transcricional do PPARγ em cultura de adipócitos brancos. É possível que um efeito programador do cinamaldeído sobre esses marcadores tenha contribuído para a redução na expressão de RNAm aos 180 dias de idade e contribuir para o fenótipo. Além disso, a atenuação da expressão da *Lep* corrobora a redução no tamanho dos adipócitos observada nos animais SLC180.

Classicamente, a hipertrofia do TAB visceral na obesidade é associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IL1β e IL6 o que contribui para a instalação da inflamação crônica de baixo grau (Magnuson *et al*., 2018). De forma inesperada, não vimos alteração na expressão de citocinas pró-inflamatórias, pelo menos no que se refere à expressão de RNAm no TAB epididimal no grupo SL nas duas idades, apesar da hipertrofia do tecido. No modelo de superalimentação na lactação já foi mostrado aumento na expressão do *Tnfa* no TAB visceral ao desmame (Chen *et al*., 2008), o que não foi visto aos 150 dias de idade (Liu *et al*., 2013), apesar do autor também destacar aumento na infiltração de macrófagos. Além disso, os animais tratados com cinamaldeído também não tiveram alteração no padrão de expressão das citocinas pró-inflamatórias. Não descartamos uma ação anti-inflamatória do cinamaldeído nestes animais, visto que este nutracêutrico reduziu níveis sistêmicos de IL1β e reduziu a expressão gênica de citocinas como *Tnfa* e *Il6* no TAB visceral de animais obesos por dieta hiperlídica (Khare *et al*., 2016), e assim contribuir para os fenótipos benéficos observados por nós.

Ao avaliarmos o efeito do cinamaldeído no compartimento inguinal aos 180 dias de idade, vimos que o tratamento manteve a área dos adipócitos menor no grupo SLC180. Além disso, o tratamento promoveu a redução na expressão do *Pparg* e *Dgat2*, sugerindo um efeito programador sobre a expressão desses marcadores, que pode ser relacionado à redução da lipogênese/adipogênese e com a redução do tamanho do adipócito. O tratamento também manteve a expressão do *Ppargc1a* aumentada, fator de transcrição que estimula a biogênese e função mitocondrial

(Puigserver & Spiegelman, 2003), além de estar diretamente relacionado com a termogênese em adipócitos beges (Lemecha *et al*., 2018). É possível que o efeito programador do cinamaldeído sobre o aumento do *Ppargc1a* contribua para a melhora da função mitocondrial e consequentemente do metabolismo tecidual.

Com relação à fisiologia do tecido adiposo marrom aos 60 dias de idade, o aumento na massa de TAM observada no grupo SL60 se correlaciona com a morfologia unilocular dos adipócitos marrons (observado pela histologia) e com o quadro obesogênico, apesar de não apresentar diferença estatística na deposição de gordura. O modelo de superalimentação se correlaciona com redução da função do TAM (Xiao *et al*., 2007) e aumento na deposição de gordura (principalmente na periferia do tecido), associado à redução da temperatura do TAM (de Almeida *et al*., 2013). Além disso, o grupo SL60 apresentou redução na expressão do *Fgf21*, o que pode gerar prejuízos metabólicos para o tecido no longo prazo, visto que o FGF21 é importante não só para a atividade termogênica, mas também para o metabolismo de glicose no tecido (Fisher & Maratos-Flier, 2016).

Nos animais tratados, a análise de expressão gênica do TAM mostrou aumento da expressão do *Ppara*, *Ucp1* e *Fgf21* no grupo SLC60, sugerindo estímulo a β-oxidação e termogênese. O efeito do cinamaldeído de ativar o TAM, através do aumento da expressão de RNAm e proteica da UCP1 foi descrito em outros modelos de obesidade (Khare *et al*., 2016; Tamura *et al*., 2012). Além de que a estimulação da β-oxidação (através do aumento da *Cpt1a*), e termogênese (através do aumento do *Fgf21* e *Ucp1*) já foram descritos em adipócitos brancos (Jiang *et al*., 2017).

A autofagia é um processo catabólico através do qual os componentes celulares são reciclados, pela digestão de macromoléculas, assim como de organelas velhas e/ou danificadas, e contribuindo para a degradação dos estoques lipídicos e renovação de mitocôndrias (Eskelinen, 2019). Não vimos alteração na expressão de RNAm dos marcadores da autofagia no grupo SL60. A avaliação de marcadores da via autofágica no TAM mostrou aumento somente na expressão do *Lamp2* no grupo SLC60. O LAMP2 é uma proteína presente na membrana do lisossomo e do autofagolisossomo (Galluzzi *et al*., 2017). No entanto, o aumento observado no grupo SLC60 não é suficiente para confirmar um aumento no fluxo autofágico.

Aos 180 dias de idade, a análise histológica do TAM mostrou aumento no acúmulo de lipídeos no grupo SL180, com característica morfológica unilocular (de Almeida *et al.*, 2013; Conceição *et al.*, 2017). O processo de *whitening* (excesso de acúmulo de gordura no adipócito) na obesidade está relacionado com a perda da função termogênica (Shimizu & Walsh, 2015), o que gera prejuízos sistêmicos, uma vez que o TAM também possui a importante função de regular a homeostase energética (Chondronikola *et al*., 2014; Stanford *et al*., 2013). O tratamento com cinamaldeído reduziu o acúmulo de lipídeos, apresentando inclusive morfologia similar ao grupo CT60, com armazenamento multilocular e poucas gotículas, e sugerindo redução do *whitening*. Além disso, o tratamento reduziu a expressão do *Pparg*, o que pode ter contribuído para a redução da lipogênese e do acúmulo (Corrales *et al*., 2018), e consequentemente redução da massa do TAM. Não vimos alteração nos marcadores da autofagia nos dois grupos aos 180 dias.

O grupo SLC180 manteve a expressão do *Fgf21* aumentada no TAM, enquanto apresentou redução na expressão do *Adrb3*. O TAM aumenta a produção de FGF21 em resposta a estimulação adrenérgica (Hondares *et al*., 2011). Uma vez que a expressão do *Adrb3* se encontra reduzida no grupo SLC180, é possível que o aumento da expressão do *Fgf21* seja consequência de uma programação induzida diretamente pelo cinamaldeído durante o tratamento na adolescência. Considerando o aumento importante na expressão do *Fgf21* no TAM dos animais SLC180, sugerimos que isso impacte em maior nível sérico deste hormônio nos animais tratados com cinamaldeído na adolescência. Além disso, a redução do acúmulo de gordura não parece ser devido à lipofagia, uma vez que não observamos alteração nos marcadores de autofagia neste tecido, nesta idade.

Ao avaliarmos o efeito do tratamento sobre a expressão do *Pparg*, observamos um aumento no TAB inguinal aos 60 dias de idade, o que foi correlacionado ao aumento da termogênese (Montanari *et al*., 2017), principalmente por estar associado ao aumento de genes como *Ppargc1a* e *Fgf21* (Fisher *et al*., 2012). No entanto, a redução na expressão do *Pparg* observada no TAM, TAB inguinal e epididimal aos 180 dias, parecem ser consequência de um efeito programador e sugere redução da lipogênese (Corrales *et al*., 2018), uma vez que os três tecidos apresentaram redução da massa e acúmulo de lipídeos no grupo tratado com o cinamaldeído. Além disso, o

PPARγ é um importante regulador da adipogênese (Lefterova *et al*., 2014) e a redução dele aos 180 dias de idade no TAB inguinal e epididimal, pode estar relacionado com a redução na formação de novos adipócitos e ter contribuído para a redução da massa do tecido.

Dessa forma, podemos sugerir que a redução da obesidade visceral observada aos 60 dias seja em consequência da redução da lipogênese/adipogênese no TAB visceral, redução da lipogênese/adipogênese e aumento de marcadores de *browning* no TAB subcutâneo, associado ao aumento da termogênese no TAM induzido pelo tratamento. No longo prazo, o tratamento refletiu em menor massa corporal, obesidade visceral associada à redução da lipogênese no TAB e TAM, reforçando o efeito do cinamaldeído como reprogramador do metabolismo.

Ao avaliarmos a homeostase glicêmica aos 60 dias de idade, observamos que o tratamento com cinamaldeído foi capaz de atenuar a resistência à insulina induzida pela superalimentação, como indicado pelos valores de HOMA-IR. Este resultado está de acordo com a literatura, onde o cinamaldeído é descrito como insulina-símile, aumentando a sensibilidade à insulina e melhorando a homeostase glicêmica (Zhu *et al*., 2017). No entanto, o tratamento parece não ter efeito benéfico sobre a homeostase glicêmica no longo prazo, uma vez que não houve diferenças no HOMA-IR aos 180 dias de idade. Esse resultado sugere que o efeito benéfico do cinamaldeído sobre a homeostase glicêmica dependa da presença do cinamaldeído no organismo.

Não houve alterações significativas no colesterol sérico, colesterol livre e colesterol esterificado no fígado, nem na expressão de genes associados ao metabolismo do colesterol hepático entre os grupos nas duas idades. Estudos anteriores também não mostraram alterações no colesterol sérico no modelo SL em diferentes idades (Ji *et al*., 2014; Rodrigues *et al.*, 2007). Além disso, o cinamaldeído não parece induzir mudanças significativas no colesterol sérico, como descrito por outros estudos em modelos de obesidade (Camacho *et al*., 2015; Tamura *et al*., 2012).

Não vimos alteração no triacilglicerol sérico aos 60 dias de idade, como descrito por outros autores em diferentes idades (Bei *et al*., 2015; Liu *et al*., 2013), uma vez que o aumento do triacilglicerol sérico é uma das características da dislipidemia, diretamente associado com a obesidade e o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Vekic *et al*., 2018). No entanto, vimos que o tratamento reduziu o triacilglicerol sérico no grupo

SLC60. O efeito hipolipemiante do cinamaldeído já havia sido demonstrado em modelos de obesidade e diabetes tipo 2 (Huang *et al*., 2011; Li *et al*., 2012).

No metabolismo hepático, não observamos alteração nos marcadores de lipogênese no modelo aos 60 dias de idade, apesar de já ter sido descrito aumento do *Srebp1c*, *Acaca*, *Fasn* nos animais ao desmame e na idade adulta (Ji *et al*., 2014; Yang *et al*., 2018). Ao avaliarmos o grupo SLC60, vimos que o tratamento reduziu a expressão do *Srebf1c* e *Acaca*. Portanto, nossos dados sugerem que o cinamaldeído reduz a síntese hepática de triacilgliceróis, que associado a menor síntese de lipídeos no TAB, pode estar refletindo a menor liberação, contribuindo para a redução do triacilglicerol sérico observado no grupo SLC60 e contribuindo para a prevenção da dislipidemia no longo prazo.

Aos 180 dias de idade, observamos aumento dos níveis séricos de triacilgliceróis, massa hepática e conteúdo hepático de triacilgliceróis, acompanhados de uma maior expressão do maquinário lipogênico no fígado dos animais SL180, como já descrito na literatura (Conceição *et al*., 2013; Ji *et al*., 2014; Liu 2013). O tratamento com cinamaldeído durante a adolescência foi capaz de atenuar os níveis séricos e hepáticos de triacilgliceróis e a expressão de *Srebp1c* e *Acaca*, sugerindo efeito reprogramador do cinamaldeído, que pode ter levado a menor acúmulo de TAG hepático e possivelmente o desenvolvimento de esteatose.

A obesidade tem sido correlacionada com a redução da autofagia nos hepatócitos, em que o comprometimento do fluxo autofágico hepático está associado à diminuição da mobilização dos estoques lipídicos, através da redução da lipofagia (Singh *et al*., 2009). O grupo SL60 apresentou redução na razão proteica LC3II/I aos 60 dias de idade, sugerindo uma redução no processo autofágico, consistente com o quadro de obesidade (Che *et al*., 2018; Ferhat *et al*., 2018; Lavallard & Gual, 2014). A expressão da forma ativa do LC3 (LC3II) é comumente utilizada como marcador de atividade autofágica, uma vez que o LC3II está presente nas membranas autofágicas durante todo o processo até a digestão pelas enzimas lisossomais (Mizushima *et al*., 2010).

O tratamento com o cinamaldeído levou a um aumento da razão LC3II/I, enquanto a reduziu a expressão do gene *Sqstm1*, sugerindo um efeito estimulatório do cinamaldeído na autofagia via ativação da AMPK, um sensor energético da célula e o

principal regulador da autofagia (Cetrullo *et al*., 2015). Além disso, a expressão da proteína ATG12 apresentou um perfil semelhante de expressão de LC3II/I. O efeito do cinamaldeído na autofagia tem sido descrito em diferentes patologias, como o câncer (Ahn *et al*., 2015; Meng *et al*., 2017), doenças neurológicas (Bae *et al*., 2018), cardíacas (Zhao *et al*., 2016) e disfunções musculares (Kaur *et al*., 2018), por exemplo. O aumento ou diminuição da autofagia pode ser prejudicial para célula, dependendo da doença. Parece que o cinamaldeído atua como um normalizador do fluxo autofágico, trazendo benefícios para a homeostase celular, como observado no presente estudo. Além disso, é possível que a lipofagia também seja estimulada pelo cinamaldeído, mecanismo que poderia compensar a redução da *Lipe* (marcador de lipólise) (Luo *&* Liu, 2016) no grupo SLC60. Dessa forma, aumento da lipofagia associada à redução da síntese de triacilgliceróis pode contribuir para menor acúmulo de gordura nos hepatócitos.

O estresse de retículo endoplasmático é um mecanismo ativado em resposta a situações de estresse metabólico (Ghemrawi *et al*., 2018). A ativação das vias mediadas pela PERK, IRE1α e ATF6, regula a transcrição gênica de diversos fatores envolvidos na expansão do RE, diminuição na síntese de proteínas e degradação de proteínas malformadas e mal dobradas (Hetz *et al*., 2015). No fígado dos animais aos 60 dias de idade, não vimos alteração na expressão de RNAm e de proteínas que indiquem aumento de estresse de RE no grupo SL60. No entanto, o tratamento com cinamaldeído diminuiu a expressão proteica de IRE1α e eIF2α fosforilada, sugerindo redução do estresse (Cnop *et al*., 2012), que pode ter contribuído para a redução da resistência à insulina nesse grupo. Além disso, a redução da fosforilação de eIF2α está relacionada à maior tolerância à glicose e à atenuação da esteatose hepática (Oyadomari *et al*., 2008). O estresse de RE, como observadas em modelos de obesidade, aumentam a clivagem e ativação da SREBP1c e estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de esteatose hepática (Kammoun *et al*., 2009). Portanto, a redução do estresse do RE no grupo SLC60 pode contribuir para prevenção da progressão da NAFLD no longo prazo.

Quando os marcadores de autofagia foram avaliados no fígado aos 180 dias de idade, ambos os grupos SL180 e SLC180 exibiram maior expressão proteica da razão LC3II/I comparado ao controle, indicando que o cinamaldeído não induziu uma

modificação de longo prazo no fluxo autofágico, e o efeito observado pode ser consequência de uma adaptação induzida pela superalimentação precoce. O aumento do LC3II/I no grupo SLC180 parece ocorrer de forma independente da Beclin1.

Aos 180 dias de idade, o grupo SL180 também não parece apresentar estresse de RE no fígado. De forma similar ao que foi observado nos marcadores de autofagia, o efeito benéfico do cinamaldeído no estresse do RE foi perdido no longo prazo. O grupo SLC180 apresentou um fenótipo molecular sugerindo aumento do estresse do RE, devido ao aumento na expressão do *Atf6*, *Ddit3* e ativação de PERK (Cnop *et al*., 2012) em SLC180, apesar disso observamos melhora no fenótipo hepático, devido à redução da lipogênese e acúmulo de TAG. É possível que o aumento da PERK fosforilada esteja relacionado à expressão do NRF2, importante fator relacionado à redução do estresse oxidativo e citoproteção (Cullinan & Diehl, 2006).

A canela e o cinamaldeído são capazes de induzir melhora no metabolismo do triacilglicerol em humanos e modelos animais (Huang *et al*., 2011; Khan *et al*., 2003; Lopes *et al*., 2015). No entanto, este é o primeiro estudo que mostra que a ingestão de cinamaldeído pode induzir benefícios no longo prazo no metabolismo lipídico hepático e adipocitário, e reforçando que a suplementação precoce com este nutracêutico poderia induzir uma reprogramação do metabolismo lipídico.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o tratamento com cinamaldeído durante a fase da adolescência tem efeitos benéficos no curto e longo prazo no modelo de obesidade precoce. Logo após o tratamento com o cinamaldeído, os animais apresentaram vários benefícios metabólicos, incluindo redução da resistência à insulina, redução da adiposidade visceral e obesidade hipertrófica, redução da maquinaria lipogênica no tecido adiposo branco e fígado, estimulação da termogênese no tecido adiposo branco subcutâneo e tecido adiposo marrom. Além de estimular o fluxo autofágico e melhorar o estresse de RE no fígado. No longo prazo, o cinamaldeído reprograma vários fenótipos negativos, normalizando a obesidade visceral associado à modulação do metabolismo lipídico no TAB, TAM e fígado. Portanto, nossos dados destacam que a fase adolescente é uma janela importante para a intervenção das disfunções metabólicas infanto-juvenis, e o cinamaldeído pode ser um adjuvante eficiente no tratamento da obesidade precoce.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian, Suh J, Hah N, Liddle C, Atkins A, Downes M, *et al*. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. Nat Med 2013;19:557–66.

Ahn S-G, Jin Y-H, Yoon J-H, Kim S-A. The anticancer mechanism of 2′-hydroxycinnamaldehyde in human head and neck cancer cells. Int J Oncol 2015;47:1793–800.

Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, *et al*. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. J Nutr Biochem 2018; 58:1-16.

Alexandre-Santos B, Fragoso VS, Magliano DC, Frantz EDC. The use of quantitative and qualitative approach to evaluate fat distribution and morphology in white adipose tissue. Acta Sci Anat. 2018;1(1):69-76.

Allen RW, Schwartzman E, Baker WL, Coleman CI, Phung OJ. Cinnamon Use in Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. Ann Fam Med 2013;11:452–9.

Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. Arch Endocrinol Metab 2016;60:138–42.

Arroyo-Johnson C, Mincey KD. Obesity Epidemiology Worldwide. Gastroenterol Clin North Am 2016;45:571–9.

Attig L, Gabory A, Junien C. Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010;13:284–93.

Ayala-Moreno R, Racotta R, Anguiano B, Aceves C, e Quevedo L. Perinatal undernutrition programmes thyroid function in the adult rat offspring. Br J Nutr 2013; 110: 2207–2215.

Bae W-Y, Choi J-S, Jeong J-W. The Neuroprotective Effects of Cinnamic Aldehyde in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. Int J Mol Sci 2018;19:1-10.

Balonan LC, Sheng H-P. Perinatal Feedings Adversely Affect Lipogenic Activities but Not Glucose Handling in Adult Rats. Pediatr Res 2000;48:668–73.

Bargut TCL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. Tissue Cell 2016;48:452–60.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. J Am Coll Nutr 2004;23:588S-595S.

Barneda D, Christian M. Lipid droplet growth: regulation of a dynamic organelle. Curr Opin Cell Biol 2017;47:9–15.

Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, *et al*. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. Mol Metab 2016;5:352–65.

Bei F, Jia J, Jia Y-Q, Sun J-H, Liang F, Yu Z-Y, *et al*. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. Lipids Health Dis 2015;14:1-12.

Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. J Hepatol 2015;62:S47–64.

Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D, Herrero L. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. Adipocyte 2016;5:98–118.

Camacho S, Michlig S, de Senarclens-Bezençon C, Meylan J, Meystre J, Pezzoli M, *et al*. Anti-Obesity and Anti-Hyperglycemic Effects of Cinnamaldehyde via altered Ghrelin Secretion and Functional impact on Food Intake and Gastric Emptying. Sci Rep 2015;5:1-10.

Cetrullo S, D'Adamo S, Tantini B, Borzi RM, Flamigni F. mTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2015;25:59–75.

Che Y, Wang Z, Yuan Y, Zhang N, Jin Y, Wan C, *et al*. Role of autophagy in a model of obesity: A long-term high fat diet induces cardiac dysfunction. Mol Med Rep 2018;13251-32618.

Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and Postnatal Overnutrition Differentially Impact Appetite Regulators and Fuel Metabolism. Endocrinology 2008;149:5348–56.

Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. J Nutr Biochem 2018;54:1–10.

Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, *et al*. Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. Diabetes 2014;63:4089–99.

Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids 2013;1831:819–24.

Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends Mol Med 2012;18:59–68.

Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ 2005;12:1509–18.

Conceição EPS, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TAS, Peixoto-Silva N, *et al*. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition — role of insulin resistance. J Nutr Biochem 2013;24:81–7.

Conceição EPS, Moura EG, Carvalho JC, Oliveira E, Lisboa PC. Early redox imbalance is associated with liver dysfunction at weaning in overfed rats: Litter size reduction affects lipogenesis and oxidative balance. J Physiol 2015;593:4799–811.

Conceição EPS, Moura EG, Oliveira E, Guarda DS, Figueiredo MS, Quitete FT, *et al*. Dietary calcium supplementation in adult rats reverts brown adipose tissue dysfunction programmed by postnatal early overfeeding. J Nutr Biochem 2017;39:117–25.

Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G. PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. Int J Mol Sci 2018;19:1-16.

Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, *et al*. Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. Endocrinology 2008;149:6018–27.

Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, *et al*. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome. Arch Biochem Biophys 2010;501:158–61.

Crujeiras AB, Cordero P, Garcia-Diaz DF, Stachowska E, González-Muniesa P. Molecular Basis of the Inflammation Related to Obesity. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:1–2.

Cuevas-Ramos D, Mehta R, Aguilar-Salinas CA. Fibroblast Growth Factor 21 and Browning of White Adipose Tissue. Front Physiol 2019;10:1-9.

Cullinan SB, Diehl JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:317–32.

de Almeida DL, Fabrício GS, Trombini AB, Pavanello A, Tófolo LP, da Silva Ribeiro TA, *et al*. Early Overfeed-Induced Obesity Leads to Brown Adipose Tissue Hypoactivity in Rats. Cell Physiol Biochem 2013;32:1621–30.

Engin A. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. In: Engin AB, Engin A, editors. Obes. Lipotoxicity, vol. 960, Cham: Springer International Publishing; 2017b, p. 135–60.

Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. In: Engin AB, Engin A, editors. Obes. Lipotoxicity, vol. 960, Cham: Springer International Publishing; 2017a, p. 1–17.

Eskelinen E-L. Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. Int J Biochem Cell Biol 2019;111:1–10.

Fan L, Lindsley SR, Comstock SM, Takahashi DL, Evans AE, He GW, *et al*. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. Int J Obes 2013; 37:254–262.

Fang D, Wan Y, Shen W, Cao J, Sun Z, Yu H, *et al*. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. Mol Cell Biochem 2013;381:127–37.

Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. In: Pollock DM, editor. Compr. Physiol., Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2018, p. 1031–63.

Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in Adipose Tissue Physiology and Pathophysiology. Antioxid Redox Signal 2018;2018:1-15.

Fisher F. M, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, *et al*. FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. Genes Dev 2012;26:271–81.

Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21. Annu Rev Physiol 2016;78:223–41.

Franco JG, Fernandes TP, Rocha CPD, Calviño C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, *et al*. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning: Maternal high fat diet programmes adrenal and thyroid function. J Physiol 2012;590:5503–18.

Franco JG, Fernandes TP, Rocha CPD, Calviño C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, *et al*. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning: Maternal high fat diet programmes adrenal and thyroid function. J Physiol 2012; 590:5503–5518.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol 2010;316:129–39.

Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. EMBO J 2017;36:1811–36.

Ghemrawi R, Battaglia-Hsu S-F, Arnold C. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. Cells 2018;7:1-35.

Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. Obes Facts 2017;10:207–15.

Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther 2019;Volume 12:191–8.

Guo K-Y, Halo P, Leibel RL, Zhang Y. Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol 2004;287:112–9.

Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. J Nutr 2013;143:553–62.

Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. Nat Cell Biol 2015;17:829–38.

Hlebowicz J, Darwiche G, Björgell O, Almér L-O. Effect of cinnamon on postprandial blood glucose, gastric emptying, and satiety in healthy subjects1. Am J Clin Nutr 2007;85:1552–6.

Holtrup B, Church CD, Berry R, Colman L, Jeffery E, Bober J, *et al*. Puberty is an important developmental period for the establishment of adipose tissue mass and metabolic homeostasis. Adipocyte 2017;6:224–33.

Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, *et al*. Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue. J Biol Chem 2011;286:12983–90.

Huang W, Dedousis N, O'Doherty RM. Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. J Appl Physiol 2007;102:2260–5.

Ji C, Dai Y, Jiang W, Liu J, Hou M, Wang J, *et al*. Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats. J Nutr Biochem 2014;25:1108–16.

Jiang J, Emont MP, Jun H, Qiao X, Liao J, Kim D, *et al*. Cinnamaldehyde induces fat cell-autonomous thermogenesis and metabolic reprogramming. Metabolism 2017;77:58–64.

Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, *et al*. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress–induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. J Clin Invest 2009;119:1201–15.

Kaur N, Gupta P, Saini V, Sherawat S, Gupta S, Dua A, *et al*. Cinnamaldehyde regulates H_2O_2-induced skeletal muscle atrophy by ameliorating the proteolytic and antioxidant defense systems.J Cell Physiol 2019;234:6194–208.

Kayser BD, Goran MI, Bouret SG. Perinatal Overnutrition Exacerbates Adipose Tissue Inflammation Caused by High-Fat Feeding in C57BL/6J Mice. PLOS ONE 2015;10:1-15.

Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. Cinnamon Improves Glucose and Lipids of People With Type 2 Diabetes. Diabetes Care 2003;26:3215–8.

Khare, Jagtap, Jain, Baboota, Mangal, Boparai, *et al*. Cinnamaldehyde supplementation prevents fasting-induced hyperphagia, lipid accumulation, and inflammation in high-fat diet-fed mice. BioFactors 2016;42:201–11.

Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. J Clin Invest 1979;63:239–46.

Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:248–61.

Kwan HY, Wu J, Su T, Chao X-J, Liu B, Fu X, *et al*. Cinnamon induces browning in subcutaneous adipocytes. Sci Rep 2017;7:1-12.

Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. BioMed Res Int 2014;2014:1–13.

Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPARγ and the global map of adipogenesis and beyond. Trends Endocrinol Metab 2014; 25(6):293-302.

Lemecha M, Morino K, Imamura T, Iwasaki H, Ohashi N, Ida S, *et al*. MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1-α signalling in beige adipocytes. Sci Rep 2018;8:1-14.

Lemonnier D. Effect of age, sex, and site on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. J Clin Invest 1972;51:2907–15.

Li J, Futawaka K, Yamamoto H, Kasahara M, Tagami T, Liu T, *et al*. Cinnamaldehyde Contributes to Insulin Sensitivity by Activating PPARδ, PPARγ, and RXR. Am J Chin Med. 2015;43:879-92

Li J, Liu T, Wang L, Guo X, Xu T, Wu L, *et al*. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic action of cinnamaldehyde in C57blks/j Db/db mice. J Tradit Chin Med 2012;32:446–52.

Liu Z, Lim CY, Su MY-F, Soh SLY, Shui G, Wenk MR, *et al*. Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations. J Endocrinol 2013;219:131–43.

Lopes BP, Gaique TG, Souza LL, Paula GSM, Kluck GEG, Atella GC, *et al*. Cinnamon extract improves the body composition and attenuates lipogenic processes in the liver and adipose tissue of rats. Food Funct 2015;6:3257–65.

López-Lluch G. Mitochondrial activity and dynamics changes regarding metabolism in ageing and obesity. Mech Ageing Dev 2017;162:108–21.

Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. J Endocrinol 2016;231:77–99.

Magnuson AM, Fouts JK, Regan DP, Booth AD, Dow SW, Foster MT. Adipose tissue extrinsic factor: Obesity-induced inflammation and the role of the visceral lymph node. Physiol Behav 2018;190:71–81.

Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image Analysis and Quantitative Morphology. In: Hewitson TD, Darby IA, editors. Histol. Protoc., vol. 611, Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 211–25.

Mann A, Thompson A, Robbins N, Blomkalns AL. Localization, Identification, and Excision of Murine Adipose Depots. J Vis Exp 2014;94:1-7.

Mashek DG. Hepatic Fatty Acid Trafficking: Multiple Forks in the Road. Adv Nutr 2013;4:697–710.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids 2015;1851:503–18.

Meng M, Geng S, Du Z, Yao J, Zheng Y, li, *et al*. Berberine and cinnamaldehyde together prevent lung carcinogenesis. Oncotarget 2017;8:76385–97.

Merlin J, Sato M, Nowell C, Pakzad M, Fahey R, Gao J, *et al*. The PPARγ agonist rosiglitazone promotes the induction of brite adipocytes, increasing β-adrenoceptor-mediated mitochondrial function and glucose uptake. Cell Signal 2018;42:54–66.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 2010;140:313–26.

Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. Cinnamon effects on metabolic syndrome: a review based on its mechanisms. Iran J Basic Med Sci 2016;19:1258-1270.

Montanari T, Pošćić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review: Factors involved in WAT browning. Obes Rev 2017;18:495–513.

Moura EG, Passos MCF. Neonatal Programming of Body Weight Regulation and Energetic Metabolism. Biosci Rep 2005;25:251–69.

NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet 2017; 390:2627–42.

Nsiah-Sefaa A, McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β-oxidation in mitochondrial disease. Biosci Rep 2016;36:1-19.

Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2α Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. Cell Metab 2008;7:520–32.

Palou M, Konieczna J, Torrens JM, Sánchez J, Priego T, Fernandes ML, *et al*. Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. J Nutr Biochem 2012; *23*:1627–1639.
Passos E, Ascensão A, Martins MJ, Magalhães J. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. Metabolism 2015;64:780–92.

Paul A. Adipose tissue heterogeneity: Development and Application of Nonlinear Microscopy Methods. Thesis, Sweden 2018.

Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. Front Neuroendocrinol 2018;49:72–85.

Pinney SE, Simmons RA. Metabolic Programming, Epigenetics, and Gestational Diabetes Mellitus. Curr Diab Rep 2012;12:67–74.

Poher A-L, Altirriba J, Veyrat-Durebex C, Rohner-Jeanrenaud F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. Front Physiol 2015;6:1-9.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1α (PGC-1α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. Endocr Rev 2003;24:78–90.

Ranasinghe P, Jayawardana R, Galappaththy P, Constantine GR, de Vas Gunawardana N, Katulanda P. Efficacy and safety of 'true' cinnamon **(** *Cinnamomum zeylanicum* **)** as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis: Efficacy and safety of 'true' cinnamon in diabetes. Diabet Med 2012;29:1480–92.

Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GS, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (Cinnamomum zeylanicum): a systematic review. BMC Complement Altern Med 2013;13:1-10.

Rodrigues A. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. Journal of Endocrinology 2007;195:485–494.

Rui L. Energy Metabolism in the Liver. Compr Physiol 2014;4:177–97.

Schneider M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. Cell Tissue Res 2013;354:99–106.

Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. Trends Biochem Sci 2015;40:141–8.

Sheng X, Zhang Y, Gong Z, Huang C, Zang YQ. Improved Insulin Resistance and Lipid Metabolism by Cinnamon Extract through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. PPAR Res 2008;2008:1–9.

Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. Curr Obes Rep 2015;4:224–9.

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, *et al*. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature 2009;458:1131–5.

Song Z, Xiaoli A, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. Nutrients 2018;10:1-22.

Sonoda J, Chen MZ, Baruch A. FGF21-receptor agonists: an emerging therapeutic class for obesity-related diseases. Horm Mol Biol Clin Investig 2017;30:1-13.

Souza AFP, Souza LL, Oliveira LS, Cordeiro A, Souza E, Kluck GEG, *et al*. Fish oil supplementation during adolescence attenuates metabolic programming of perinatal maternal high-fat diet in adult offspring. Br J Nutr 2019; 121(12):1345-1356.
Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, *et al*. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. J Clin Invest 2013;123:215–23.

Stefanidis A, Spencer SJ. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. PLoS ONE 2012;7:1-10.

Subash Babu P, Prabuseenivasan S, Ignacimuthu S. Cinnamaldehyde—A potential antidiabetic agent. Phytomedicine 2007;14:15–22.

Sun R-Q, Wang H, Zeng X-Y, Chan SMH, Li S-P, Jo E, *et al*. IRE1 impairs insulin signaling transduction of fructose-fed mice via JNK independent of excess lipid. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis 2015;1852:156–65.

Tamura Y, Iwasaki Y, Narukawa M, Watanabe T. Ingestion of Cinnamaldehyde, a TRPA1 Agonist, Reduces Visceral Fats in Mice Fed a High-Fat and High-Sucrose Diet. J Nutr Sci Vitaminol 2012;58:9–13.

van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. Physiol Behav 2008;94:231–41.

Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. Metabolism 2018;92:71-81.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight 2016. Acessado em 05 de fevereiro de 2020 (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight).

Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS, *et al*. Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. Endocrinology 2007;148:4150–9.

Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. Diabetes 2009;58:250–9.

Yang F, Dai Y, Min C, Li X. Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. Nutr Metab 2018;15:1-10.

Yazdanpanah Z, Azadi-Yazdi M, Hooshmandi H, Ramezani-Jolfaie N, Salehi-Abargouei A. Effects of cinnamon supplementation on body weight and composition in adults: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. Phytother Res 2019:2019:1-16.

Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, *et al*. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. J Hepatol 2019;71:793–801.

Yu X-H, Zhang D-W, Zheng X-L, Tang C-K. Cholesterol transport system: An integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis. Prog Lipid Res 2019;73:65–91.

Zhang Z, Yao Z, Chen Y, Qian L, Jiang S, Zhou J, *et al*. Lipophagy and liver disease: New perspectives to better understanding and therapy. Biomed Pharmacother 2018;97:339–48.

Zhang Z, Zhang L, Zhou L, Lei Y, Zhang Y, Huang C. Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress. Redox Biol 2019;25: 339–348.

Zhao H, Yang Q, Xie Y, Sun J, Tu H, Cao W, *et al*. Simultaneous determination of cinnamaldehyde and its metabolite in rat tissues by gas chromatography-mass spectrometry: Cinnamaldehyde and its inter-convert metabolite tissue distribution. Biomed Chromatogr 2015;29:182–7.

Zhao H, Zhang M, Zhou F, Cao W, Bi L, Xie Y, *et al.* Cinnamaldehyde ameliorates LPS-induced cardiac dysfunction via TLR4-NOX4 pathway: The regulation of autophagy and ROS production. J Mol Cell Cardiol 2016;101:11–24.

Zhu R, Liu H, Liu C, Wang L, Ma R, Chen B, *et al*. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. Pharmacol Res 2017;122:78–89.

Zuo J, Zhao D, Yu N, Fang X, Mu Q, Ma Y, *et al*. Cinnamaldehyde Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice by Inducing Browning of White Adipose Tissue. Cell Physiol Biochem 2017;42:1514–25.