



**MOISÉS SILVESTRE DE AZEVEDO MARTINS**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CUMARINA (*4-metildinafetina*) E ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EM CAMUNDONGOS**

**LAVRAS-MG**

**2020**

**MOISÉS SILVESTRE DE AZEVEDO MARTINS**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CUMARINA (*4-metildinafetina*) E  
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO ADIPOSEO  
BRANCO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Moisés Silvestre de Azevedo.

Influenciada Suplementação com Cumarina (*4-metildinafetina*)  
e Atividade Física Voluntária sobre o *Browning* do Tecido Adiposo  
Branco em Camundongos / Moisés Silvestre de Azevedo Martins. -  
2020.

63 p. : il.

Orientador(a): Rodrigo Ferreira de Moura.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Atividade física voluntária. 2. Tecido adiposo. 3. 4-  
metildinafetina. I. Moura, Rodrigo Ferreira de. II. Título.

**MOISÉS SILVESTRE DE AZEVEDO MARTINS**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CUMARINA (*4-metildinafetina*) E  
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO ADIPOSE  
BRANCO EM CAMUNDONGOS**

**INFLUENCE OF CUMARINE (*4-methyldinafetin*) SUPPLEMENTATION AND  
VOLUNTARY PHYSICAL ACTIVITY ON WHITE ADIPOSE FABRIC BROWNING IN  
MICE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 11 de Fevereiro de 2020

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura (UFLA)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rafael Neodini Remédio (UFLA)

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Grazielle Caroline da Silva (UNILAVRAS)

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2020**

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre comigo em toda minha trajetória acadêmica e vida, e por me conceder a oportunidade de realizar o tão sonhado mestrado.

A Universidade Federal de Lavras, que para mim é mais que uma universidade, uma verdadeira casa.

A minha mãe Ligia Maria de Azevedo, que sempre esteve comigo em todos os momentos, não só acadêmico, mas na vida, me apoiando e me colocando para frente. Lembro da frase dela e o mestrado Moisés como esta?

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Ferreira de Moura que sempre esteve pronto a me ajudar e me apoiar, não apenas em atividades do mestrado, mas em minhas necessidades acadêmicas em geral.

Aos professores integrantes das bancas de qualificação e defesa pela generosidade em doar tempo e conhecimento para a construção desta dissertação.

Agradeço as pessoas que contribuíram para a viabilidade deste projeto em diferentes momentos: William, Isaac, Nayara e Murgas (DMV), Ana Elisa (estudante de medicina), Laura e Brenda (DNU), Dirceu (técnico administrativo), Departamento de Fisiologia Vegetal, Departamento de Educação Física, Departamento de Medicina Veterinária e demais pessoas que a memória não colabora.

A turma PPGDSA 2018/1 e agregados.

Aos animais que involuntariamente doam suas vidas à pesquisa.

Aos meus irmãos Danilo e Juliano por todo apoio.

A minha namorada, aos meus amigos e todos que me apoiaram nesta trajetória.

E aos professores que passaram na minha vida vocês foram essências para que eu chegasse até aqui.

**MUITO OBRIGADO!**

“Não há saber mais ou saber menos. Há saberes diferentes.”  
Paulo Freire

## RESUMO

O *browning* é conhecido como a capacidade do tecido adiposo branco (WAT) apresentar um fenótipo semelhante a gordura marrom quando estimulado, levando ao aumento da termogênese. O estudo tem por objetivo verificar se a suplementação com cumarina (4-*metildinafetina*) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo de camundongos e analisar a presença de esteatose hepática. Foram utilizados 32 camundongos (C57BL6) machos, com cerca de 8 semanas, mantidos em ciclo claro/escuro de 12-12 horas, em gaiolas com ou sem rodas de atividade livre. Foi feita aclimatação por um período de 7 dias e logo após, os animais foram separados em quatro grupos (n:8): atividade física voluntária com administração de cumarina (AFC), atividade física voluntária veículo (AFV), sedentário com administração de cumarina (SC) e sedentário veículo (SV). Os animais receberam uma concentração de 30 mg/kg/animal de 4-Metildafenetina para os grupos AFC e SC, e salina 0,9%; Carboximetilcelulose (CMC) 0,3%; e Tween 1% com a mesma dose para os grupos AFV e SV durante 28 dias, através de gavagem. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e realizada a extração e armazenamento do fígado e tecidos adiposos das regiões inguinal, epididimal e interescapular. Posteriormente, foram realizadas análises do tempo de corrida em roda e histológicas com coloração de hematoxilina e eosina e ácido periódico- *schiff*. Para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi utilizado os testes de *Shapiro-Wilk e Levene*. Para as comparações entre os grupos foi adotado os testes de *ANOVA one-way e two-way e teste t de student* para amostras independentes. Para todos os dados foi adotado um nível de significância de  $p < 0,05$ . Não obtivemos diferenças significativas entre o número de voltas. Para o tecido adiposo inguinal tanto no grupo sedentário quanto no grupo atividade física os animais que receberam a 4-metildinafetina tiveram uma maior área, o mesmo aconteceu para o tecido adiposo epididimal com a diferença que a atividade física teve um efeito protetor em relação a 4-metildinafetina. Conclui-se que a cumarina 4-metildinafetina não gerou *browning*, não alterou o volume de atividade física voluntária e nem provocou esteatose hepática. Entretanto, com excessão do grupo AFC do tecido adiposo epididimal, a ingestão dessa cumarina por 4 semanas provoca um aumento do adipócito no tecido adiposo branco epididimal e inguinal de camundongos C57BL/6.

**Palavras-chave:** Tecido adiposo. Suplementação. Tecido Adiposo Marrom. Atividade física.

## ABSTRACT

Browning is known as the ability of white adipose tissue (WAT) to present a phenotype similar to brown fat when stimulated, leading to an increase in thermogenesis. The study aims to verify whether supplementation with coumarin (4-methylphenethylamine) in association with voluntary physical activity, has the effect of inducing browning in the adipose tissue of mice and analyzing the presence of hepatic steatosis. 32 male mice (C57BL/6) were used, with about 8 weeks, kept in light / dark cycle of 12-12 hours, in cages with or without free activity wheels. The animals were acclimatized for a period of 7 days and immediately afterwards, the animals were separated into four groups (n: 8): voluntary physical activity with coumarin administration (AFC), voluntary physical activity vehicle (AFV), sedentary with coumarin administration (SC) and sedentary vehicle (SV). The animals received a concentration of 30 mg / kg / animal of 4-Methylphenethylamine for the AFC and SC groups, and 0.9% saline; Carboxymethylcellulose (CMC) 0.3%; and Tween 1% with the same dose for the AFV and SV groups for 28 days, via gavage. At the end of the experiment the animals were euthanized and the liver and adipose tissues were extracted and stored in the inguinal, epididymal and interscapular regions. Subsequently, running time and histological analyzes were performed with hematoxylin and eosin and periodic acid-schiff staining. To verify data normality and homogeneity of variances, the Shapiro-Wilk and Levene tests were used. For comparisons between groups, one-way and two-way ANOVA tests and Student's t test for independent samples were adopted. For all data, a significance level of  $p < 0.05$  was adopted. We did not obtain any significant differences between the number of laps. For the inguinal adipose tissue in both the sedentary group and the physical activity group, the animals that received 4-methylphenethylamine had a larger area, the same happened for the epididymal adipose tissue with the difference that physical activity had a protective effect in relation to 4-methylphenethylamine. It was concluded that coumarin 4-methylphenethylamine did not generate browning, did not alter the volume of voluntary physical activity and did not cause hepatic steatosis. However, with the exception of the AFC group of epididymal adipose tissue, ingestion of this coumarin for 4 weeks causes an increase in adipocyte in the epididymal and inguinal white adipose tissue of C57BL / 6 mice.

**Keywords:** Adipose tissue; Supplementation; Brown adipose tissue; Physical activity.



## LISTA DE ABREVIATURAS

°C- Graus celsius

µg- micrograma

µm- Micrometro

7-HC- 7-hidroxycumarina  
ATV- atividade física voluntaria

AFC- atividade física voluntaria com administração de cumarina

AFV- atividade física voluntaria veiculo

ATE-Atividade Física Espontânea

ATF2- fator de transcrição de ativação 2

ATV- Atividade Física Voluntária

BAT- Tecido Adiposo marrom

BMP- proteínas morfogênicas ósseas

CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

cDNA- Ácido Desoxirribonucleico complementar

CPFM- Córtex pré-frontal medial

D1- Receptor de dopamina D1

EBF2- Fator 2 de célula B precoce

GA- Geneticamente alterados

HFD- Dieta rica em gordura

iBAT- tecido adiposo marrom intraescapular

Kg- Quilogramas

mA- Miliampère

mg- miligrama

min- minutos

ML- Metabolismo dos Lipídios

mM- milímetro

mmol- Milimol

p38 MAPK- Proteína kinases ativadas por mitógeno

PCR- Reação em Cadeia da polimerase

PH- Potencial Hidrogeniônico

PMSF- fenil metano sulfonil fluoreto

P-TSA- p-toulenesulfonico

RNAM- Ácido ribonucleico mensageiro

SC- Sedentário com administração de cumarina

SV- Sedentário veículo

UFLA- Universidade Federal de Lavras

UMB- Umbeliferona

v- volts

WAT - Tecido adiposo branco

$\beta$ -3AR- O receptor beta-3 adrenérgico

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	12
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVO.....	13
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	13
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	13
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>3.1 Diferenças entre os tecidos adiposos</b> .....	14
<b>3.2 <i>Browning</i> do tecido adiposo</b> .....	17
<b>3.3 Marcadores da termogênese</b> .....	23
<b>3.4 Cumarinas</b> .....	24
<b>3.4.1 Efeito das Cumarinas sobre o Metabolismo de Lipídios</b> .....	26
<b>3.5 Atividade Física Voluntária (ATV)</b> .....	27
4. CONCLUSÃO .....	28
REFERÊNCIAS .....	29
SEGUNDA PARTE .....	38
1 ARTIGO.....	38
2 INTRODUÇÃO .....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
<b>3.1 Amostra</b> .....	43
<b>3.2 Síntese da Cumarina 4-Metildafenetina</b> .....	43
<b>3.3 Desenho experimental</b> .....	44
<b>3.4 Administração da Cumarina/Salina</b> .....	45
<b>3.5 Roda de atividade física Voluntária</b> .....	45
<b>3.6 Glicose sanguínea</b> .....	46
<b>3.7 Eutanásia e Extração dos tecidos adiposos</b> .....	46
<b>3.8 Análise Histológica</b> .....	46
<b>3.9 Análise estatística</b> .....	47
4 RESULTADOS.....	47
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO .....	58
REFERÊNCIAS .....	59

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Em camundongos existem três tipos de tecidos adiposos onde cada um é responsável por desenvolver uma função dentro do organismo. O tecido adiposo branco (WAT) é responsável basicamente por manter um estoque energético (NADAL et al., 2017). O tecido adiposo marrom (BAT) é responsável por manter a estabilidade térmica através da termogênese adaptativa (CAROBBIO et al., 2019) e o tecido adiposo bege, que é um tipo de tecido que têm características tanto do WAT quanto do BAT, ou seja, ele atua tanto na termogênese adaptativa quanto como estoque energético, com isso ele tem sido alvo de vários estudos (JUNIOR, 2018; CAROBBIO et al., 2019; HARMS; SEALE, 2013).

O tecido adiposo bege tem sido alvo de vários estudos, devido a um fenômeno chamado *Browning*, que é a capacidade do WAT apresentar um fenótipo semelhante a gordura marrom quando estimulado, levando ao aumento do número de mitocôndrias e consequente elevação do gasto energético e da termogênese, ou seja, transformar-se em tecido adiposo bege (CAROBBIO et al., 2019; BARGUT et al., 2017; WU et al., 2012). Este fenômeno é mais provável que ocorra em depósitos de gordura subcutânea (CAROBBIO et al., 2019; BARGUT et al., 2017).

A expressão da Proteína desacopladora 1 (UCP1) e domínio PR contendo a proteína 16 (PRDM16) é utilizada para identificar a presença de adipócitos bege em WAT. Dentre os estímulos capazes de induzir o *Browning* já foram descritos em animais, estímulos adrenérgicos, baixas temperaturas ambientais e principalmente a atividade física (DE JONG et al., 2015; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

A atividade física voluntária (ATV) ou discricionária é definida como uma atividade que não é intimamente necessária para sobrevivência ou para a manutenção da homeostase, e que não sofre influência de fatores externos (GARLAND et al., 2011). A mesma pode ser medida em roedores por meio de uma roda livre de atividade física voluntária (GARLAND et al., 2011).

Em situação de laboratório a motivação para tal atividade pode estar relacionada ao traço de personalidade (JÓNÁS et al., 2010), pois corridas em roda são altamente recompensadoras (SHERWIN, 1998) e viciantes para roedores (BRENÉ et al., 2007; DE CHIARA et al., 2010; KANAREK et al., 2010).

A atividade física tem um papel importante diminuindo/prevenindo fatores como resistência à insulina, pressão arterial e frequência cardíaca (RATTANAVICHIT et al., 2018;

WALDMAN et al., 2017). Quanto a redução da gordura corporal já é sabido que a ATV diminui a mesma (NEHRENBURG et al., 2009; SWALLOW et al., 2001), mas quando comparamos a frequência da atividade, entre roedores que são geneticamente alterados (GA) para apresentar uma maior ATV com não alterados, vemos que em ambos há diminuição da massa adiposa, mas apesar da maior atividade de roda dos GA, eles demonstraram uma menor diminuição de massa adiposa. Isso sugere que esses animais apresentam uma maior capacidade de conservar massa adiposa diante do desafio energético (HIRAMATSU; GARLAND, 2018).

As cumarinas são benzopironas que podem ter sua origem natural ou sintética (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014), podendo ser classificada como não condensadas, furocumarinas, cumarinas diméricas, cumarinas C-preniladas, piranocumarinas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). Na atualidade temos uma grande variedade de análogos cumarínicos, que constituem uma classe de substâncias encontradas em várias plantas, mais de 1300 foram encontrados como metabólitos das mesmas e também de bactérias e fungos (BOURGAUD et al., 2006; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; HOULT; PAYÁ, 1996).

Em animais e humanos suplementados com dietas ricas em gorduras associadas a diabetes, obesidade e esteatose hepática, foi visto que a cumarina diminui os lipídios séricos, estoques de triglicerídeos, ácidos graxos e tamanho de células adiposas (NAOWABOOT et al., 2015; NUKITRANGSAN et al., 2012; UM et al., 2013). Assim demonstrando que a cumarina tem um papel importante no metabolismo lipídico e pode ser um possível estímulo a provocar *browning* do WAT (BARGUT et al., 2017).

Diante do exposto o estudo tem como objetivo avaliar se a suplementação com cumarina (4-metildinafetina) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo branco da região inguinal e epididimal de camundongos.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar se a suplementação com cumarina (4-metildinafetina) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo de camundongos e analisar a presença de esteatose hepática.

### **2.2 Objetivos específicos**

- (1) Avaliar a media das massas dos grupos entre o 1° e 28° dia;

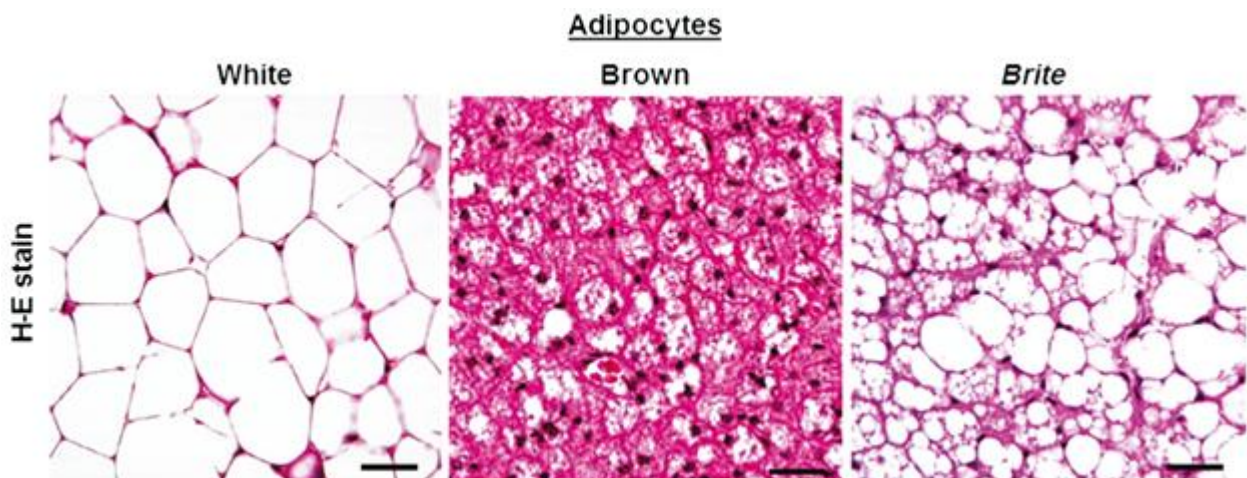
- (2) Avaliar a glicemia entre os grupos;
- (3) Avaliar o número total de voltas na roda de atividade física voluntária por ciclo, entre os grupos atividade física;
- (4) Avaliar o número total de voltas na roda de atividade física voluntária entre os grupos atividade física;
- (5) Avaliar área dos adipócitos da região inguinal e epididimal entre os grupos;
- (6) Avaliar a densidade dos adipócitos da região interescapular entre os grupos;
- (7) Analisar a presença de esteatose hepática entre grupos;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Diferenças entre os tecidos adiposos

Em camundongos há três tipos de tecidos adiposos (fig. 3) o WAT- *White adipose tissue* ou tecido adiposo branco, BAT- *Brown adipose tissue* ou tecido adiposo marrom e o Bege/*Brite* tecido adiposo bege (WIEDMANN; STEFANIDIS; OLDIFIELD, 2018).

Figura 3. Tipos de Tecidos Adiposos



Os adipócitos brancos possuem grandes gotas lipídicas, circundados por pequeno citoplasma e núcleo descentralizado. Os adipócitos marrons (Brown) possuem pequenas e multiplas gotas lipídicas e um núcleo centralizado circundado por um citoplasma claro. Os adipócitos bege (Brite) localizam-se no tecido adiposo branco que sob certos estímulos adquirem um fenótipo

parecido com gordura marrom (tecidos de camundongos C57BL/6: microscopia de luz com hematoxilina e eosina). Mesma ampliação, calibração de barra = 50  $\mu$ m (BARGUT et al., 2017).

Fonte: Bargut et al., (2017)

O WAT anatomicamente está presente em várias partes do animal, principalmente em região subcutânea abdominal e glúteo femoral que armazenam mais de 80% da gordura corporal total (GUGLIELMI; SBRACCIA, 2018; DE JONG et al., 2015).

A função do WAT é basicamente atuar como um órgão de estoque energético (NADAL et al., 2017), acumulando energia em forma de triglicérides, com o objetivo de formar uma reserva energética, que possa liberar uma gama de ácidos graxos para serem utilizados como substrato energético em condições de jejum (TRAYHUR; BEATTIE, 2001) e rapidamente ser mobilizado para suprir as demandas funcionais de órgãos não adiposos (CAROBBIO et al., 2019). Ele também exerce um papel regulador mediado pela secreção de leptina, resistina e adiponectina com intuito de regular a homeostase energética (PIERCE; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2014; GUGLIELMI; SBRACCIA, 2018; CAROBBIO et al., 2019) e atuam como uma barreira protetora contra o estresse mecânico externo, processos inflamatórios dérmicos e dispersão de calor (GUGLIELMI; SBRACCIA, 2018).

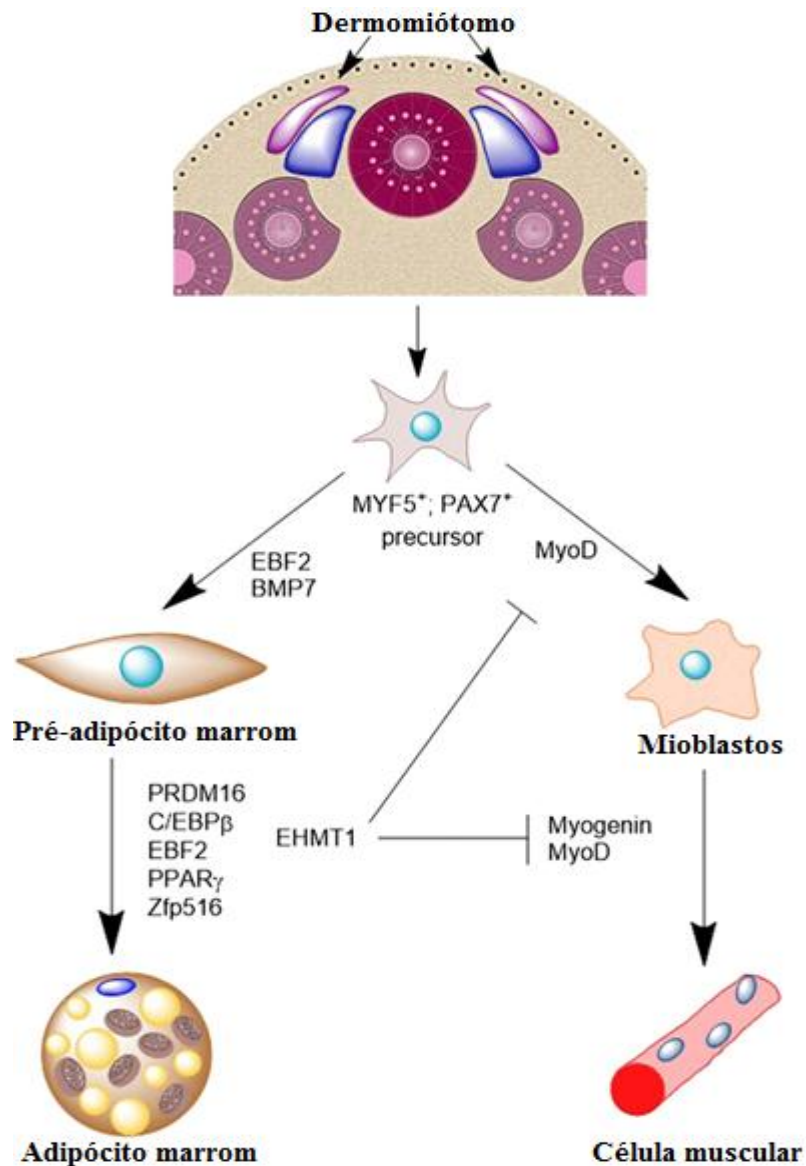
Morfologicamente ele é formado por uma única gotícula lipídica (unilocular), tem baixa quantidade de mitocôndria e baixo conteúdo citoplasmático (De PAUW et al., 2009; CAROBBIO et al., 2019).

O BAT tem uma cor amarelo-marrom devido a sua grande quantidade de mitocôndrias (VARGAS-CASTILLO et al., 2017), é classificado morfologicamente como multilocular ou seja enriquecido com pequenas gotículas lipídicas (CAROBBIO et al., 2019). Ele está presente em algumas partes do animal como a região cervical, perirenal, mediastinal, peri-aortica e interescapular que é definida como clássica para o estudo do referido tecido (DE JONG et al., 2015).

Ele é derivado de uma população de células localizada no dermomiótomo da camada mesodérmica, que realiza a expressão do fator miogênico cinco (MYF5+) e a caixa pareada 7 (PAX7+). Essas células têm a capacidade de se diferenciar e dar origem a células musculares ou a células do BAT. O destino de se formar o *BAT* é impulsionada por fatores de transcrição

específicos, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ), histona lisina metiltransferase 1 (EHMT1), domínio PR contendo 16 (PRDM16), fator B de células B primárias (EBF2) Proteína de dedo de zinco 516 (ZFP516) e CCAAT / proteína beta de ligação (C / EBP $\beta$ ) (INAGAKI; SAKAI; KAJIMURA, 2016; WANG; SEALE, 2017; VARGAS-CASTILLO et al., 2017) (Figura 4).

Figura 4. Formação do BAT



Diferenciação do tecido adiposo marrom clássico. Os adipócitos marrons surgem durante a fase pré-natal a partir das células localizadas no dermomiótomo que expressam MYF5 + e PAX7 + (VARGAS-CASTILLO et al., 2017).



Fonte: Vargas-Castillo et al., (2017)

O BAT tem a função de contribuir para estabilidade térmica através da termogênese adaptativa ou seja promovendo gasto energético (NADAL et al., 2017; DEMPERSMIER; SUL, 2015). Que se dá através da transformação de energia química em térmica durante os processos metabólicos (ROLFE, 1997), graças a proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1) para desacoplar a oxidação do substrato da produção de ATP (CAROBBIO et al., 2019).

Suas mitocôndrias são diferentes dos outros tecidos, ao invés de sintetizar o ATP, ela dispara o potencial de membrana acumulado na cadeia transportadora de elétrons na forma de calor resultando em um aumento do gasto energético (JUNIOR, 2018).

E por fim temos o tecido adiposo bege que tem características tanto do BAT quanto do WAT, ou seja, ele funciona tanto na termogênese adaptativa expressando UCP1, quanto no estoque de lipídios (JUNIOR, 2018; CAROBBIO et al., 2019; HARMS; SEALE, 2013). Porém quando não são estimulados as características do WAT sobressaem exibindo respiração desacoplada limitada e consumo de oxigênio in vitro, já quando estimuladas como durante a atividade física ou exposição ao frio (DEMPERSMIER; SUL, 2015), aumentam a resposta termogênica, com maior indutibilidade da expressão da UCP1 e respiração proporcionalmente desacoplada quando comparados às células marrons canônicas (CAROBBIO et al., 2019). Sua distribuição é mais disseminada do que a forma constitutiva da gordura marrom clássica (WIEDMANN; STEFANIDIS; OLDIFIELD, 2018) e são encontrados em meio ao WAT nas regiões interescapular e inguinal (DE JONG et al., 2015).

### **3.2 *Browning* do tecido adiposo**

O fenômeno *Browning*, *britening* ou *beiging* é conhecido como a capacidade do WAT apresentar um fenótipo semelhante a gordura marrom quando estimulado, levando ao aumento da termogênese, devido a expressão de UCP1 (VARGAS-CASTILLO et al., 2017; SHABALINA et al., 2013), e PRDM16 que atua como um fator de regulação que se liga ao PGC1- $\alpha$  ou ao PPAR $\gamma$  (VARGAS-CASTILLO et al., 2017), assim mantendo o fenótipo do adipócito bege (HARMS et al., 2014). Ele é mais provável de ocorrer em depósitos de gordura subcutânea (CAROBBIO et

al., 2019; BARGUT et al., 2017; WU et al., 2012), pois os adipócitos subcutâneos são menores e tem um potencial maior para diferenciação (BARGUT et al., 2017).

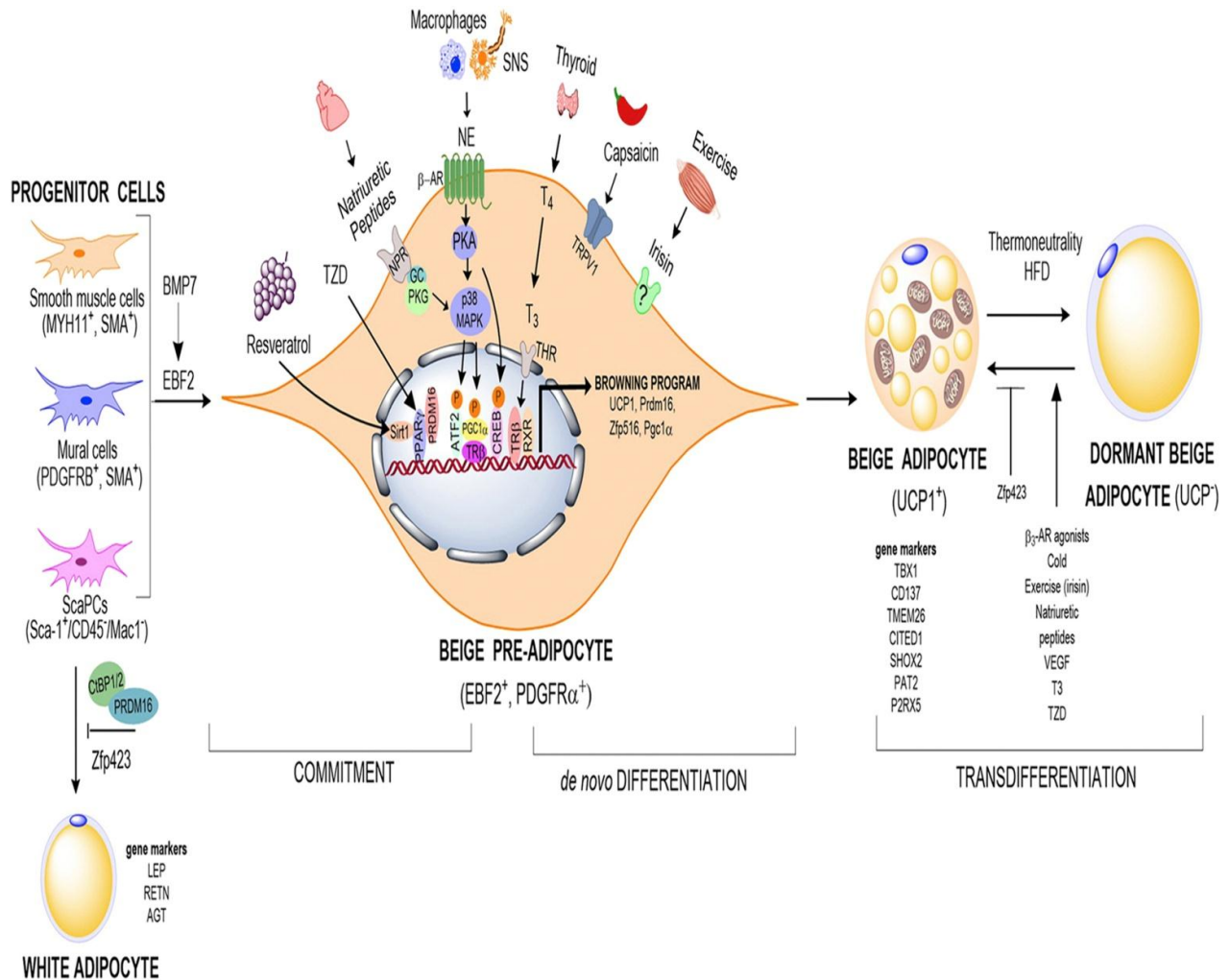
Há basicamente duas hipóteses de diferenciação de células progenitoras residentes e transdiferenciação (células maduras). A primeira começa com o comprometimento das células progenitoras em fenótipo de pré- adipócito bege. Temos descritos três tipos de células progenitoras que contem marcadores específicos, células da musculatura lisa (MYH11 +, SMA +), células progenitoras Sca-1 + (ScaPCs, Sca-1 + / CD45- / Mac1-) e células mural (PDGFR $\beta$  +, SMA +) (LONG et al., 2014; VISHVANATH et al., 2016; SCHULZ et al., 2011) (figura 5).

A estimulação adipogênica desencadeia BMP7 e EBF2 (fig. 5), que são fatores críticos para o comprometimento das células progenitoras em pré-adipócitos bege. Diversos estímulos desencadeiam o *browning* como o frio, compostos nutricionais, fármacos e etc (VARGAS-CASTILLO et al., 2017).

Como resultado dos estímulos, a maquinaria transcricional do *browning* ativa a expressão de genes chave característicos da termogênese como UCP1, PRDM16 E ZFP516 (VARGAS-CASTILLO et al., 2017), além disso a PGC1 $\alpha$ , que está envolvida na biogênese mitocondrial que será mais bem descrito abaixo, levando a um fenótipo bege (VARGAS-CASTILLO et al., 2017; BARGUT et al., 2017) (figura 5).

A segunda hipótese, propõe que células maduras são as produtoras de *browning*, isto foi comprovado com a observação de que no frio se ganha um fenótipo bege, mas após cinco semanas de adaptação ao ambiente quente este fenótipo é revertido (VARGAS-CASTILLO et al., 2017). Essas células são denominadas adipócitos de "células adormecidas", e quando elas estão ativadas, elas são "desmascaradas" novamente em um fenótipo bege (KAJIMURA; SPIEGELMAN; SEALE, 2015; VARGAS-CASTILLO et al., 2017) (figura 5).

Figura 5. Diferenciação do adipócito bege



Duas hipóteses de diferenciação do adipócito bege (VARGAS-CASTILLO et al., 2017).

Fonte: Vargas-Castillo et al., (2017)

A UCP1 é a proteína que realiza a termogênese (SHABALINA et al., 2013), e o PRDM16 é o gene responsável pela manutenção do fenótipo do adipócito bege. Mesmo o PRDM16 sendo um gene comum do BAT e os adipócitos marrons podem realizar a termogênese com baixa expressão do mesmo, se os adipócitos bege ficarem com baixa expressão de PRDM16 eles podem se transformar novamente em WAT (HARMS et al., 2014), assim pode-se ver que o *browning* é um fenômeno reversível e que o PRDM16 é um gene chave em seu processo

(BARGUT et al., 2017). Há relatos experimentais que colocam que a estimulação adrenérgica sustentada é crucial para desencadear a via da termogênese (MIBOLOOKI et al., 2014). Uma inervação abundante já era atribuída ao BAT, mas o WAT também é significativamente afetado por este estímulo, principalmente o subcutâneo e visceral (BARGUT et al., 2017).

O receptor beta-3 adrenérgico ( $\beta$ -3AR) é o principal receptor envolvido na via da termogênese (MIRBOLOOKI et al., 2014; CAROBBIO et al., 2019), principalmente na transformação durante exposição ao frio (DEMPERSMIER; SUL, 2015). A p38 MAPK estimula o fator de transcrição de ativação 2 (ATF2), que faz a condução do co-ativador proliferador de peroxissoma ativado por receptor gama ( $PGC1-\alpha$ ) (ROBIDOUX, 2005).  $PGC1-\alpha$  tem efeitos significativos e adjuvantes realizando a promoção da biogênese mitocondrial e ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR *gamma* e *alpha*).  $PGC1-\alpha$  ativa o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), que comunica o núcleo com a mitocôndria e desencadeia replicação mitocondrial através da ativação do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (BARGUT et al., 2017).

O PPAR- $\gamma$  medeia a transcrição da UCP-1 durante a diferenciação de adipócitos bege (VILLARROYA; IGLESIAS; GIRALT, 2007). Após a diferenciação, o PPAR- $\alpha$  realiza o controle dos níveis de UCP-1 nos adipócitos bege (BARGUT et al., 2017). Mesmo o PPAR- $\gamma$  desempenhando um papel no *browning*, o PPAR- $\alpha$  parece ser indispensável na ativação da transcrição de genes relacionados à oxidação lipídica da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), que desencadeia a  $\beta$ -oxidação e permite que um adipócito presente no WAT se transforme em BEGE (BARGUT et al., 2017).

A irisina é uma miocina recém descrita, que também desempenha um papel durante o *browning* do WAT, ela expressa o co-estimulador CD137, uma proteína seletiva de linhagem bege. A estimulação com PPAR- $\alpha$  é acompanhada por um alto nível de expressão gênica da irisina (BARGUT et al., 2017), além disso a irisina também atua na via  $PGC1-\alpha$  com o intuito de aumentar a expressão de UCP-1, que também é uma proteína alvo do PPAR- $\alpha$ , maximizando a termogênese (ROCA-RIVADA et al., 2013). O *crosstalk* entre diferentes vias controladas pelo PPAR- $\alpha$  sugere que o mesmo tem grande potencial para desencadear o *browning*, embora o caminho ainda não tenha sido desvendado (BARGUT et al., 2017).

Além das vias moleculares, temos alguns fatores externos que produzem *browning*, muitos agentes farmacológicos têm sido associados com a produção do fenótipo bege pelos adipócitos brancos (MERLIN et al., 2016). O tratamento crônico com agonista de  $\beta$ -3AR causa a indução de UCP-1 no WAT, juntamente com um aumento da quantidade de mitocôndrias. Em consequência há uma diminuição da massa corporal uma vez que ocorreu *browning* do WAT (HUANG et al., 2012). A ativação seletiva do PPAR- $\alpha$  pelo composto fenofibrato também causa *browning* do WAT em um modelo de obesidade induzida por dieta (RACHID, 2015), como consequência sua utilização causa redução da massa corporal e esteatose hepática, implicando que a termogênese pode metabolizar os excessivos ácidos graxos livres da lipólise, mitigando sua deposição como gotículas de gordura no fígado.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) desempenham diferentes papéis na diferenciação e fisiologia dos adipócitos, a BMP-7 está relacionada ao aumento da expressão de UCP-1, aumento do acúmulo de lipídios e aumento da densidade mitocondrial em BAT (TSENG et al., 2008) e ao escurecimento do WAT de roedores e humanos (ELSEN et al., 2014), ela também estimula o PRDM16, que induz o PGC1- $\alpha$  e seus efeitos adjuvantes relacionados a atividade da UCP1 e a biogênese mitocondrial (RICHARD et al., 2010).

Já a BMP-8 age para intensificar a sinalização adrenérgica (BARGUT et al., 2017), um importante estímulo para a ocorrência tanto do *browning*, quanto da termogênese. Foram encontrados em ratos obesos tratados com agonista de PPAR- $\alpha$  níveis aumentados do gene de BMP-8, e o aumento do mesmo foi proporcional ao aumento de  $\beta$ -3AR e UCP-1 (RACHID et al., 2015), já camundongos sem a expressão de BMP-8 tem maior suscetibilidade a obesidade induzida por dieta (WHITTLE et al., 2012).

Outro fator que provoca *browning* é o exercício físico (BOSTRÖM et al., 2012; JEDRYCHOWSKI et al., 2015), esse fato acontece pois o exercício estimula a secreção de irisina pelo tecido muscular através da sinalização de ERK e p38 MAPK (ROCA-RIVADA et al., 2013) e assim promovendo aumento da biogênese mitocondrial, expressão de UCP1 e melhorando o perfil de miocinas (CAROBBIO et al., 2019) em roedores.

Compostos nutricionais também têm grande efeito no *browning* do WAT (BARGUT et al., 2017), a capsaicina é um deles, ingrediente presente na pimenta, é reconhecida como tratamento para obesidade e adipogênese, pois ela atua se ligando aos neurônios ativadores de

proteína do canal catiônico potencial receptor transiente V membro 1 (TRPV1) e assim aumentando a secreção de catecolaminas e a termogênese (BASKARAN et al., 2016). Experimentos demonstraram que a capsaicina provocou em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura uma expressão maior de RNAm de UCP1 no WAT, promovendo *browning* e neutralizando a obesidade em camundongos (BASKARAN et al., 2016; JOO et al., 2010).

Outro composto nutricional é a metionina sua restrição induz o aumento da expressão de UCP1 no WAT e o gasto energético (JAA et al., 2014; HASEK et al., 2010), através do aumento da estimulação do tecido adiposo pelo sistema nervoso (PAISANCE et al., 2010). A flucoxantina presente em algas comestíveis, também pode regular a expressão de UCP1 no WAT, e esse efeito parece estar ligado ao aumento da expressão de  $\beta$ -3AR (MAEDA et al., 2009).

Durante a obesidade de camundongos induzida por dieta e suplementados com luteolina, foi visto um gasto energético aumentado, isso se deu pela regulação positiva de genes termogênicos (UCP1, PGC1- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ ...) em WAT, esses efeitos são mediados pela sinalização da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) / PGC1- $\alpha$ , uma vez que há inibição da AMPK os efeitos são removidos (ZHANG et al., 2016). Outro nutriente promissor é o aminoácido citrulina, o tratamento com o mesmo em camundongos com indução de obesidade por dieta foi capaz de aumentar UCP1, PPAR- $\alpha$  e PGC1- $\alpha$  no WAT, resultando em uma termogênese aumentada e uma massa adiposa reduzida (JOFFIN et al., 2015).

Outro indutor do *browning* é o Resveratrol, um polifenol presente nas uvas e alguns outros alimentos. Experimentos *in vitro* demonstraram que ele aumenta as expressões gênicas e proteicas de marcadores de BAT, incluindo UCP1, PRDM16 e PGC1- $\alpha$  nos adipócitos (WANG et al., 2015). Também demonstrou *browning* do WAT com regulação positiva da UCP1 e aumento da regulação de ácidos graxos, provavelmente pela ativação de AMPK (WANG et al., 2015).

Alguns ácidos graxos também são capazes de induzir o *browning* como o ácido eicosapentaenoico (ZHAO; CHEN, 2014), ácido linoleico conjugado (WENDEL et al., 2019), e também o precursor da vitamina A o ácido retinóico (MURHOLM et al., 2013) eles atuam principalmente aumentando a expressão de UCP1 no WAT (PETERS et al., 2001; MURHOLM et al., 2013; BARGUT et al., 2016), há ainda, o ácido all- trans- retinóico que atua aumentando os

adipócitos multiloculares no WAT inguinal, aumentando juntamente a expressão de RNAm da UCP1, PPAR- $\alpha$ , PGC1- $\alpha$ , CPT-1 (MERCADER et al., 2006).

### 3.3 Marcadores da termogênese

Abaixo uma tabela adaptada de Vargas-Castillo et al. (2017) contendo os marcadores descritos na literatura utilizados para WAT, BAT e Bege e sua função biológica:

Tabela 1. Marcadores de Adipócitos

Tipo de Adipócito	Gene expresso	Nome completo	Função Biológica
Adipócito marrom e bege clássico	<i>UCP1</i>	Proteína desacopladora 1	Separar a fosforilação oxidativa da síntese de ATP com energia dissipada como calor, também conhecida como vazamento de prótons mitocondriais
	<i>Pgc1a</i>	co-ativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo	Coativador transcricional envolvido na regulação de genes relacionados ao metabolismo energético
	<i>PRMD16</i>	Domínio PR contendo a proteína 16	Co-ativador transcricional envolvido na diferenciação de adipócitos marrom e bege
	<i>Cidea</i>	Efector A do tipo DFFA indutor de morte celular	Ativador de apoptose por fragmentação de DNA; desempenha um papel na termogênese e lipólise
	<i>Dio2</i>	A desidinase iodotironina do tipo II	Conversão de tiroxina (T4) em 3,3', 5-triiodotironina (T3)
	<i>Epstl1</i>	Interação epitelial-estromal 1	Interage com a valosina que contém o produto gênico proteico, resultando na translocação nuclear do produto gênico da subunidade 1 do fator nuclear kappa e ativação dos genes alvo
Seletivo para adipócito marrom clássico	<i>Zic1</i>	Membro da família Zic1	Fator de transcrição multifuncional para o indicador de zinco tipo C2H2
	<i>Eva1</i>	Antígeno epitelial tipo V	Participação nas fases iniciais da organogênese do timo
	<i>Ebf3</i>	Fator 3 de células B precoces	Envolvido na diferenciação de células B, desenvolvimento ósseo e neurogênese
	<i>Lhx8</i>	LIM homeobox 1	Fator de transcrição para indicador com zinco duplo rico em cestina
	<i>Mir-206</i>	MicroRNA 206	Inibição dos fatores de transcrição muscular miogenina e MyoD em adipócitos marrons
	<i>Mir-133b</i>	MicroRNA 133b	miRNA-206

Seletivo para adipócito bege	<i>Tbx1</i>	Tbox-1	Fator de transcrição associado à caixa T, envolvido na regulação de processos de desenvolvimento
	<i>Tmem26</i>	Proteína transmembranar 26	Desconhecido
	<i>Cd137</i>	Superfamília de receptores de fator de necrose tumoral, membro 9	Expansão clonal, sobrevivência e desenvolvimento de células T, proliferação de monócitos, indução de um perfil Th1
	<i>Cited1</i>	Transativador com interação Cbp / p300, com domínio carboxi-terminal rico em Glu/Asp, 1	Coativador transcricional e pode desempenhar um papel na pigmentação de melanócitos
	<i>Shox2</i>	Homeobox de baixa estatura 2	Fator de transcrição de ligação ao DNA contendo homeodomínio, envolvido na formação de padrões nas espécies de invertebrados e vertebrados
	<i>Hoxc9</i>	Homeobox C9	A proteína de ligação ao DNA contendo homeodomínio desempenha um papel importante na morfogênese em todos os organismos multicelulares
Adipócito branco	<i>Lep</i>	Leptina	Hormônio que regula a ingestão de alimentos e o gasto de energia
	<i>Hoxc8</i>	Homeobox C8	Veja Hoxc9
	<i>Tcf21</i>	Fator de transcrição 21	Envolvidos em interações epiteliais-mesenquimais na morfogênese renal e pulmonar

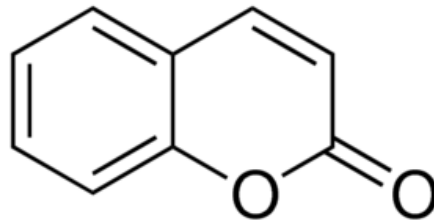
Fonte: Adaptada de Vargas-Castillo et al. (2017)

### 3.4 Cumarinas

As cumarinas são benzopironas que podem ter sua origem natural ou sintética (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014), ainda podem ser classificadas como não condensadas, furocumarinas, cumarinas diméricas, cumarinas C-preniladas, piranocumarinas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). Sabe-se que uma grande quantidade de análogos cumarínicos constituem uma classe de substâncias encontradas em várias plantas, mais de 1300 foram encontrados como metabolitos das mesmas e também de bactérias e fungos (BOURGAUD et al., 2006; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; HOULT; PAYÁ, 1996). Muitas outras estão sendo estruturadas a partir de sua base que é composta por um anel aromático fundido a um anel de lactona condensada (LAKE, 1999), onde pode-se obter seis tipos diferentes de rearranjos estruturais (LAKE, 1999; KAUR et al., 2015)(**Figura 1**).



Figura 1. Base estrutural da Cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona)



Fonte: DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA,(2017).

As cumarinas têm recebido grande notoriedade por sua bioatividade. Algumas cumarinas naturais estão sendo utilizadas como opções terapêuticas, enquanto as 4-hidroxycumarinas representam uma das estruturas sobre as quais medicamentos mais novos e promissores com menor toxicidade e maior eficácia estão sendo desenvolvidos, um grande exemplo são alguns anticoagulantes como a varfarina (BOURGAUD et al., 2006; MUELLER, 2004).

Estudos de revisão como os de Detsi; Kontogiorgis; Hadjipavlou-litina, (2017); Hoult; Payá, (1996); Katsori; Hadjipavlou-litina, (2014); Mueller, (2004); kaur et al., (2015), vêm demonstrando efeitos de medicamentos derivados de cumarinas (*in vivo* e *in vitro*) no tratamento de várias doenças como Alzheimer, Câncer, diabetes, trombose, HIV entre outras, onde descrevem seus efeitos como substâncias que têm uma menor toxicidade, atividade antioxidante (4-methylesculetina), anti-inflamatória (4-methylesculetina) (HEMSHEKHAR et al., 2013), antimicrobiana, cardioprotetora e antiplaquetária (SANDHU et a., 2014).

A absorção das cumarinas pelo organismo após sua administração acontece de forma rápida pelo trato gastrointestinal e é distribuída por todo corpo (COHEN, 1979; FENTEM; FRYE, 1993). Na maior parte dos seres humanos estudados a cumarina é metabolizada extensivamente pelo Citocromo P450 2A6 (CYP2A6) hepática à 7-HC (7-hidroxycumarina). A 7-hidroxilação é a principal via para o metabolismo das cumarinas e a isoforma do citocromo P450 responsável pela hidroxilação é o P450 2A6, podendo ser metabolizadas em todos os seis rearranjos estruturais da cumarina (YUN; SHIMADA; GUENGERICH, 1991). Grandes

quantidades de 7-HC são formadas por seres humanos após o tratamento com doses baixas (2mg/indivíduo) ou altas (200mg/indivíduo) de cumarina (LAKE, 1999).

A meia vida para eliminação da cumarina pelo organismo foi estudada em várias espécies, sendo que para humanos ocorre em torno de 1 a 2 horas, Já para camundongos, ratos, *hamster* siberiano, coelho e macaco ocorre em torno de 2 a 4 horas (LAKE, 1999).

### **3.4.1 Efeito das Cumarinas sobre o Metabolismo de Lipídios**

Estudos relacionando as cumarinas com o metabolismos de lipídios (ML) são escassos, principalmente quando ligamos os efeitos delas sobre o ML em indivíduos sem sobrepeso ou qualquer comorbidade associada a síndrome metabólica. O que existe na literatura são estudos relacionando as cumarinas com o ML e diabetes, obesidade e esteatose hepática. Como o estudo de Naowaboot et al. (2015) que avaliou o efeito da *Umbeliferona* (UMB) que é uma 7-hidroxicumarina (SARKER; NAHAR, 2017) a uma dose de 10 e 30 mg/kg/dia sobre a resistência à insulina e na regulação do metabolismo de glicose e lipídios. Foram utilizados ratos diabéticos com uma dieta rica em gordura e observado que após 8 semanas de tratamento com UMB, os lipídios séricos, estoques de triglicerídeos (TAG) e ácidos graxos não esterificados no tecido hepático foram reduzidos. Além, disso as gotículas lipídicas no tecido hepático e o tamanho dos adipócitos foram menores nos ratos diabéticos tratados com UMB.

Já o estudo de Nukitrangsan et al. (2012) avaliou se a suplementação com 20% de cumarina *Peucedanum japonicum* (PJ) em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e relatou diminuição da obesidade. Foi visto que o tratamento diminuiu o acúmulo de lipídios, tamanho dos adipócitos, e reduziu as concentrações séricas e hepáticas de TAG. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Um et al., (2013) quando avaliou a capacidade de 0,50% da cumarina (1,2-benzopirona) associada a uma dieta rica em gordura, em proteger contra a esteatose hepática. O mesmo evidenciou que após 8 semanas de tratamento com cumarina os camundongos reduziram o ganho de peso e a massa adiposa abdominal. No fígado a cumarina reduziu significativamente os lipídios totais, TAG, colesterol e o número e tamanho de gotículas lipídicas.

### 3.5 Atividade Física Voluntária (ATV)

A atividade física voluntária ou discricionária é definida como uma atividade que não é intimamente necessária para sobrevivência ou para a manutenção da homeostase e que não sofre influência de fatores externos. A mesma pode ser medida em roedores através de uma roda livre de atividade física voluntária (**Figura 2**) (GARLAND et al., 2011). Foi demonstrado por Robison et al. (2018) que quanto maior o tempo que o roedor é exposto a roda de atividade, maior é a ingestão alimentar e maior o tempo de corrida em roda, onde também relataram que a exposição variável a roda de atividade causa grande variabilidade entre volume e intensidade do exercício.

Já a AFE é a atividade associada à vida cotidiana, ela pode ser definida como termogênese da atividade sem exercício (NEAT), geralmente é medida em roedores através de filmagem e quantificação de quanto ele coça o focinho e deambula na caixa (GARLAND et al., 2011; PEREZ-LEIGHTON et al., 2014).

Figura 2. Roda de atividade física voluntaria



Fonte: Do autor

Alguns estudos vêm analisando quais áreas do encéfalo e quais substâncias podem induzir a ATV, demonstram que tal atividade é provocada por neurônios dopaminérgicos, mediadas por receptores D1 no córtex pré-frontal medial (CPFM) e no *nucleus accumbens* (GRIGSBY et al., 2018; SAIKI et al., 2018), pois estas áreas estão envolvidas com os mecanismos de recompensa (ROUTTENBERG; MALSBUY, 1969). O estudo de Saiki et al. (2018) demonstrou que a substância dissulfeto de tiamina (vitamina B1) pode induzir a ATV de modo dependente da dose, pois a mesma promove a liberação de dopamina no CPFM.

Já há estudos que estão analisando os efeitos da ATV em algumas condições patológicas como o estudo de Rattanavichit et al. (2018), relataram que o exercício voluntário previne de forma eficaz a resistência à insulina da atividade de transporte de glicose na musculatura esquelética, induzida pela ingestão de frutose. Também promove a restauração da ação insulínica e funcionalidade dos sinalizadores nas vias da Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase) e insulina. Mostram também que a progressão da hipertensão e desregulação da glicose a níveis sistêmicos em roedores com dieta rica em frutose líquida pode ser protegida por exercícios voluntários. O estudo de Waldman et al. (2017) também demonstra uma diminuição da pressão arterial, e coloca que é devido a ATV diminuir os níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona em roedores hipertensos.

#### **4. CONCLUSÃO**

Conclui-se que a cumarina 4-metildinafetina não gerou browning, não alterou o volume de atividade física voluntária e nem provocou esteatose hepática. Entretanto, com excessão do grupo AFC do tecido adiposo epididimal, a ingestão dessa cumarina por 4 semanas provoca um aumento do adipócito no tecido adiposo branco epididimal e inguinal de camundongos C57BL/6.

## REFERÊNCIAS

- BARGUT, T. C. L., SOUZA-MELLO, V., ÁGUIA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2017. doi: [10.1515 / hmbci-2016-0051](https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0051);
- BARGUT, T. C., SOUZA-MELLO, V., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., AGUILA, M. B. Fishoil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice. **Food Funct**, v. 7, n. 3, p. 1468–1476, 2016. doi: [10.1039/c5fo00909j](https://doi.org/10.1039/c5fo00909j).
- BASKARAN, P., KRISHNAN, V., REN, J., THYAGARAJAN B. Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 15, p. 2369-2389, 2016. doi: [10.1111/bph.13514](https://doi.org/10.1111/bph.13514).
- BOSTRÖM, P., WU, J., JEDRYCHOWSKI, M. P., KORDE, A., YE, L., LO, J. C., et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012. doi: [10.1038/nature10777](https://doi.org/10.1038/nature10777).
- BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 293–308, 2006. doi: [10.1007/s11101-006-9040-2](https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2).
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248-254, 1976. PMID: 942051.
- BRENÉ, S. et al. Running is rewarding and anti-depressive. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 1–2, p. 136–140, 2007. doi: [10.1016 / j.physbeh.2007.05.015](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.015).
- CAROBPIO, S.; GUÉNANTIN, A-C.; SAMUELSON, I.; BAHRI, M.; VIDAL-PUIG, A. Brown and beige fat: From molecules to physiology and pathophysiology. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1864, n. 1, p. 37-50, 2019. [10.1016/j.bbailip.2018.05.013](https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2018.05.013).
- COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Fd Cosmet Toxicol**, v. 17, p. 277–289, 1979. doi: [10.1016/0015-6264\(79\)90289-X](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90289-X).

DE CHIARA, V. et al. Voluntary exercise and sucrose consumption enhance cannabinoid cb1 receptor sensitivity in the striatum. **Neuro psycho pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 374–387, 2010.

DE JONG, J. M. et al. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 12, p. E1085-1105, 2015. DOI: [10.1152 / ajpendo.00023.2015](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015).

DE PAUW, A. et al. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. **Am J Pathol**, v. 175, n. 3, p. 927-939, 2009. DOI: [10.2353 / ajpath.2009.081155](https://doi.org/10.2353 / ajpath.2009.081155).

DEMPERSMIER, J.; SUL, H. S. Shades of brown: a model for thermogenic fat. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, n. 71, p. 1-6, 2015. doi: [10.3389/fendo.2015.00071](https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00071).

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 11, p. 1201–1226, 2017. doi: [10.1080 / 13543776.2017.1360284](https://doi.org/10.1080 / 13543776.2017.1360284).

ELSEN, M., RASCHKE, S., TENNAGELS, N., SCHWAHN, U., JELENIK, T., RODEN, M., et al. BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 5, p. 431-440, 2014. doi: [10.1152/ajpcell.00290.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00290.2013).

FENTEM, J. H.; FRYE, J. R. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. **CompBiochemPhysiol**, v. 104, n. 1, p. 1–8, 1993. PMID: 8097443.

GARLAND, T. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 206–229, 2011. doi: [10.1242 / jeb.048397](https://doi.org/10.1242 / jeb.048397).

GRIGSBY, K. B. et al. Overexpression of Protein Kinase Inhibitor Alpha Reverses Rat Low Voluntary Running Behavior. **Molecular Neurobiology**, p. 1–16, 2018. doi: [10.1007 / s12035-018-1171-0](https://doi.org/10.1007 / s12035-018-1171-0).

GUGLIELMI, V., SBRACCIA, P. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. **Eat Weight Disord**, v. 23, n. 1, p. 3–14, 2018. doi: [10.1007/s40519-017-0467-9](https://doi.org/10.1007/s40519-017-0467-9).

HARMS, M. J., ISHIBASHI, J., WANG, W., LIM, H. W., GOYAMA, S., SATO, T. M., et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 593-604, 2014. doi: [10.1016/j.cmet.2014.03.007](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.007).

HARMS, V.; SEALE. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252-1263, 2013. [10.1038/nm.3361](https://doi.org/10.1038/nm.3361).

HASEK, B. E., STEWART, L. K., HENAGAN, T. M., BOUDREAU, A., LENARD, N. R., BLACK, C., et al. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. **Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol**, v. 299, n. 3, p. R728–739, 2010. doi: [10.1152/ajpregu.00837.2009](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00837.2009).

HEMSHEKHAR, M. et al. Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1326–1335, 2013. doi: [10.1016 / j.biochi.2013.02.014](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.014).

HIRAMATSU, L.; GARLAND, T. Mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior conserve more fat despite increased exercise. **Physiology and Behavior**, v. 194, n. April, p. 1–8, 2018. doi: [10.1016 / j.physbeh.2018.04.010](https://doi.org/10.1016 / j.physbeh.2018.04.010).

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713–722, 1996. PMID: 8853310.

JEDRYCHOWSKI, M. P., WRANN, C. D., PAULO, J. A., GERBER, K. K., SZPYT, J., ROBINSON, M. M., et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. **Cell Metab**, v. 22, n. 44, p. 734-740, 2015. doi: [10.1016/j.cmet.2015.08.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.001).

JOFFIN, N., JAUBERT, A. M., BAMBA, J., BAROUKI, R., NOIREZ, P., FOREST, C. Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats. **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 129–34, 2015. doi: [10.4161/21623945.2014.989748](https://doi.org/10.4161/21623945.2014.989748).

JÓNÁS, I. et al. Behavioral traits are affected by selective breeding for increased wheel-running behavior in mice. **Behavior Genetics**, v. 40, n. 4, p. 542–550, 2010. doi: [10.1007 / s10519-010-9359-8](https://doi.org/10.1007 / s10519-010-9359-8).

JOO, J. I., KIM, D. H., CHOI, J. W., YUN, J. W. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. **J Proteome Res**, v. 9, n. 6, p. 2977–2987, 2010. doi: [10.1021/pr901175w](https://doi.org/10.1021/pr901175w).

JUNIOR, J. C. L. **ABNORMAL MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND FUNCTION IN IL10 DEFICIENCY**. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. P. 22. 2008.

KAJIMURA, S., SPIEGELMAN, B. M., SEALE, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. **Cell Metab**, v. 22, n. 4, p. 546–559, 2015. doi: [10.1016/j.cmet.2015.09.007](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007).

KANAREK, R. B. et al. Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. **Behav Neurosci**, v. 123, n. 4, p. 617–627, 2010. doi: [10.1037 / a0015896](https://doi.org/10.1037/a0015896).

KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 12, p. 1323–1347, 2014. doi: [10.1517 / 13543776.2014.972368](https://doi.org/10.1517/13543776.2014.972368).

KAUR, M. et al. Coumarin: a promising scaffold for anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 8, p. 1032–1048, 2015. PMID: [25553437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25553437/).

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423–453, 1999. PMID: [10418958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10418958/).

LONG, J. Z. et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. **Cell Metab**, v. 19, n. 5, p. 810–820, 2014. doi: [10.1016/j.cmet.2014.03.025](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.025).

MAEDA, H., HOSOKAWA, M., SASHIMA, T., MURAKAMI-FUNAYAMA, K., MIYASHITA, K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. **Mol Med Rep**, v. 2, n. 6, p. 897-902, 2009. doi: [10.3892/mmr\\_00000189](https://doi.org/10.3892/mmr_00000189).

MERCADER, J., RIBOT, J., MURANO, I., FELIPE, F., CINTI, S., BONET, M. L., PALOU, A. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5325–5332, 2006. doi: [10.1210/en.2006-0760](https://doi.org/10.1210/en.2006-0760).



MERLIN, J., EVANS, B. A., DEHVARI, N., SATO, M., BENGTSSON, T., HUTCHINSON, D. S. Could burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 1, p. 18-42, 2016. doi: [10.1002/mnfr.201500251](https://doi.org/10.1002/mnfr.201500251).

MIRBOLOOKI, M. R., UPADHYAY, S. K., CONSTANTINESCU, C. C., PAN, M. L., MUKHERJEE, J. Adrenergic pathway activation enhances brown adipose tissue metabolism: a [(1)(8)F]FDG PET/CT study in mice. **Nucl Med Biol**, v. 41, n. 1, p. 10–16, 2014. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2013.08.009](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.08.009).

MUELLER, R. L. First-generation agents: Aspirin, heparin and coumarins. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 17, n. 1, p. 23–53, 2004. doi: [10.1016/j.beha.2004.03.003](https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.03.003).

MURHOLM, M., ISIDOR, M. S., BASSE, A. L., WINTHER, S., SORENSEN, C., SKOVGAARD-PETERSEN, J., et al. Retinoic acid has different effects on UCP1 expression in mouse and human adipocytes. **BMC Cell Biol**, p. 14–41, 2013. doi: [10.1186/1471-2121-14-41](https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-41).

NADAL, A. et al. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 9, p. 536-546, 2017. DOI: [10.1038/nrendo.2017.51](https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.51).

NAOWABOOT, J. et al. Umbelliferone Improves an Impaired Glucose and Lipid Metabolism in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. **Phytother Res**, v. 29, p. 1388–1395, 2015. doi: [10.1002/ptr.5392](https://doi.org/10.1002/ptr.5392).

NEHRENBURG, D. L. et al. Voluntary Exercise and Its Effects on Body Composition Depend on Genetic Selection History. **Obesity**, v. 17, n. 7, p. 1402–1409, 2009. doi: [10.1038/oby.2009.51](https://doi.org/10.1038/oby.2009.51).

NUKITRANGSAN, N. et al. Effect of Peucedanum japonicum Thunb Extract on High-fat Diet-induced Obesity and Gene Expression in Mice. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 2, p. 89–101, 2012. PMID: [22277893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22277893/).

PEREZ-LEIGHTON, C. E. et al. Role of spontaneous physical activity in prediction of susceptibility to activity based anorexia in male and female rats. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 104–111, 2014. doi: [10.1016/j.physbeh.2014.06.001](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.001).

PETERS, J. M., PARK, Y., GONZALEZ, F. J., PARIZA, M. W. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated

receptor alpha-null mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1533, n. 3, p. 233–242, 2001. PMID: 11731333.

PIERCE, V.; CAROBBIO, A.; VIDAL-PUIG, A. The different shades of fat. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 76-83, 2014. [10.1038/nature13477](https://doi.org/10.1038/nature13477).

RACHID, T. L., PENNA-DE-CARVALHO, A., BRINGHENTI, I., AGUILA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., SOUZA-MELLO, V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 402, n. 1, p. 86–94, 2015. doi: [10.1016/j.mce.2014.12.027](https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.027).

RATTANAVICHIT, Y. et al. Voluntary exercise opposes insulin resistance of skeletal muscle glucose transport during liquid fructose ingestion in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 455–466, 2018. doi: [10.1007/s13105-018-0639-8](https://doi.org/10.1007/s13105-018-0639-8).

RICHARD, D., CARPENTIER, A. C., DORE, G., OUELLET, V., PICARD, F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. Suppl 2, p. 59–66, 2010. doi: [10.1038/ijo.2010.241](https://doi.org/10.1038/ijo.2010.241).

ROBIDOUX, J., CAO, W., QUAN, H., DANIEL, K. W., MOUKDAR, F., BAI, X., et al. Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 13, p. 5466–5479, 2005. doi: [10.1128/MCB.25.13.5466-5479.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5466-5479.2005).

ROBISON, L. S. et al. The effects of volume versus intensity of long-term voluntary exercise on physiology and behavior in C57/Bl6 mice. **Physiology and Behavior**, v. 194, n. May, p. 218–232, 2018. doi: [10.1016/j.physbeh.2018.06.002](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.002).

ROCA-RIVADA, A., CASTELAO, C., SENIN, L. L., LANDROVE, M. O., BALTAR, J., BELEN CRUJEIRAS, A., et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. **PLoSOne**, v. 8, n. 4, p. e60563, 2013. doi: [10.1371/journal.pone.0060563](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060563).

ROLFE, D. F.; BRAND, M. D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. **Biosci Rep**, v. 17, n. 1, p. 9-16, 1997. PMID: 9171916.

ROUTTENBERG, A., MALSBUURY, C. Brainstem pathways of reward. **J Comp PhysiolPsychol**, v. 68, n. 1, p. 22-30, 1969. PMID: 5798120.

SAIKI, M. et al. Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide promotes voluntary activity through dopaminergic activation in the medial prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10469, 2018. doi: [10.1038 / s41598-018-28462-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28462-2).

SANCHEZ-GURMACHES, J., GUERTIN, D. A. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 340–351, 2014. doi: [10.1016/j.bbadis.2013.05.027](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.027).

SANDHU, S. et al. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, no 15, p. 3806–3814, 2014. DOI: [10.1016/j.bmc.2014.05.032](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.032).

SARKER, S. D., NAHAR, L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. **ProgChem Org Nat Prod**, v. 106, p. 241–304, 2017. DOI: [10.1007/978-3-319-59542-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59542-9_3).

SCHULZ, T. J. et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 1, p. 143–148, 2011. doi: [10.1073/pnas.1010929108](https://doi.org/10.1073/pnas.1010929108).

SHABALINA, I. G., PETROVIC, N., DE JONG, J. M., KALINOVICH, A. V., CANNON, B., NEDERGAARD, J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. **Cell Rep**, v. 5, n. 5, p. 1196–1203, 2013. doi: [10.1016/j.celrep.2013.10.044](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044).

SHERWIN, C. M. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. **Animal Behaviour**, v. 56, n. 1, p. 11–27, 1998. doi: [10.1006 / anbe.1998.0836](https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0836).

SWALLOW, J. et al. Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 171, n. 8, p. 651–659, 2001. PMID: [11765974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11765974/).

TSENG, Y. H., KOKKOTOU, E., SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., WINNAY, J. N., TANIGUCHI, C. M., et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 1000–1004, 2008. doi: [10.1038/nature07221](https://doi.org/10.1038/nature07221).

UM, M. Y. et al. Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet. **The British journal of nutrition**, v. 109, n. 9, p. 1590–1597, 2013. doi: [10.1017 / S0007114512005260](https://doi.org/10.1017/S0007114512005260).

VARGAS-CASTILLO, A., FUENTES-ROMERO, R., RODRIGUEZ-LOPEZ, L. A., TORRES, N., TOVAR, A. R. Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity?. **Arch Med Res**, v. 48, n. 5, p. 401–413, 2017. doi: [10.1016/j.arcmed.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.10.002).

VILLARROYA, F., IGLESIAS, R., GIRALT, M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. **PPAR Res**, n. 74364, 2007. doi: [10.1155/2007/74364](https://doi.org/10.1155/2007/74364).

VISHVANATH, L. et al. Pdgfr $\beta$ + Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. **Cell Metab**, v. 23, n. 2, p. 350–359, 2016. doi: [10.1016/j.cmet.2015.10.018](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.018).

WALDMAN, B. M. et al. Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Integrated Blood Pressure Control**, v. 10, p. 41–51, 2017. doi: [10.2147/IBPC.S147122](https://doi.org/10.2147/IBPC.S147122).

WANG, S., LIANG, X., YANG, Q., FU, X., ROGERS, C. J., ZHU, M., et al. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, n. 6, p. 967–976, 2015. doi: [10.1038/ijo.2015.23](https://doi.org/10.1038/ijo.2015.23).

WENDEL, A. A., PURUSHOTHAM, A., LIU, L. F., BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of ob/ob mice. **Lipids**, v. 44, n. 11, p. 975–982, 2009. doi: [10.1007/s11745-009-3348-9](https://doi.org/10.1007/s11745-009-3348-9).

WHITTLE, A. J., CAROBBIO, S., MARTINS, L., SLAWIK, M., HONDARES, E., VAZQUEZ, M. J., et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. **CELL**, v. 149, n. 4, p. 871–885, 2012. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.066](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066).

WIEDMANN, M. N.; STEFANIDIS, S.; OLDIFIELD, B. J. Characterization of the central neural projections to brown, white, and beige adipose tissue. **FASEB J**, v. 31, n. 11, p. 4879–4890, 2018. doi: [10.1096/fj.201700433R](https://doi.org/10.1096/fj.201700433R)

WU, J., COHEN, P., SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?. **Genes Dev**, v. 27, n. 3, p. 234–250, 2013. doi: [10.1101/gad.211649.112](https://doi.org/10.1101/gad.211649.112).

WU, J.; BOSTROM, P.; FAISCAS, L. M., YE, L., CHOI, J. H., GIANG, A. H., et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p.

366-376, 2012. doi: [10.1016/j.cell.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016)

YUN, C. H.; SHIMADA, T.; GUENGERICH, F. P. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Molecular pharmacology*, [s.l.], v. 40, no 5, p. 679–85, 1991. PMID: 1944238.

ZHANG, X., ZHANG, Q. X., WANG, X., ZHANG, L., QU, W., BAO, B., et al. Dietary luteolin inactivates browning and thermogenesis in mice through an AMPK/PGC1alpha pathway-mediated mechanism. **Int J Obes (Lond)**, v. 40, n. 12, p. 1841–1849, 2016. doi: [10.1038/ijo.2016.108](https://doi.org/10.1038/ijo.2016.108).

ZHANG, Z., ZHANG, H., LI, B., MENG, X., WANG, J., ZHANG, Y., et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. **NatCommun**, n. 5, p. 5493, 2014. doi: [0.1038/ncomms6493](https://doi.org/10.1038/ncomms6493).

ZHAO, M., CHEN, X. Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 450, n. 4, p. 1446–1451, 2014. doi: [10.1016/j.bbrc.2014.07.010](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.010).

**SEGUNDA PARTE****1 ARTIGO****INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CUMARINA (*4-metildinafetina*) E  
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO ADIPOSEO  
BRANCO EM CAMUNDONGOS**

**Artigo redigido de acordo com as normas para submissão no periódico *Adipocyte***

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CUMARINA (*4-metildinafetina*) E ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EM CAMUNDONGOS**

**Moisés Silvestre de Azevedo Martins<sup>1</sup>, Priscilla Karla Fernandes Lopes<sup>1</sup>, Ana E. D. Souza<sup>3</sup>, Sérgio Scherrer Thomasi<sup>2</sup>, Isaac Filipe Moreira Konig<sup>3</sup>, Rodrigo Ferreira de Moura<sup>1\*</sup>**

1 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, Minas Gerais, Brasil;

2 Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil;

3 Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Minas Gerais, Brasil;

\*Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Campus Universitário, CEP-37200-000 - Lavras, Minas Gerais, Brasil; mourafit@yahoo.com.br

## RESUMO

O estudo tem por objetivo verificar se a suplementação com cumarina (4-metildinafetina) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo branco da região inguinal e epididimal de camundongos. Foram utilizado 32 camundongos (C57BL6) machos, com cerca de 8 semanas, mantidos em ciclo claro/escuro de 12-12 horas, em gaiolas com ou sem rodas de atividade livre. Foi feita aclimação por um período de 7 dias, após o referido período, os animais foram separados em quatro grupos (n:8): atividade física voluntária com administração de cumarina (AFC), atividade física voluntária veículo (AFV), sedentário com administração de cumarina (SC) e sedentário veículo (SV). Os animais receberam uma concentração de 30 mg/kg/animal de 4-Metildafenetina para os grupos AFC e SC, e salina 0,9%; Carboximetilcelulose (CMC) 0,3%; e Tween 1% com a mesma concentração para os grupos AFV e SC durante 28 dias, por meio de gavagem. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e foi realizada a extração e armazenamento dos tecidos adiposos das regiões inguinal, epididimal e interescapular e do fígado. Posteriormente foram realizadas análises de quantificação da massa dos animais, tempo de corrida em roda e histológicas com coloração de hematoxilina e eosina e Acido periódico- *schiff*. Para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi utilizado os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*. Para as comparações entre os grupos foram adotados os testes de *ANOVA one-way* e *two-way* e *teste t de student* para amostras independentes. Para todos os dados foram adotados um nível de significância de  $p < 0,05$ . Não obtivemos *browning* no tecido adiposo branco e diferenças significativas entre o número de voltas. Para o adipócito do tecido adiposo inguinal tanto no grupo sedentário quanto no grupo atividade física os animais que receberam a *4-metildinafetina* tiveram uma maior área, o mesmo aconteceu para o tecido adiposo epididimal porém, que a atividade física impediu os mesmos efeitos em relação a *4-metildinafetina*. Conclui-se que a cumarina 4-metildinafetina não gerou *browning*, não alterou o volume de atividade física voluntaria e nem provocou esteatose hepática. Entretanto, com excessão do grupo AFC do tecido adiposo epididimal, a ingestão dessa cumarina por 4 semanas provoca um aumento do adipócito no tecido adiposo branco epididimal e inguinal de camundongos C57BL/6.

**Palavras-chave:** Tecido adiposo; Suplementação; Tecido Adiposo Marrom; Atividade física.



## 2 INTRODUÇÃO

Em camundongos temos três tipos de tecidos adiposos, em que cada um é responsável por desenvolver uma função dentro do organismo. O tecido adiposo branco (WAT) é responsável basicamente por manter um estoque energético (NADAL et al., 2017). O tecido adiposo marrom (BAT) é responsável por manter a estabilidade térmica através da termogênese adaptativa (CAROBBIO et al., 2019) e temos o tecido adiposo bege, que é um tipo de tecido que têm características tanto do WAT quanto do BAT, ou seja ele atua tanto na termogênese adaptativa quanto como estoque energético (JUNIOR, 2018; CAROBBIO et al., 2019; HARMS; SEALE, 2013).

O tecido adiposo bege tem sido alvo de vários estudos, devido a um fenômeno chamado *Browning*, que é a capacidade do WAT apresentar um fenótipo semelhante a gordura marrom quando estimulado, levando ao aumento do gasto energético e da termogênese, ou seja transformar-se em tecido adiposo bege (CAROBBIO et al., 2019; BARGUT et al., 2017; WU et al., 2012). Este fenômeno é mais provável que ocorra em depósitos de gordura subcutânea (CAROBBIO et al., 2019; BARGUT et al., 2017).

Temos vários estímulos capazes de induzir o *Browning*, como a atividade física e vários outros que ainda estão em discussão, mas tem se um consenso de que a expressão de Proteína desacopladora 1 (UCP1) e do domínio PR contendo a proteína 16 (PRDM16) é suficiente para identificar a presença de adipócitos bege em WAT (DE JONG et al., 2015; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

A atividade física voluntária (ATV) ou discricionada é definida como uma atividade que não é intimamente necessária para sobrevivência ou para a manutenção da homeostase, e que não sofre influência de fatores externos (GARLAND et al., 2011). A mesma pode ser medida em roedores por meio de uma roda livre de atividade física voluntária (GARLAND et al., 2011).

Em situação de laboratório, a motivação para tal atividade pode estar relacionada ao traço de personalidade (JÓNÁS et al., 2010), pois corridas em roda são altamente recompensadoras (SHERWIN, 1998) e viciantes para roedores (BRENÉ et al., 2007; DE CHIARA et al., 2010; KANAREK et al., 2010).

As cumarinas são benzopironas que podem ter sua origem natural ou sintética (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014), podendo ser classificadas como não condensadas, furocumarinas, cumarinas diméricas,

cumarinas C-preniladas e piranocumarinas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). Na atualidade, existe uma grande variedade de análogos cumarínicos, que contituem uma classe de substâncias encontradas em várias plantas, mais de 1300 foram encontrados como metabólitos das mesmas e também de bactérias e fungos (BOURGAUD et al., 2006; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; HOULT; PAYÁ, 1996).

Quando tentamos associar as cumarinas com o metabolismo de lipídios, encontramos na literatura apenas estudos relacionados com animais e humanos suplementados com dietas ricas em gorduras associadas a diabetes, obesidade e esteatose hepática, onde foi visto que a cumarina diminui os lipídios séricos, estoques de triglicerídeos, ácidos graxos e tamanho de células adiposas (NAOWABOOT et al., 2015; NUKITRANGSAN et al., 2012; UM et al., 2013), assim demonstrando que a cumarina tem um papel importante no metabolismo lipídico e pode ser um possível precursor a provocar *browning* do WAT (BARGUT et al., 2017).

A atividade física tem um papel importante diminuindo/prevenindo fatores como resistência à insulina, pressão arterial e frequência cardíaca (RATTANAVICHIT et al., 2018; WALDMAN et al., 2017). Quanto a redução da gordura corporal já é sabido que a AFV diminui a mesma (NEHRENBERG et al., 2009; SWALLOW et al., 2001), mas quando comparamos a frequência da atividade, entre roedores que são geneticamente alterados (GA) para desenvolver uma maior ATV com não alterados, vemos que em ambos há diminuição da massa adiposa, mas apesar da maior atividade de roda dos GA, eles demonstraram uma menor diminuição de massa adiposa, sugerindo que os mesmos tende uma maior capacidade de conservar massa adiposa diante do desafio energético (HIRAMATSU; GARLAND, 2018).

Diante do exposto o estudo tem como objetivo verificar se a suplementação com cumarina (4-metildinafetina) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo de camundongos e analisar a presença de esteatose hepática.

### 3 MATERIAIL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostra

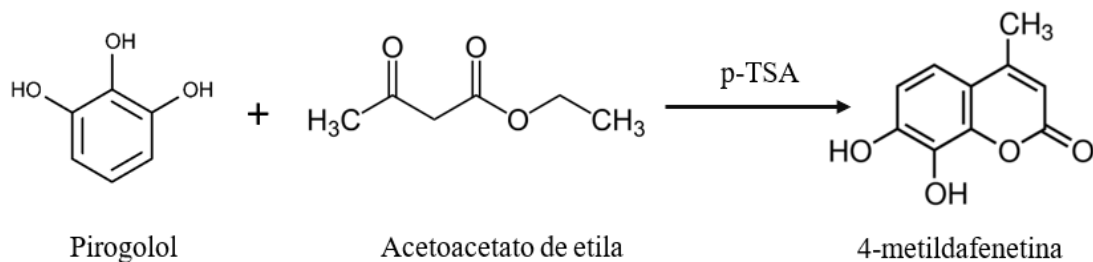
O estudo foi aprovado pelo comitê de Bioética da Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob o protocolo: 078/2017. A amostra foi composta por 32 camundongos (C57BL6) machos, com cerca de 8 semanas, pesando aproximadamente 30g. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12-12 horas (h) (momento claro 06:00 as 18:00h) a uma temperatura de aproximadamente  $22\pm 2$  °C. Foram acomodados individualmente em caixas de polipropileno medindo 30x20x13cm específicas para camundongos, onde os grupos atividade física voluntaria foram alojados em uma caixa com acesso a roda de atividade (Columbus Instruments ®). Os animais receberam ração comercial padrão comercial e água *filtrada ad libitum* durante todo o período do experimento. A água foi obtida do próprio biotério e foi trocada diariamente. A maravalha utilizada para forrar as gaiolas, foi padrão comercial, onde os níveis das mesmas foram mantidos confortáveis para os animais, e foram substituídas a cada dois dias durante a higienização das caixas.

#### 3.2 Síntese da Cumarina 4-Metildafenetina

A síntese da 4-metildinafetina foi realizada em parceria com o Departamento de Química da UFLA, a partir de técnicas ambientalmente favoráveis (Química Verde), no método conhecido como Método Pechmann, cujo o princípio é a manipulação da estrutura central da cumarina sem a necessidade do uso de solventes. A cumarina alvo para a síntese é a 4-metildafenetina e foi realizada segundo método descrito por Sharma; Kumar e Makrandi (2011). Para a reação foram utilizados o pirogólol e o acetoacetato de etila, representando o componente fenol e o componente  $\beta$ -ceto-éster, respectivamente. Como catalizador, foi utilizado o ácido p-toulenesulfônico (p-TSA) (**Figura 4**). Todos os reagentes utilizados foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich®.

Em um pilão, foi adicionado o pirogólol (1 mmol), acetoacetato de etila (1mmol) e ácido tolueno-4-sulfônico (1mmol) e processada manualmente por aproximadamente 10 minutos, quando ocorreu uma reação inicial e mudança de cor. Após esse processo, a mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 50 minutos para a conclusão da reação. Após a conclusão da reação, foi adicionada água gelada com a formação de um precipitado sólido, que foi filtrado à vácuo, lavado com água e recristalizado à partir de etanol, dando origem a 4-metildafenetina pura e em alto rendimento.

Figura 1. Síntese da 4-metildafenetina

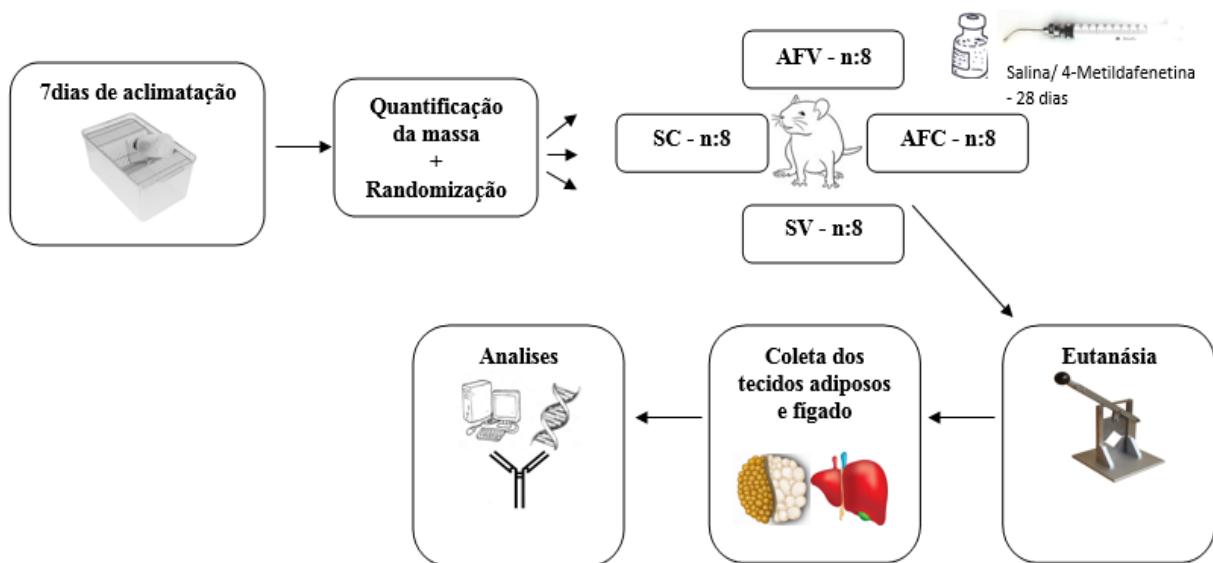


### 3.3 Desenho experimental

Os animais foram alocados em caixas de polipropileno individuais por um período de 7 dias para aclimação. Após o referido período, foi quantificada a massa de cada animal através de uma balança (Balança Eletrônica Semi-Analítica 510g X 0,001) e pelo processo de distribuição em Z foram divididos em quatro grupos (n:8): Atividade física voluntária com administração de cumarina (AFC), Atividade física voluntária veículo (AFV), Sedentário com administração de cumarina (SC) e sedentário veículo (SV).

Após alocação dos animais em suas respectivas gaiolas foi iniciada a administração diária de uma solução de 4-Metildafenetina a uma concentração de 30 mg/kg/animal para os grupos AFC e SC e salina com a mesma concentração para os grupos AFV e SV durante 28 dias, através do método de gavagem. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e foi feita a extração dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, interescapular e fígado.

Figura 2 - Desenho do experimento.



### 3.4 Administração da Cumarina/Salina

A administração das substâncias foi realizada diretamente no aparelho digestório através de um tubo esofágico (gavagem). A administração ocorreu diariamente (15:00h) durante os 28 dias do experimento. Os grupos veículo receberam uma solução de salina 0,9%; Carboximetilcelulose (CMC) 0,3%; e Tween 1% com uma dose de 30 mg/kg/animal com um volume médio de 0,25ml. Já os grupos tratados receberam uma solução de 4-Metildafenetina (cumarina) com uma concentração de 30 mg/kg/animal com um volume médio de 0,25ml. Antes da administração cada porção de 40mg de cumarina foi diluída em 1ml de Tween 20%, 60mg de CMC e mais 10ml de salina. A quantidade de cumarina foi definida através de doses medias encontradas na literatura com evidências de efeitos fisiológicos (MARTÍN-ARAGÓN; VILLAR; BENEDÍ, 2016a; SUN et al., 2013).

### 3.5 Roda de atividade física Voluntária

Roda de atividade física voluntária, confeccionada em policarbonato com diâmetro interno 9.2 cm e externo de 10.16 cm, largura de 5 cm. Possui um sensor de rotação conectado à uma interface e registro das rotações através de um computador com software específico do fabricante (Columbus Instruments®) sendo instalada nas gaiolas dos grupos exercitados. No final do experimento o total de voltas realizadas foi quantificado e estratificado dentro dos períodos claro e escuro para mensuração da quantidade de atividade que foi realizada. A utilização da roda

de atividade voluntária não acarreta em estresse ao animal e pode inclusive ser considerada como um enriquecimento ambiental (FUNCHAL; DANI, 2014). Por outro lado, para evitar possíveis influências da alteração ambiental nos parâmetros analisados, cada gaiola dos animais sedentários permaneceu com um tubo de pvc com as mesmas dimensões da roda de atividade.

### **3.6 Glicose sanguínea**

Para aferição da glicose sanguínea, foi utilizado o sistema Accutrend Plus®. Consiste em coletar amostras de sangue através da punção da veia caudal dos animais, onde se coletava uma gota de sangue através de uma tira de glicose Accutrend Plus®, a mesma era encaixada no glicosímetro onde tínhamos o valor da glicemia sanguínea.

### **3.7 Eutanásia e Extração dos tecidos adiposos**

O protocolo utilizado para eutanásia foi baseado em anestesia prévia com uma mistura de ketamina (45mg/kg) e xilazina (5mg/kg), seguido por decapitação através de guilhotinamento. A extração dos tecidos adiposos inguinal, epididimal e fígado foi feita a partir da abertura da região retroperitoneal dos camundongos. O BAT foi retirado através da abertura da parte dorsal e retirado da região interescapular. Os tecidos foram divididos, metade foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a uma temperatura de -70°C e a outra metade foram fixados, para análises posteriores.

### **3.8 Analise Histológica**

As frações de fígado e tecido adiposo epididimal, inguinal e interescapular foram fixadas por imersão em formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por 24h. Então foram clivados, desidratados, fixados e por fim, incluídos em parafina. Dez seções seriadas de 4µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina- eosina para os tecidos adiposos e fígado e Ácido periódico- *schiff* para fígado, para posterior análise morfométrica. As imagens (20x para WAT e 40x para BAT e fígado) digitais foram obtidas por meio de um sistema de captura e análise de imagens, constituído por microscópio trilocular Olympus CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP) e câmera (SC30Color CMOS Câmera para Microscopia de Luz, Olympus OpticalLtd. Brasil, São Paulo, SP).

Foram analisados 100 adipócitos por animal aleatoriamente (WATANABE et al., 2015) no software ImageJ (NIH). Os seguintes parâmetros foram avaliados (1) área (WAT), a partir de

sua delimitação, (2) densidade (BAT), utilizando um quadrado de área conhecida sobreposto a campos das imagens capturadas. Para a análise do número de adipócitos por unidade de área de tecido (NA), duas bordas do quadrado foram consideradas. Assim os adipócitos eram contados inteiramente dentro dos quadrados, ou sobreposto por pelo menos uma de suas bordas. Foram avaliadas 15 áreas do BAT para cada camundongo e o cálculo de NA seguiu a fórmula  $NA = \frac{\sum N}{\alpha \cdot \sum P(\text{tecido})}$  (adipócitos): [adipócitos]:  $NA = \frac{\sum N}{\alpha \cdot \sum P(\text{tecido})}$  (HOWARD; REED, 1998), onde N (adipócitos) é o número total de adipócitos contados em todos os campos examinados,  $\alpha$  é a área do quadrado usado e P (tecido) é o número de campos analisados.

No fígado, foram analisados qualitativamente, presença ou ausência de esteatose hepática.

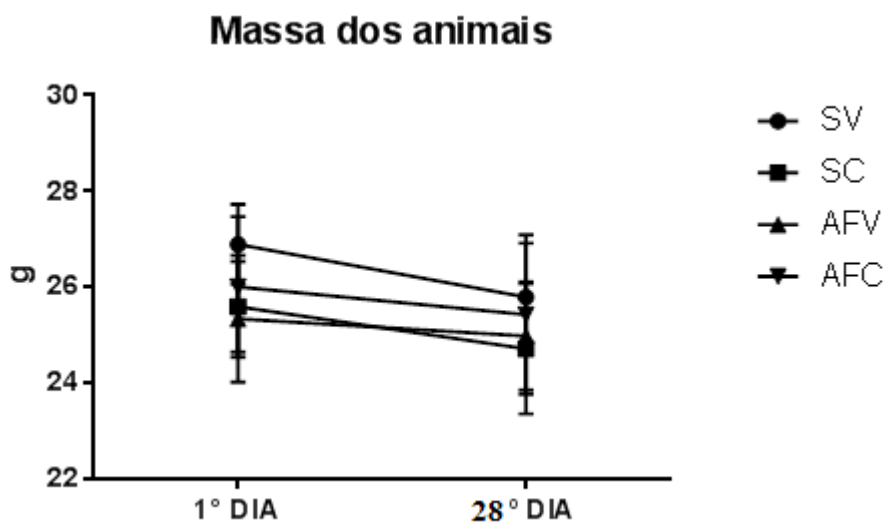
### 3.9 Análise estatística

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk e Levene* para verificar se as amostras seguem uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias. As comparações entre as áreas de tecido adiposo inguinal e epididmal, densidade do tecido adiposo marrom dos grupos, glicemia e número de voltas por ciclo foram realizadas através dos testes de *ANOVA Two-way* e *ANOVA one-way*, e utilizou-se *Test t de Student* para amostras independentes para comparação da massa dos animais e número total de voltas. Em todas as análises o nível de significância ( $\alpha$ ) adotado foi de  $p < 0,05$  e as mesmas foram realizadas no software SPSS® versão 21.

## 4 RESULTADOS

Como mostrado na figura 3, a massa dos animais não apresentou diferenças entre o primeiro e último dia do experimento nos grupos SC ( $p=0,158$ ); AFV ( $p=0,565$ ); AFC ( $p=0,477$ ), mas no grupo SV apresentou ( $p=0,044$ ).

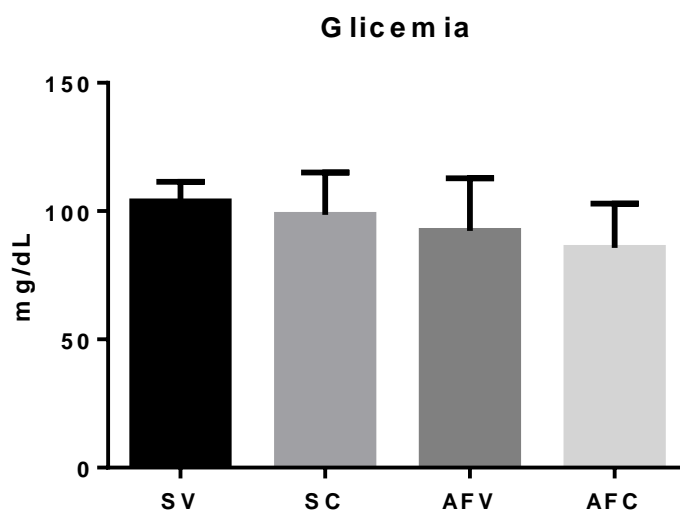
Figura 3–Massa dos animais no 1° e 28° dia.



AFC: Atividade física cumarina; AFV: Atividade física veículo; SC: Sedentário Cumarina; SV: Sedentário veículo, análise feita com *ANOVA one-way*.

Como mostrado na figura 4, a glicemia dos animais não apresentou diferenças entre os grupos ( $p=0,158$ )

Figura 4 – glicemia no último dia do experimento.



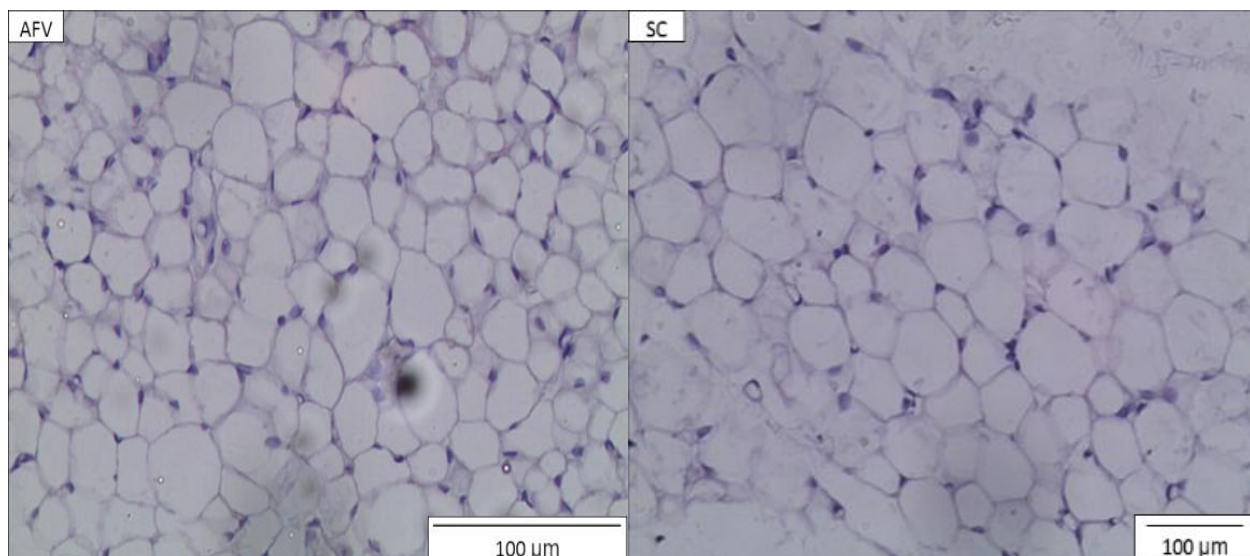
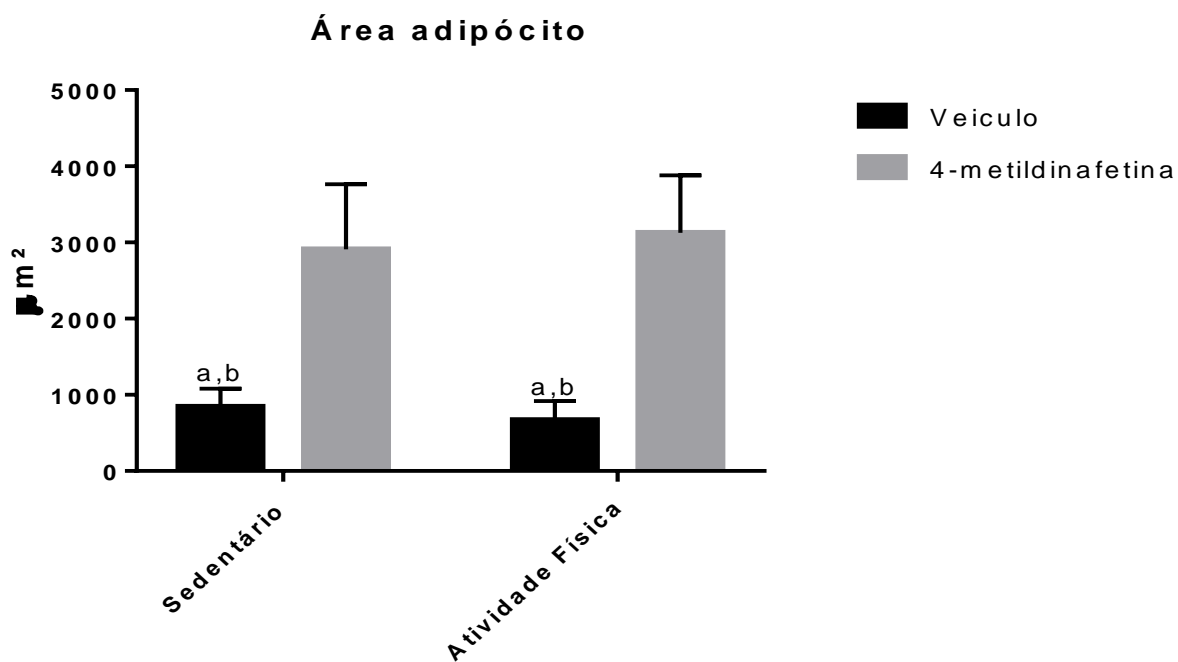
AFC: Atividade física cumarina; AFV: Atividade física veículo; SC: Sedentário Cumarina; SV:

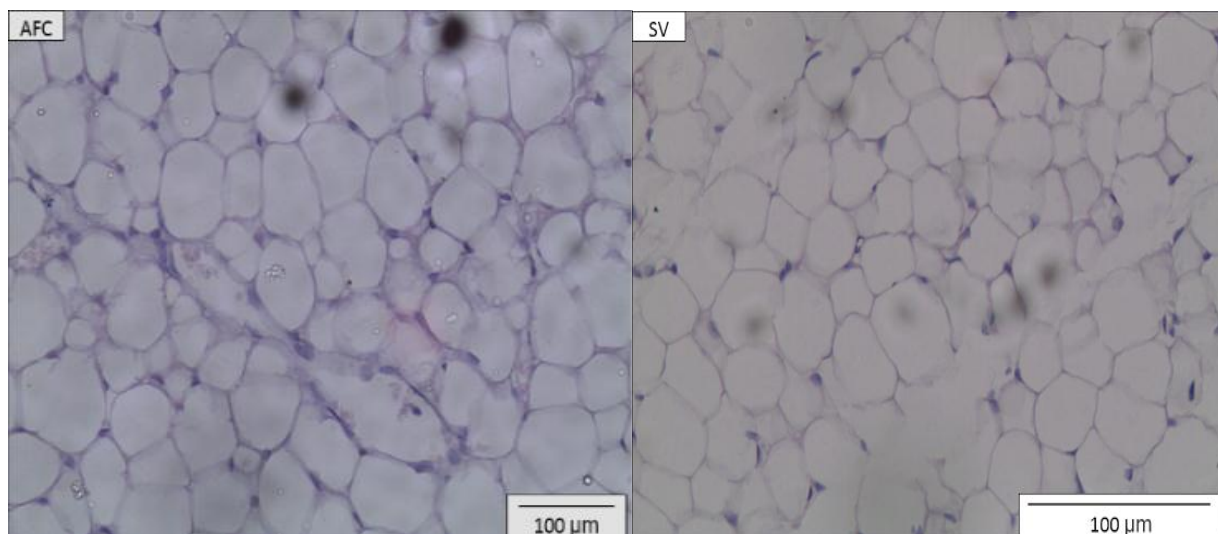


Sedentário veículo, análise feita com *ANOVA one-way*.

Como mostrado na figura 5, a área do adipócito inguinal apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SV e SC<sup>(\*\*)</sup>; AFC e SV<sup>(\*\*\*)</sup>; AFV e SC<sup>(\*\*\*)</sup> e AFV e AFC<sup>(\*\*\*)</sup>, onde os grupos AFC e SC apresentaram uma maior área.

Figura 5 - Análise morfométrica do tecido adiposo inguinal.

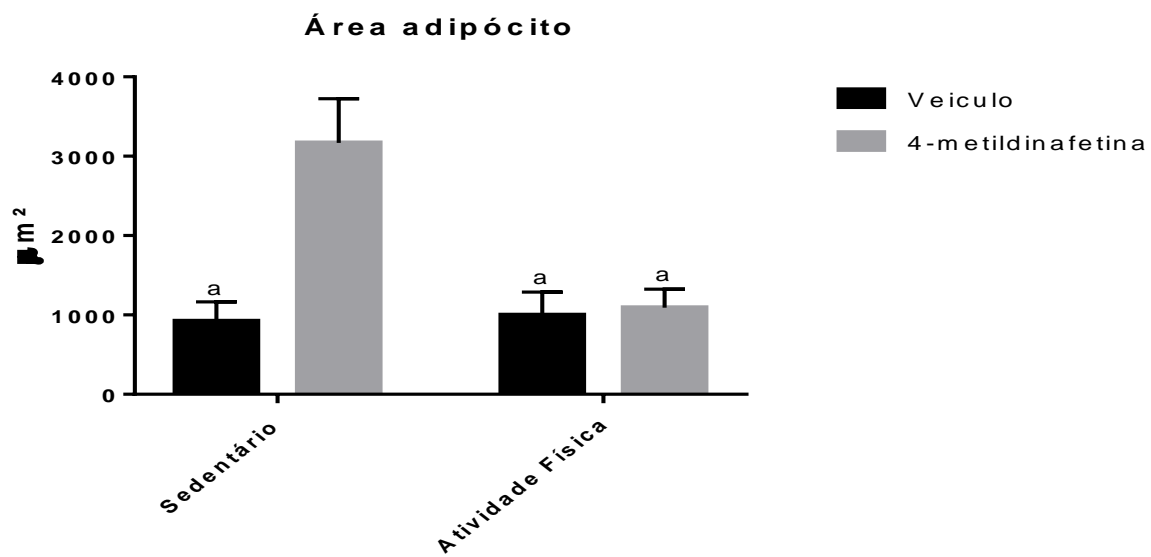


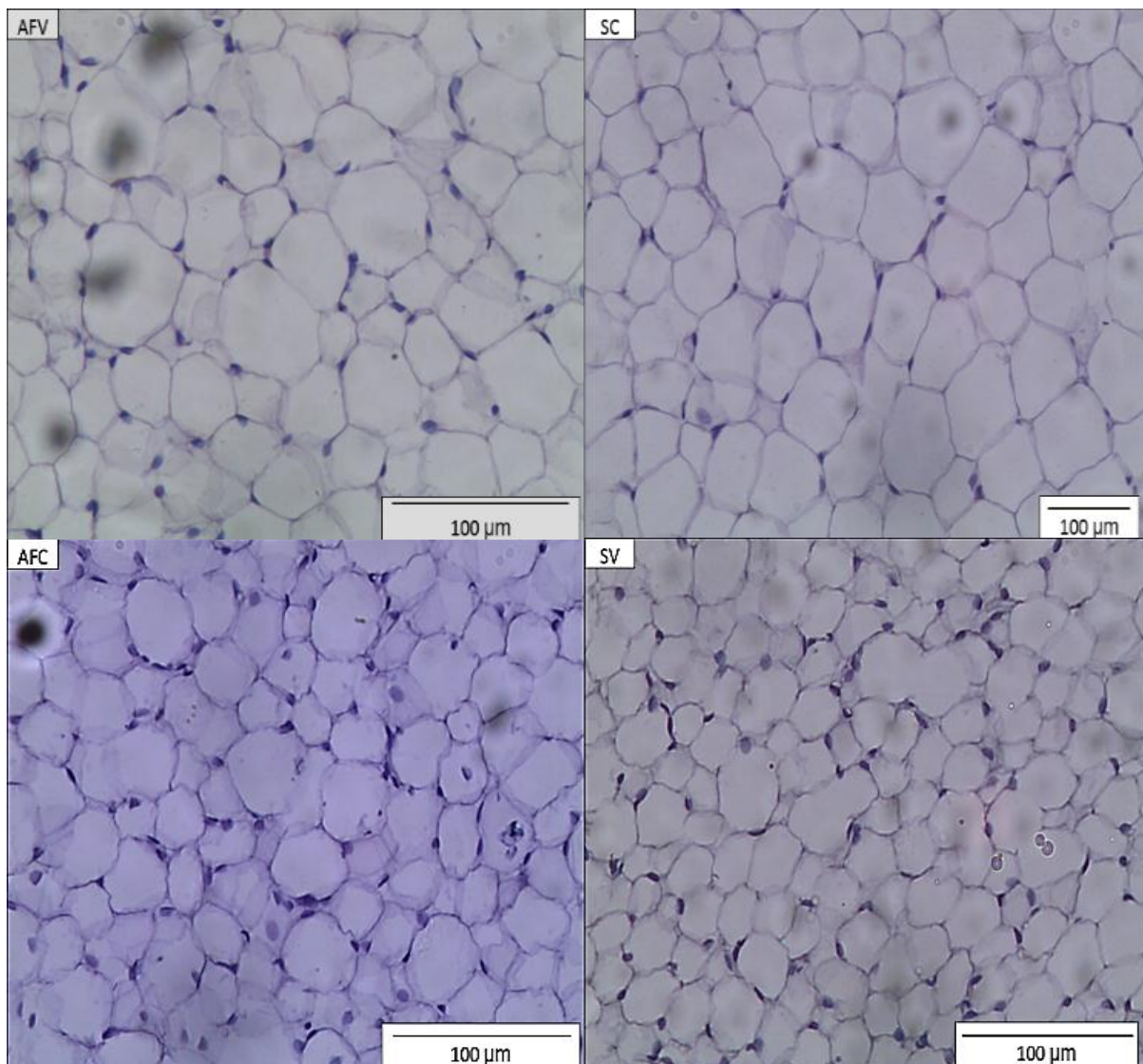


a: diferente do grupo SC; b: diferente do grupo AFC,  $p < 0.05$ . 100µm (AFV, AFC, SC, SV), análise feita com *ANOVA Two-way*.

Como mostrado na figura 6, a área do adipócito epididimal apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SC e AFV; SV; AFC<sup>(\*\*\*\*)</sup>, onde o grupo SC teve uma maior área.

Figura 6 - Análise morfométrica do tecido adiposo epididimal.

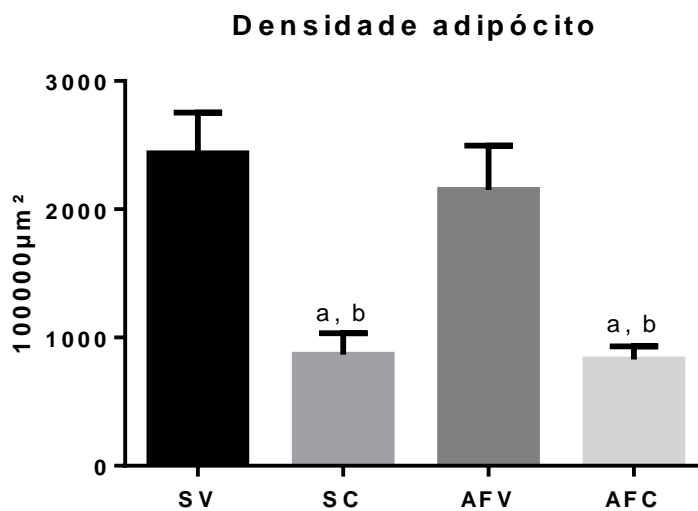




a: diferente do grupo Sedentário C,  $p < 0.05$ . 100 μm (AFV, AFC, SC, SV), análise feita com ANOVA *Two-way*.

Como mostrado na figura 7, a densidade do BAT apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos AFC e AFV\*\*\*; AFC e SV\*\*\*; AFV e SC\*\*\*; SC e SV\*\*\*.

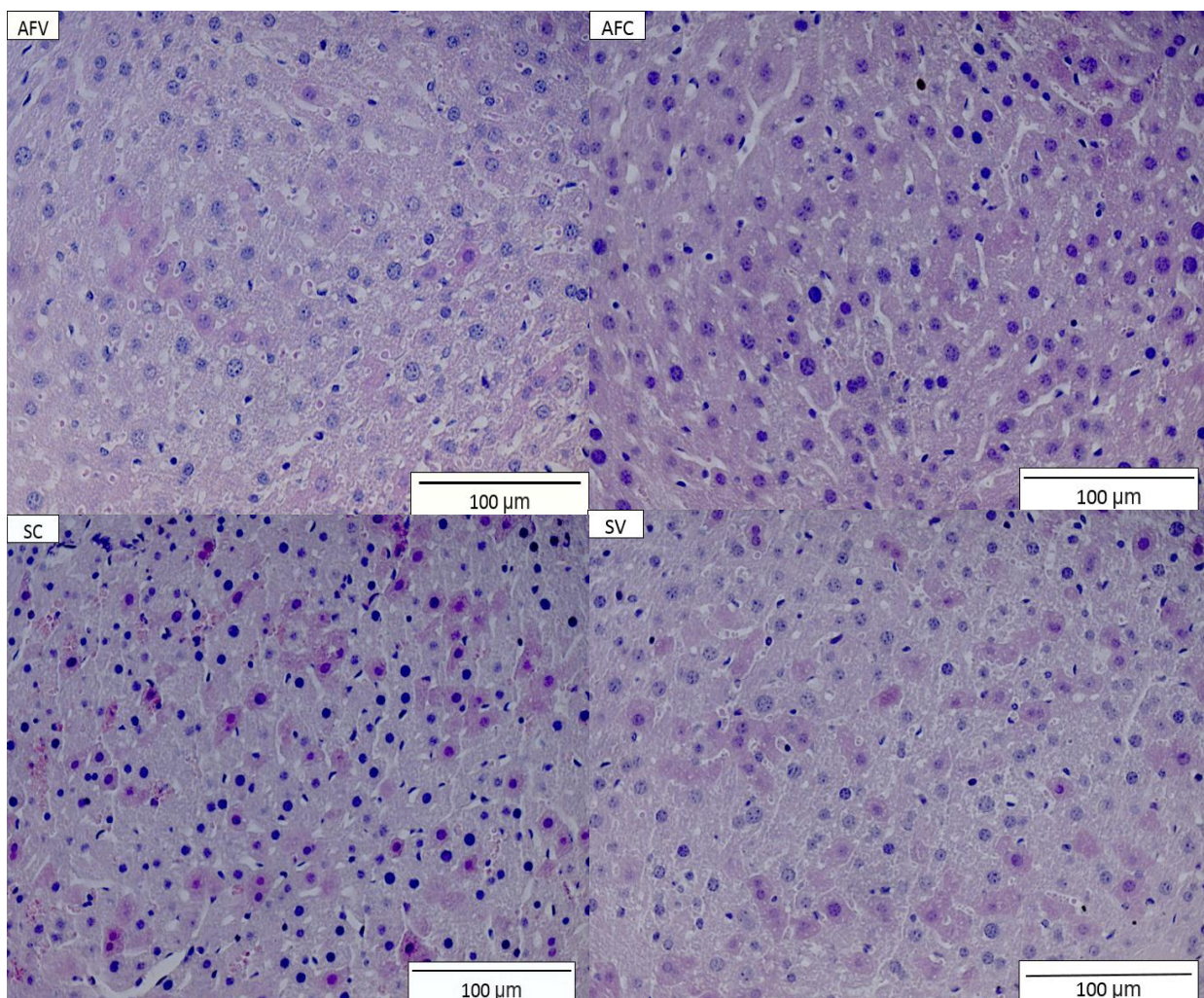
Figura 7 - Densidade do tecido adiposo interescapular a partir de uma distância conhecida de  $3.000\mu\text{m}^2$ .



a: diferente do grupo AFV; b: diferente do grupo SV,  $p < 0.05$ ; AFC: Atividade física cumarina; AFV: Atividade física veículo; SC: Sedentário Cumarina; SV: Sedentário veículo, análise feita com *ANOVA one-way*.

Como mostrado na figura 8 não houve esteatose hepática no fígado em nenhum dos grupos.

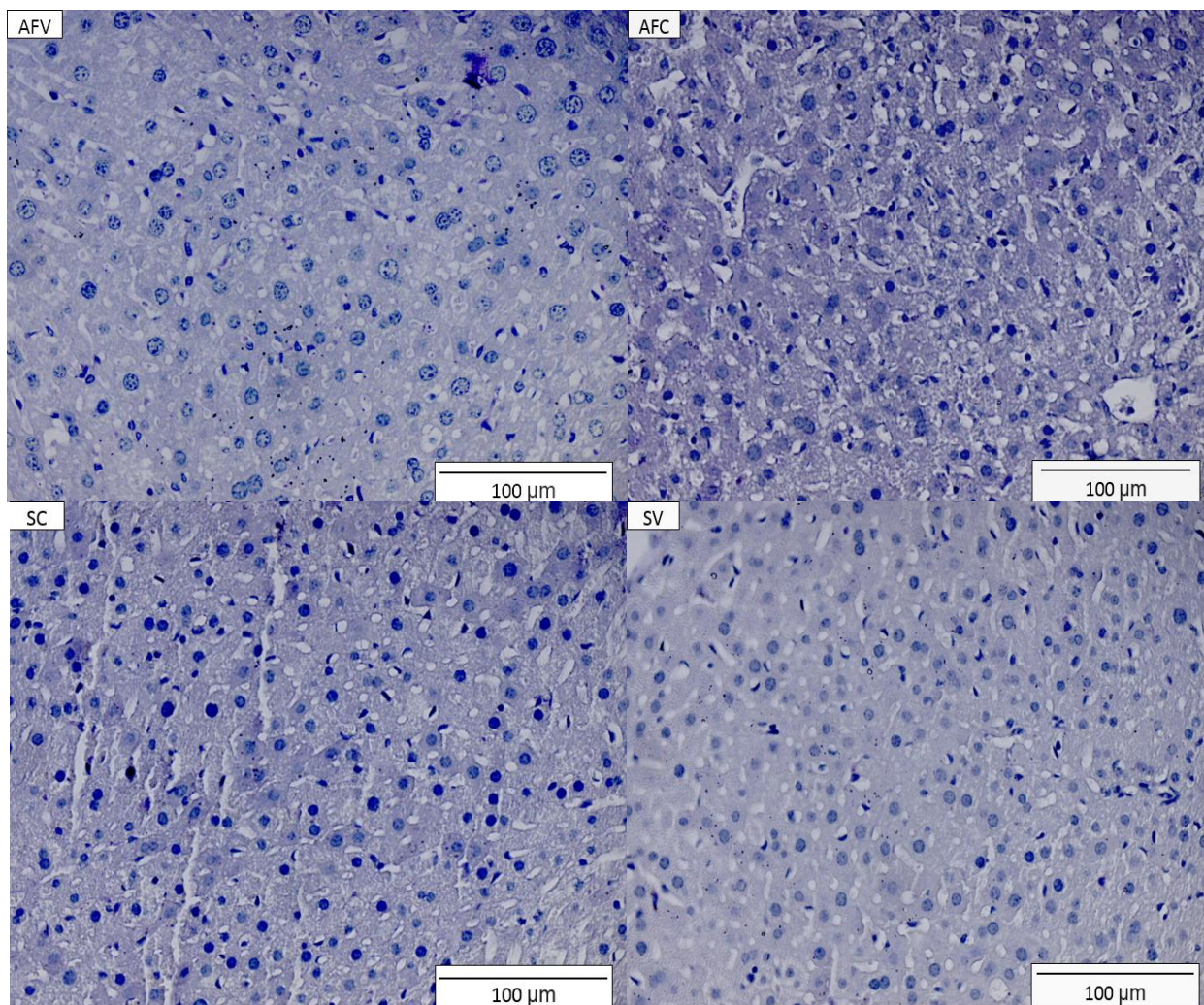
Figura 8 – Análise de esteatose hepática (Coloração Hematoxilina e Eosina).



AFV- Atividade física veículo; AFC- Atividade física cumarina; SC- Sedentário Cumarina; SV- Sedentário veículo. 100μm (AFV, SV, SC; AFC).

Como mostrado na figura 9 não houve esteatose hepática no fígado em nenhum dos grupos.

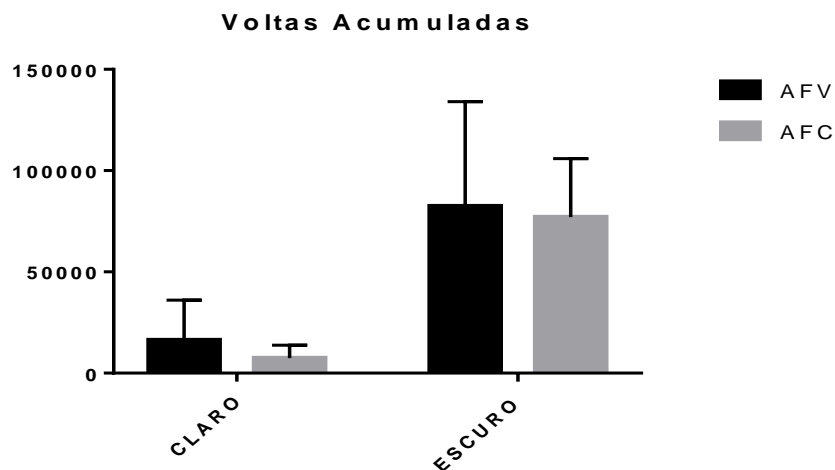
Figura 9 – Análise de esteatose hepática (Coloração Ácido Periódico + reativo de Schiff (PAS)).



AFV- Atividade física veículo; AFC- Atividade física cumarina; SC- Sedentário Cumarina; SV- Sedentário veículo. 100μm (AFV, AFC, SC, SV).

Como mostrado na figura 10, o número de voltas apresentou diferença entre os ciclos claro/escuro\*\*\*, porém não houve diferença entre os grupos e nem interação.

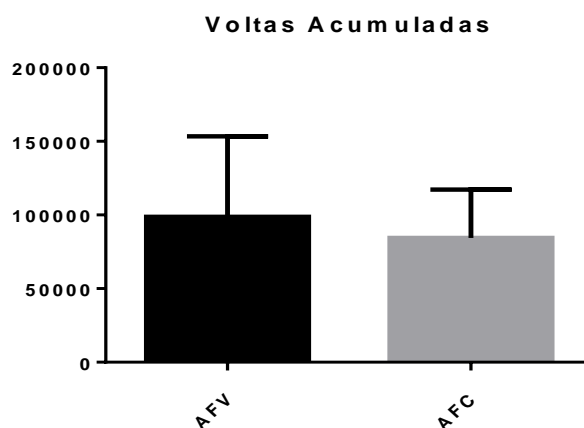
Figura 10 - Quantidade de voltas acumuladas na roda de atividade, por período/grupo.



AFV: Atividade física veículo; AFC: Atividade física cumarina; análise feita com *ANOVA Two-way*.

Como mostrado na figura 11, o número de voltas totais não apresentou diferença entre os grupos  $p=0,8630$ .

Figura 11 - Quantidade de voltas totais acumuladas na roda de atividade por grupo.



AFV: Atividade física veículo; AFC: Atividade física cumarina, análise feita com *Test t de Student* para amostras independentes.

## 5 DISCUSSÃO

O estudo teve por objetivo verificar se a suplementação com 30 mg/kg/dia cumarina (4-metildinafetina) em associação a atividade física voluntária, tem efeito de induzir *browning* no tecido adiposo branco da região inguinal e epididimal de camundongos. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo até o momento que propõe analisar a cumarina (4-metildinafetina) em vivo e relaciona-la com tecido adiposo e atividade física voluntária.

Quando analisamos o padrão de atividade física verificamos que o volume total por ciclos foi maior no período noturno nos grupos AFV e AFC (fig. 10), mas isto já era esperado uma vez que o período de vigília dos camundongos é noturno. Quando verificamos diferenças entre os grupos e ciclos (fig. 10) e voltas totais (fig. 11), não obtivemos resultados significativos. Isto permite inferir que uma dose de 30 mg/kg/dia da cumarina (4-metildinafetina) não influencia no estímulo para realização da atividade física voluntária em camundongos C57BL/6, mas também não gerou alterações que pudessem interferir deficitariamente nesse aspecto.

Até o momento, não foram encontrados estudos que investigassem os efeitos da suplementação de cumarinas sobre a atividade física voluntária. Embora tenham sido controlados os fatores que mais comuns de interferência no volume da atividade física são a luz, temperatura, comportamento de repouso, níveis de estresse e ansiedade do animal (BEERSMA; GORDIIN, 2007; DEVALLANCE et al., 2017)

Através de análise morfométrica dos tecidos adiposos foi possível inferir que o tecido inguinal não apresentou características de tecido bege e de modo supreendente, demonstrou uma maior área nos grupos SC e AFC (fig. 5) revelando que a 4-metildinafetina tem capacidade de causar hipertrofia nos adipócitos. O mesmo resultado foi encontrado no tecido adiposo epididimal no grupo SC. Porém, o grupo AFC apresentou área diminuída dos adipócitos, desse modo podemos inferir que a atividade física voluntária apresentou um efeito modulador dos efeitos da cumarina neste tecido (fig. 6). Já a densidade dos tecidos adiposos marrom encontramos resultados parecidos onde o grupo cumarina teve uma maior densidade (fig. 7).

Na literatura encontramos resultados com outras cumarinas que vão em oposição ao encontrado em nosso estudo. Kim et al. (2017), que analisou a suplementação de *Phyllodulcin* com um volume de 20 e 40 mg/kg de peso/dia em camundongos C57BL/6 obesos durante 5



semanas, e encontrou que ela aumenta a expressão de UCP1 e PRDM16 que são proteínas marcadoras de *Browning* e adipogênese, ou seja ela é capaz de transformar *WAT* em bege.

O estudo de Sim et al. (2014) relatou que a uma suplementação com *umbelliferone* e *4-methylumbelliferone* (0,2g/ kg de peso/dia) durante 12 semanas em camundongos C57BL/6 obesos é capaz de reduzir a área dos adipócitos e inibir a esteatose hepática. O mesmo foi encontrado com a suplementação (0,50%) durante 8 semanas com a cumarina 1,2-benzopirona em camundongos C57BL/6 obesos (UM et al., 2013)

O estudo de Naowaboot et al. (2015) encontrou que a suplementação com *Umbelliferone* (10 e 30 mg/ kg de peso/dia) durante 8 semanas em uma amostra de ratos obesos diminui a área dos adipócitos e inibi a esteatose hepática dos animais. O estudo de Nukitrangsan et al. (2012) obteve o mesmo resultado com *Peucedanumjaponicum* (20%) em camundongos C57BL/6 obesos. Foi visto que o tratamento diminuiu o acúmulo de lipídios e o tamanho dos adipócitos, e reduziu as concentrações séricas e hepáticas de TAG. A pesquisa de Leelavinothan et al. (2014) obteve um resultado parecido com uma cumarina (100mg/ kg de peso/dia) não especificada, em ratos *wistar* diabéticos, ele encontrou que a suplementação com essa cumarina diminuiu significativamente os lipídios.

Diante dos estudos apresentados acima podemos dizer que a *4-metildinafetina* teve um efeito contrário, mas isso pode ter se dado pela quantidade em semanas de suplementação onde nos estudos supracitados o tempo era maior. No estudo de Um et al. (2013) a cumarina reduziu significativamente os níveis séricos de leptina que foram aumentados pelo HFD. Estes resultados sugerem que a suplementação de cumarina pode inibir o ganho de peso corporal e o acúmulo de gordura. A cumarina *4-metildinafetina* pode ter causado um efeito contrário assim resultando em uma hipertrofia dos adipócitos.

Outra Possibilidade é que a *4-metildinafetina* aumentou a expressão de *Fatty acid synthase* (FAS) que fez com que aumentassem a lipogênese nos adipócitos (LAFONTAN, 2014). Assim como nos estudos de Um et al. (2013); Nukitrangsan et al. (2012) que investigaram suplementação com cumarinas em camundongos obesos e encontraram que a cumarina fez com que a expressão da FAS fosse diminuída no grupo cumarina, um efeito possivelmente contrário ao da *4-metildinafetina*.

Avaliamos se como consequência da alteração na área dos adipócitos também seria observado maior deposição de lipídios no fígado. Porém, não houve diferença entre os grupos, ou seja, não houve esteatose hepática.

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que a cumarina 4-metildinafetina não gerou browning, não alterou o volume de atividade física voluntária e nem provocou esteatose hepática. Entretanto, com excessão do grupo AFC do tecido adiposo epididimal, a ingestão dessa cumarina por 4 semanas provoca um aumento do adipócito no tecido adiposo branco epididimal e inguinal de camundongos C57BL/6.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- BARGUT, T. C. L., SOUZA-MELLO, V., ÁGUIA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2017. doi: [10.1515 / hmbci-2016-0051](https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0051).
- BEERSMA, D. G. M.; GORDIJN, M. C. M. Circadian control of the sleep–wake cycle. **Physiology & Behav. Nature reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 335–346, 2017. *vior*, v. 90, n. 2–3, p. 190–195, 2007.
- BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 293–308, 2006. doi: [10.1007/s11101-006-9040-2](https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2).
- BRENÉ, S. et al. Running is rewarding and anti-depressive. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 1–2, p. 136–140, 2007. doi: [10.1016 / j.physbeh.2007.05.015](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.015).
- CAROBPIO, S.; GUÉNANTIN, A-C.; SAMUELSON, I.; BAHRI, M.; VIDAL-PUIG, A. Brown and beige fat: From molecules to physiology and pathophysiology. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1864, n. 1, p. 37-50, 2019. [10.1016/j.bbalip.2018.05.013](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.05.013).
- DE CHIARA, V. et al. Voluntary exercise and sucrose consumption enhance cannabinoid cb1 receptor sensitivity in the striatum. **Neuro psycho pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 374–387, 2010.
- DE JONG, J. M. et al. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 12, p. E1085-1105, 2015. doi: [10.1152 / ajpendo.00023.2015](https://doi.org/10.1152 / ajpendo.00023.2015).
- DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 11, p. 1201–1226, 2017. doi: [10.1080 / 13543776.2017.1360284](https://doi.org/10.1080 / 13543776.2017.1360284).
- DEVALLANCE, E.; et al. Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184829, 2017.
- FUNCHAL, C.; DANI, C. **NEUROCIÊNCIAS MODELOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS**. Editora EDIPUCRS/IPA, 1ª edição, Rio Grande do Sul, 2014. 277p.

GARLAND, T. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 206–229, 2011. doi: [10.1242 / jeb.048397](https://doi.org/10.1242/jeb.048397).

HARMS, M. J., ISHIBASHI, J., WANG, W., LIM, H. W., GOYAMA, S., SATO, T. M., et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 593-604, 2014. doi: [10.1016/j.cmet.2014.03.007](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.007).

HIRAMATSU, L.; GARLAND, T. Mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior conserve more fat despite increased exercise. **Physiology and Behavior**, v. 194, n. April, p. 1–8, 2018. doi: [10.1016 / j.physbeh.2018.04.010](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.010).

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713–722, 1996. PMID: 8853310.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Unbiased stereology three-dimensional measurement in microscopy. **Oxford: Bios Scientific Publishers**, 1998.

JÓNÁS, I. et al. Behavioral traits are affected by selective breeding for increased wheel-running behavior in mice. **Behavior Genetics**, v. 40, n. 4, p. 542–550, 2010. doi: [10.1007 / s10519-010-9359-8](https://doi.org/10.1007 / s10519-010-9359-8).

JUNIOR, J. C. L. **ABNORMAL MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND FUNCTION IN IL10 DEFICIENCY**. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. P. 22. 2008.

KANAREK, R. B. et al. Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. **Behav Neurosci**, v. 123, n. 4, p. 617–627, 2010. doi: [10.1037 / a0015896](https://doi.org/10.1037 / a0015896).

KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 12, p. 1323–1347, 2014. doi: [10.1517 / 13543776.2014.972368](https://doi.org/10.1517 / 13543776.2014.972368).

KIM, E.; LIM, SM.; KIM, MS., YOO, SH., KIM, Y. Phylloidalin, a Natural Sweetener, Regulates Obesity-Related Metabolic Changes and Fat Browning-Related Genes of Subcutaneous

White Adipose Tissue in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1049, 2017.

LAFONTAN, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. **Diabetes & Metabolism**, n. 40, p. 16-28, 2014.

LEELAVINOTHAN, P.; RAJARAJESWARI, N.; SARAVANAN, S., RATHINAM, A. Antihyperlipidemic effect of coumarin in experimental type2 diabeticroats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, n. 4, p. 171-176, 2014.

MARTÍN-ARAGÓN, S., VILLAR, Á., BENEDÍ, J. Age-dependent effects of esculetin on mood-related behavior and cognition from stressed mice are associated with restoring brain antioxidant status. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 1–16, 2016a. doi: [10.1016/J.PNPBP.2015.08.007](https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2015.08.007).

MEISSNER, M.; LOMBARDO, E.; HAVINGAA, R., TIETGEA, A. J. F., KUIPERS, F., GROENA, A. K. Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Atherosclerosis**, n. 218, p. 323-329, 2011.

NADAL, A. et al. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 9, p. 536-546, 2017. doi: [10.1038/nrendo.2017.51](https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.51).

NAOWABOOT, J. et al. Umbelliferone Improves an Impaired Glucose and Lipid Metabolism in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. **Phytother Res**, v. 29, p. 1388–1395, 2015. doi: [10.1002/ptr.5392](https://doi.org/10.1002/ptr.5392).

NEHRENBURG, D. L. et al. Voluntary Exercise and Its Effects on Body Composition Depend on Genetic Selection History. **Obesity**, v. 17, n. 7, p. 1402–1409, 2009. doi: [10.1038/oby.2009.51](https://doi.org/10.1038/oby.2009.51).

NUKITRANGSAN, N. et al. Effect of Peucedanum japonicum Thunb Extract on High-fat Diet-induced Obesity and Gene Expression in Mice. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 2, p. 89–101, 2012. PMID: [22277893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22277893/).

RATTANAVICHIT, Y. et al. Voluntary exercise opposes insulin resistance of skeletal muscle glucose transport during liquid fructose ingestion in rats. **Journal of Physiology and**

**Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 455–466, 2018. doi: [10.1007 / s13105-018-0639-8](https://doi.org/10.1007/s13105-018-0639-8).

SHARMA, D.; KUMAR, S.; MAKRANDI, J. K. Modified Pechmann condensation using grinding technique under solvent-free condition at room temperature. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 127–129, 2011. doi: [10.1080/17518253.2010.517785](https://doi.org/10.1080/17518253.2010.517785).

SHERWIN, C. M. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. **Animal Behaviour**, v. 56, n. 1, p. 11–27, 1998. doi: [10.1006 / anbe.1998.0836](https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0836).

SIM, MO.; HAM, J. R.; LEE, H. I., SEO, KI., LEE, MK. Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice. **Chemico-Biological Interactions**, n. 216, p. 9-16, 2014.

SUN, M. et al. Coumarin derivatives protect against ischemic brain injury in rats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 39–53, 2013. doi: [10.1016/j.ejmech.2013.04.015](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.015).

SWALLOW, J. et al. Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 171, n. 8, p. 651–659, 2001. PMID: 11765974.

UM, M. Y. et al. Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet. **The British journal of nutrition**, v. 109, n. 9, p. 1590–1597, 2013. doi: [10.1017 / S0007114512005260](https://doi.org/10.1017/S0007114512005260).

WALDMAN, B. M. et al. Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Integrated Blood Pressure Control**, v. 10, p. 41–51, 2017. doi: [10.2147 / IBPC.S147122](https://doi.org/10.2147/IBPC.S147122).

WATANABE, Y., NAKAYAMA, K., TANIUCHI, N., HORAI, Y., KURIYAMA, C., UETA, K., et al. Beneficial Effects of Canagliflozin Combination with Pioglitazone on Insulin Sensitivity in Rodent Models of Obese Type 2 Diabetes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116851, 2015. doi: [10.1371/journal.pone.0116851](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116851).

WU, J., COHEN, P., SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?. **Genes Dev**, v. 27, n. 3, p. 234-250, 2013. doi: [10.1101/gad.211649.112](https://doi.org/10.1101/gad.211649.112).

WU, J.; BOSTROM, P.; FAISCAS, L. M., YE, L., CHOI, J. H., GIANG, A. H., et al. Beige

adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012. doi: [10.1016/j.cell.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016).