



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAISSA GUIMARÃES LUDWIG

CHARACTERIZATION OF SERA FROM ANIMALS SUBJECTED
TO DIETARY RESTRICTION AND THEIR EFFECTS ON UCP1
EXPRESSION IN BROWN ADIPOCYTES

CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO DIETÉTICA E DOS SEUS EFEITOS SOBRE A
EXPRESSÃO DE UCP1 EM ADIPÓCITOS MARRONS

CAMPINAS

2023

RAISSA GUIMARÃES LUDWIG

**CHARACTERIZATION OF SERA FROM ANIMALS SUBJECTED TO
DIETARY RESTRICTION AND THEIR EFFECTS ON UCP1 EXPRESSION
IN BROWN ADIPOCYTES**

**CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO DIETÉTICA E DOS SEUS EFEITOS SOBRE A
EXPRESSÃO DE UCP1 EM ADIPÓCITOS MARRONS**

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial fulfillment
of the requirements for the degree of Doctor, in
Genetics and Molecular Biology the area of
Animal Genetics and Evolution.*

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutora em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.*

Orientador: MARCELO ALVES DA SILVA MORI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA RAISSA GUIMARÃES LUDWIG E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO
ALVES DA SILVA MORI.

**CAMPINAS
2023**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L966c Ludwig, Raissa Guimarães, 1990-
Characterization of sera from animals subjected to dietary restriction and their effects on Ucp1 expression in brown adipocytes / Raissa Guimarães Ludwig. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Proteína desacopladora 1. 4. Metabolismo. 5. Restrição calórica. I. Mori, Marcelo Alves, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Caracterização de soros de animais submetidos à restrição dietética e dos seus efeitos sobre a expressão de Ucp1 em adipócitos marrons

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Adipose tissue

Uncoupling protein 1

Metabolism

Caloric restriction

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Alves da Silva Mori [Orientador]

William Tadeu Lara Festuccia

Alicia Juliana Kowaltowski

Carlos Henrique Grossi Sponton

Bruna Bombassaro

Data de defesa: 20-03-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8181-8503>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5378340698651607>

Campinas, 20 de março de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia

Dra. Bruna Bomassaro

Prof. Dr. Carlos Henrique Grossi Sponton

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a produzir esta Tese. A todos que se desejaram meu desenvolvimento pessoal e de carreira e que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis de estresse e também nos essenciais momentos de descontração.

Agradeço à minha família, meu pai **Jacob**, minha mãe **Vera** e minha irmã **Natasha**, que sempre me motivaram e se orgulharam das minhas conquistas.

Agradeço ao meu companheiro, **Silas**, pela paciência e apoio em todos os momentos dessa jornada.

Agradeço ao meu orientador, **Marcelo**, agradeço pelas discussões científicas, pelo suporte oferecido e pelo incrível respeito que tem por todos seus alunos, incluindo comigo.

Agradeço aos **membros da banca** do exame de qualificação e defesa pela participação e contribuição.

Agradeço aos outros **colaboradores** científicos ou não, a **UNICAMP**, incluindo o Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual e aos **funcionários** pelo suporte e estrutura disponibilizada. Em especial, agradeço pela incrível ajuda dada pela enfermeira do hospital universitário da UNICAMP **Elaine Candido**.

Agradeço ao notável apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo financiamento deste projeto de pesquisa (processo nº 2017/23920-9). Agradeço também ao demais financiamentos recebidos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001. Também do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e da **AstraZeneca** que deram suporte ao financeiro ao laboratório e ao **Instituto Max Planck de Biologia do Envelhecimento** pela colaboração e suporte ao projeto, especialmente à **Facility de Metabolômica** do instituto.

RESUMO

A população mundial obesa vem aumentando ao longo dos anos, juntamente com suas comorbidades. Estratégias para ativar a termogênese do tecido adiposo marrom (TAM) por meio da indução do desacoplador da cadeia de transportadora de elétrons da mitocôndria UCP1 têm sido propostas como terapia anti-obesogênica ou para tratar as comorbidades associadas à obesidade. Isso se deve ao fato de que a ativação do TAM pode induzir o gasto energético, o consumo de glicose e de outras fontes de carbono, e a secreção de moléculas que promovem saúde cardiometabólica.

O sangue pode conter em sua composição moléculas que atuam diretamente em células do TAM. Usando a expressão de *Ucp1* como um marcador para avaliação da ativação de TAM, mostramos que o soro de camundongos e ratos submetidos a restrição alimentar (DR) regula negativamente a expressão de *Ucp1* em adipócitos marrons murinos diferenciados *in vitro*. Isso ocorre devido a uma ou mais moléculas presentes no soro dos animais submetidos à dieta *ad libitum* (AL) que está ausente ou em baixas concentrações no soro DR. A caracterização desse soro nos mostra que é possível observar o efeito de ativadores do TAM em frações do soro contendo moléculas maiores do que 100kDa e em frações contendo metabólitos hidrofóbicos. Além disso, o efeito desses ativadores do TAM depende da integridade de proteínas séricas, mas não podem ser atribuídos à leptina, insulina e IGF1. Ao realizar metabolômica na fração hidrofóbica desses soros, identificamos N-acilglicinas de cadeia média (N-heptanoilglicina e N-undecanoilglicina) diminuídas no soro DR e observamos que elas são capazes de reproduzir os efeitos na indução da expressão de *Ucp1* observados pelos soros AL. Por fim, observa-se que os efeitos na ativação do TAM do soro de camundongos e ratos podem ser traduzidos para a biologia humana, indicando relevância translacional.

ABSTRACT

The obese world population has been increasing over the years, along with its comorbidities. Strategies to activate brown adipose tissue (BAT) thermogenesis via induction of the mitochondrial electron transport chain uncoupler UCP1 have been proposed as anti-obesogenic therapy or to treat comorbidities associated with obesity. This is due to the fact that BAT activation can induce energy expenditure, consumption of glucose and other carbon sources, and secretion of molecules that promote cardiometabolic health.

Blood may contain molecules in its composition that act directly on BAT cells. Using Ucp1 expression as a marker to assess BAT activation, we show that serum from mice and rats subjected to food restriction (DR) downregulates Ucp1 expression in in vitro differentiated murine brown adipocytes. This occurs due to one or more molecules present in the serum of animals submitted to the ad libitum (AL) diet that is absent or in low concentrations in the DR serum. The characterization of this serum shows us that it is possible to observe the effect of BAT activators on serum fractions containing molecules greater than 100kDa and those containing hydrophobic metabolites. In addition, the effect of these TAM activators depends on the integrity of serum proteins, but it can't be attributed to leptin, insulin and IGF1. By performing metabolomics on the hydrophobic fraction of these sera, we identified medium chain N-acylglycines (N-heptanoylglycine and N-undecanoylglycine) reduced in DR serum and observed that they are able to reproduce the effects in inducing Ucp1 expression observed by AL sera. Finally, we observed that the effects on TAM activation of mouse and rat serum can be translated to human biology, indicating translational relevance.

SUMÁRIO

1 INTRODUCTION.....	<u>11</u>
1.1 Obesity as a public health condition	<u>11</u>
1.2 Strategies for weight loss that improve metabolic health	<u>11</u>
1.3 Adipose tissue	<u>13</u>
1.4 Interventions that can activate BAT function and molecules they release in blood	<u>15</u>
1.5 Lipid molecules as BAT activators in serum	<u>16</u>
1.6 BAT activity and UCP1 relationship with obesity and metabolic diseases	<u>18</u>
1.7 Serum from dietary restricted mice decrease Ucp1 expression in vitro ..	<u>20</u>
2 OBJECTIVES	<u>25</u>
2.1 General objective	<u>25</u>
2.2 Specific objectives.....	<u>25</u>
3 METHODS	<u>26</u>
3.1 Human samples.....	<u>26</u>
3.2 Animal care and diets	<u>26</u>
3.3 Mouse cells.....	<u>27</u>
3.4 Human preadipocyte isolation for primary culture.....	<u>27</u>

3.5 Cell maintenance and cellular differentiation to mature adipocytes	28
3.6 Cell treatment with serum	28
3.7 Gene expression.....	28
3.8 Size fractionation protocol.....	29
3.9 Deproteinization protocol	30
3.10 Solid phase extraction (SPE)	31
3.11 LC/MS-based metabolomics	32
3.12 N-Acylglycines conjugation with BSA and micellar dilution	32
3.13 Statistics	33
4 RESULTS	33
4.1 Leptin or insulin do not explain the differences in Ucp1 expression of brown adipocytes exposed to AL vs. DR serum	33
4.2 Incubation of brown adipocytes with rat serum affects Ucp1 expression in a dose-dependent manner and is influenced by DR	35
4.3 The differences between AL vs. DR serum are recapitulated by a fraction containing molecules/complexes with more than 100 kDa.....	37
4.4 The differences between AL vs. DR serum require proteins to be manifested	39
4.5 A fraction of serum containing hydrophobic metabolites recapitulates the differences between AL and DR	41
4.6 LC-MS analysis of mouse and rat serum fraction 4 from SPE with PriME HLB column reveals candidate Ucp1 modulators	45

4.7 Medium-chain N-acylglycines with 7 and 9 carbons are able to induce Ucp1 expression	57
4.8 The differences in UCP1 expression can be recapitulated in human differentiated adipocytes after incubation with murine AL vs. DR serum	67
4.9 Incubation with serum of patients after bariatric surgery leads to downregulation of Ucp1 expression in murine, differentiated brown adipocytes....	68
4.10 Incubation with serum of patients with diabetes mellitus leads to downregulation of Ucp1 expression in murine, differentiated brown adipocytes....	70
5 DISCUSSION	71
6 CONCLUSION	78
7 REFERENCES	79
ANNEX 1 – Document for C57BL/6J mouse research approval (CEUA)	92
ANNEX 2– Document for Wistar rat research approval (CEUA)	93
ANNEX 3 – Document for Human research approval (CEP)	94
ANNEX 4 – Authorship claim.....	124

1. INTRODUCTION

1.1. Obesity as a public health condition

Obesity is characterized by excessive fat storage due to a chronic imbalance in food intake and energy expenditure [1]. For most adults, Body Mass Index (BMI), determined by a person's weight in kilograms divided by the square of his height in meters (kg/m^2), can be used as an estimate of obesity. A person with BMI above 25 can be considered overweight and greater than 30, obese. Other more precise methods are used to determine obesity and all-cause mortality associated with obesity, such as waist circumference, waist-to-hip ratio, skinfold thickness, and bioelectrical impedance analysis, although all of them have their limitations which must be considered when applied in health care and research [2].

According to the World Health Organization, the world population with obesity has more than doubled in the last 45 years. In 2016, 650 million people were diagnosed with obesity worldwide [3]. Obesity accompanies several social and psychological consequences, such as low self-esteem and depression [4], in addition to being a risk factor for other chronic metabolic diseases such as type 2 diabetes (T2DM), cardiovascular diseases, osteoarthritis, respiratory diseases [5], certain cancers (including endometrial, breast, ovarian, prostate, liver, gallbladder, kidney, and colon), and premature mortality [6][3].

1.2. Strategies for weight loss that improve metabolic health

Some strategies capable of promoting weight loss are dietary interventions, increased physical activity, counseling therapy, pharmacotherapy, and surgery [5].

Bariatric surgery is the obesity treatment option with the most dramatic effect in terms of weight loss, especially in the long term [7]. Nevertheless, it is the most invasive strategy and is accompanied by the greatest risks, with possible postoperative complications such as problems in nutrient absorption and secondary hyperparathyroidism [8]. Also, because of the high risk involved, this intervention should only be applied to patients with an advanced degree of obesity, therefore being restricted only to a group of individuals [9].

Anti-obesity pharmacotherapy has long been studied, and many drugs have been proposed over the years, but many also have been discontinued for their associated health risks. For example, a classic and one of the first anti-obesity drugs is the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) approved in 1934, but it was later withdrawn from the market due to multiple adverse effects and many reports of DNP-associated deaths [10]. Many others have also been banned over the years (i.e. Clobenzorex, Methamphetamine, Rimonabant, Benfluorex) for their effect on the induction of psychiatric disturbances, cardiotoxicity, or drug abuse, even though some of those drugs are still permitted in some countries (Reviewed in [11]).

Among the drugs approved for weight loss in Brazil nowadays, we can find those that limit food intake by their ability to suppress appetite (i.e. Bupropion-naltrexone, Liraglutide, Semaglutide, Sibutramine) or limit food absorption (i.e. Orlistat) [12]. It is important to observe that both classes of drugs can still be accompanied by side effects that include increased cardiopathy risks, hypertension, insomnia, mild depressive symptoms, and gastrointestinal problems, among others [13]. Besides, current pharmacological interventions are not recommended if not in combination with nutrition, physical activity, and behavioral counseling, once discontinuation often leads to weight regain [12], which put in evidence the limitations that still rely on anti-obesity pharmacotherapies.

Nutrition intervention, physical activity, and behavioral counseling are themselves good anti-obesity strategies, but they are generally associated with low compliance or a low rate of long-term success (about 15%) [14], thus proving to be not so efficient for weight loss. On the other hand, even though weight loss by itself is

effective in significantly improving the quality of life of obese patients [15][16][17], those environmental strategies and certain drugs have been proven to improve cardiometabolic health in obese people regardless of weight loss and must still be widely recommended [18][19]. Hence, more efficient new strategies aiming to improve cardiometabolic health or weight loss in obese individuals remain a relevant goal in health sciences.

1.3. Adipose tissue

Adipose tissue is a type of connective tissue present in various regions of the body, such as in the subcutaneous layer, between muscles, around the kidneys and heart, and in the abdominal cavity [20]. Each deposit of adipose tissue presents metabolic, structural, and functional differences among them [21]. The adipocyte is the most common and specialized cell type within adipose depots. These cells are derived from differentiation from a pool of pre-adipocytes originating from mesenchymal stem cells residing in adipose tissue, a process that takes place during embryonic development, in the postnatal period, and in response to physiological stimuli in the adult, which is consistent with the characteristic plasticity of this tissue [22].

There are at least three types of adipocytes: white adipocytes, brown adipocytes, and beige adipocytes (also called inducible brown or brite) [23], although other subtypes of adipocytes with distinct molecular and metabolic characteristics in human adipose tissue have been reported [24][25].

The white adipocyte is characterized by the capacity to store large amounts of lipids in a single droplet in its cytoplasm representing approximately 90% of the cell volume (unilocular) [26]. Triglycerides are the main form of lipid stored in the droplets. They are broken down into glycerol and free fatty acids in a process called lipolysis and the products are then released into circulation to fuel tissues when the body is in negative energy balance (e.g., fasting, physical activity, cold exposure). Furthermore,

white adipocytes in the white adipose tissue (WAT) depots produce a variety of adipokines, which makes this cell type have an important role in the endocrine control of metabolism [23]. The excess of WAT in the visceral cavity is one of the main risk factors for the development of obesity-related diseases, partly due to the proximity between these depots and the liver, which ends up suffering a greater impact from free fatty acids and inflammatory molecules released by the hypertrophied adipose tissue [26].

Classic brown adipocytes are characterized by the accumulation of multilocular lipid droplets, large numbers of mitochondria, and expression of brown adipose tissue (BAT) mitochondrial uncoupling protein (UCP1) [27]. When activated, this protein uncouples the electron transport chain, resulting in the controlled release of chemical energy in the form of heat (thermogenesis) and the channeling of fatty acids for β -oxidation, in addition to increased glucose uptake [23]. Beyond its classical thermogenic function and besides being one of the most metabolically active tissues in the body, more recently BAT has been reported to have endocrine/paracrine functions. The release of the called batokines, which consist of peptides, metabolites, lipids, or microRNAs, can affect the regulation of whole-body metabolism through communication with the liver, cardiovascular system, skeletal muscle, immune cells, and WAT (Reviewed in [27]).

Some adipocyte progenitor cells within certain WAT depots can differentiate into beige adipocytes under some thermogenic stimulation [28]. This process, usually called browning of the adipose tissue, is transient; therefore, it is lost when initial stimuli are discontinued [29]. Which cell among WAT can undergo this process seem to be determined at the progenitor cell stage as they manifest a specific transcriptional profile prior to differentiation [30].

Both brown and beige adipocytes share common morphological and biochemical properties, including multilocular lipid droplets, mitochondria abundance, expression of the uncoupler protein UCP1, and the capacity of performing thermogenesis [31]. Nonetheless, they are considered to be different types of cells as they present differences in their developmental origin, anatomical location, regulation, and function [31]. For instance, while all adipocytes are derived from the mesoderm, in

mice, most of the white and beige adipocytes are derived from adipogenic lineages of Myf5-negative cells, while the classic brown adipocytes are derived from the myogenic lineage of Myf5-positive cells [32].

In mice, BAT is found in a well-defined depot in the interscapular region, but in adult humans its distribution is more dispersed. Newborn humans have BAT located mainly around the neck and large blood vessels in the thorax, but most of these depots are progressively replaced by WAT [22]. Since 2009, evidence confirmed that adult humans also have a BAT equivalent area [33][34][35], with UCP1-positive multilocular adipocytes that can be found in the cervical and supraclavicular regions between white fat depots [36], although it is not yet defined if cell signature is more relatable to mouse brown or beige adipocyte. Along with those depot regions that contain the largest and most prevalent concentration of brown/beige cells, these cells are also found along the spinal cord, in the mediastinum [37], and around the heart [38].

1.4. Interventions that can activate BAT function and molecules they release in blood

The stimulation of brown or beige adipocyte differentiation or function happens through different mechanisms, which include sympathetic nervous system (SNS) activation [39], infiltration of immune cells, specially M2-polarized macrophages [40], and the release of hormones or other classes of molecules in the circulation (reviewed in [41]). Some examples of interventions that are known to stimulate this phenomenon are environmental enrichment and cachexia induced by some types of cancer, physical exercise, and cold exposure [42]. Circulating molecules released in those conditions that can act directly in brown or beige cells have been widely studied for their natural bioavailability and potential to be used as drugs.

Interventions that involve an environment with social interactions and entertainment for mice stimulate the release of the neurotrophic factor BDNF in the

hypothalamus, which induces the release in the serum of catecholamines that activate the sympathetic nervous system, thus inducing “browning” [43][44]. Indeed, sympathetic activation is the classical and most dominant mechanism that promotes browning and BAT activation, particularly under cold exposure [45]. In cancer, cachexia is aggravated by the browning effect induced by the release of interleukin 6 (IL-6) and PTHrP into circulation [43][44]. Some types of physical exercise can stimulate the release of molecules such as acylcarnitines [46], b-Aminoisobutyric Acid (BAIBA) [46], irisin [47], lactate [48] or METRNL [49] into the blood. Many of those molecules can also be found increased in blood after cold exposure, along with others such as 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-diHOME) [50] and bile acids [51][52]. All of those molecules have been described to activate BAT function in a way dependent on UCP1 [41].

Chronic exposure to cold is perhaps the most efficient and well-established stimulus for inducing browning in mammals, activating non-shivering thermogenesis [23] [42]. Oxygen consumption, which is an indirect measure of energy expenditure, and UCP1 expression are inversely correlated with the ambient temperature [53]. Thus, it is not surprising that weight gain from a high-fat diet can also be prevented by cold exposure in mice, which does not happen at thermoneutrality [54][55]. Also, classical experiments with naked men that had been exposed to cold indicate that there is an increase in body heat production [56] and BAT can be activated after cold exposure in humans [57][58]. However, from a therapeutic point of view, cold exposure is an uncomfortable intervention and practically unfeasible for application in humans.

1.5. Lipid molecules as BAT activators in serum

Among molecules that are described to induce BAT activation and UCP1 protein function, some are lipid-based [59]. Some examples are 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-diHOME) [60], omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [50], conjugated linoleic acid (CLA) and bile acids [51][52], cardiolipin

[61][62] and N-acyl amino acids [63].

One of the most recent findings describes long-chain N-acyl amino acids to act as uncouplers of mitochondria [63] or induce brown adipocyte differentiation [64]. Most interestingly, N-acylglycines have been reported to be associated with energy metabolism and adipose tissue metabolism. *N*-oleoylglycine (OLGly) increased adipogenic genes (PPAR γ and aP2) in 3T3-L1 adipocytes *in vitro*, inducing lipid accumulation, as well as enhancing insulin sensitivity [65]. OLGly administrated intraperitoneally induces the activity of AgRP neurons, responsible for increasing food intake [66]. On the other hand, *N*-arachidonoylglycine (NAGly) has been reported to increase cellular respiration in mouse primary white adipocytes, and administrations of other acyl amino acids increased energy expenditure, improved glucose homeostasis in mice, and slightly decreased food intake [63].

Other functions have been attributed to N-acylglycines, for instance, NAGly, *N*-linolenoyl glycine (C18:3), and *N*-eicosapentaenoylglycine have antiproliferative effects on mouse macrophage RAW cells and were also potent inhibitors of macrophage RAW cell proliferation [67]. *N*-palmitoylglycine stimulates calcium influx and nitric oxide production in sensory neurons [68], whereas *N*-oleoylglycine induced hypothermia and decreased locomotion in rats [69].

Even though all functional N-acylglycines described in the literature are composed by long chain fatty acids (>14 carbons), in the vast majority of cases medium-chain or small-chain fatty-acids glycine-conjugated molecules are not even mentioned or analyzed [63][63][68][69] [65][66], which points to the curious fact that their role in metabolism is overlooked. In the literature, long-chain fatty acids are specifically highlighted in most cases because they interact with UCP1 protein to allow a proton-lipid flip-flop mechanism that uncouples the mitochondrial membrane [70][71]. Even though, however, the longer the carbon chain in lipids the more efficient the uncoupling becomes [71], it does not exclude the possibility that other smaller lipid molecules can induce BAT activation through direct or indirect mechanisms.

In most studies, the mechanism by which N-acylglycines act has not been completely elucidated, but these molecules have been described to be endogenous ligands or act on the cell surface through G-protein-coupled receptors such as GPR92 [72], GPR72 [73], or the cannabinoid CB1 receptor [65].

Some known enzymes produce N-acylglycines. For instance, the glycine N-acyltransferase (GLYAT) enzyme forms N-acylglycines exclusively inside mitochondria using acyl-CoA esters derived from fatty acids and a glycine amino acid as substrates; and the formed molecule can be externalized and excreted in urine [74]. Also, increased N-acylglycine levels in plasma and urine can be observed when there is an accumulation of acyl-CoA esters such as in cases where beta-oxidation is impaired, like in people suffering from inborn errors of mitochondrial amino acid or fatty acid metabolism [74][75][76][77]. The enzyme PM20D1 has both N-acyl amino acid synthase and hydrolase activities and has been reported to regulate N-acyl amino acids in plasma *in vivo* [63]. Interestingly, PM20D1 is exclusively localized to lipoproteins in mouse and human plasma [78].

1.6. BAT activity and UCP1 relationship with obesity and metabolic diseases

Browning effects after cold exposure and their relation with obesity have long been inferred to be related to the UCP1 uncoupler mechanism alone [29], up until recently, when many have described other UCP1-independent thermogenic mechanisms such as creatine or calcium futile cycles [79]. This was crucial to explain why UCP1-KO mice were not spontaneously obese in usual temperature conditions of housing (18-22°C) or cold [80]. Also, curiously, studies have demonstrated that even though cold can increase BAT mass in mice that contain increased and functional UCP1 protein, BAT may not respond to cold stimulus if, for example, in the absence of a proper sympathetic response, causing the animal to become cold intolerant [53][81]. These

findings led us to understand that we still need more research to unveil the mechanisms behind non-shivering thermogenesis and highlight the limitations on the role of UCP1 activity in obesity.

On the other hand, in thermoneutrality, UCP1 remains the main player, since with its ablation mice become obese even while eating a chow diet [80], and BAT activation, combined with the recruitment of beige cells can contribute to up to 50% and 32% increases in energy expenditure in rodents and humans, respectively [82][83]. Also, individuals with a known polymorphism in the UCP1 gene leading to higher levels of the expression of this gene present increased thermogenic response and a lower probability of being obese [84][85]. Furthermore, some studies indicate that obese people have less BAT activity than lean people [36][33], although a study shows that multivariate analysis does not indicate the same association, suggesting that another common factor may be more important for this relation [86]. BAT activity has also been shown to be altered in other conditions. For instance, it was described to be decreased in aged or male individuals, when compared to females, also in people with cardiometabolic diseases, and increased in people that currently use beta-blocker pharmacotherapy [86][87][88].

Both obesity and aging are risk factors for metabolic diseases, which have been described to have a clear relationship with BAT activity in humans. Improved metabolic parameters associated with BAT activity in humans include blood glucose, LDL and HDL levels, cholesterol, and liver fat accumulation. As a consequence, the incidence of many diseases has been inversely associated with BAT activity, such as T2DM, dyslipidemia heart-associated diseases, cerebrovascular disease, and hypertension [30][88].

The fact that thermogenic fat activity can influence energy expenditure when subjected to different stimuli [30] and that mitochondrial uncouplers such as DNP can induce weight loss [89] indicate the potential for anti-obesogenic pharmacotherapies that target human BAT to modulate energy expenditure. Although it remains debatable if BAT activation in humans is sufficient to promote weight loss [88], the fact that even in the absence of weight loss BAT activity has such a strong correlation with a healthier cardiometabolic state [30][88] combined with the fact that some anti-obesogenic drugs

are used to treat other metabolic diseases [90] reinforces the necessity for a broad understanding of how BAT activity can be modulated.

1.7. Serum from dietary restricted mice decrease *Ucp1* expression *in vitro*

To maintain energy balance, BAT activity needs to be tightly controlled and act in tune with environmental changes. This led us and others to hypothesize that endogenous, circulating molecules should act to modulate BAT function in response to environmental stimuli. To directly test this hypothesis, during my Master's dissertation, I established a model in which I exposed murine brown adipose cells *in vitro* to serum isolated from mice, rats, or humans and measured *Ucp1* expression as a readout of BAT activation [91].

As a first attempt to identify the conditions in which serum affects brown adipocyte activation, we tested how BAT cells that expressed luciferase under the control of the *Ucp1* promoter (Ucp1-Luc BAT) responded to the incubation with the serum of mice subjected to different interventions. These conditions arbitrarily included mice subjected to different periods and types of dietary restriction (DR), dietary methionine restriction, time-restricted feeding, exercise training, cold exposure, high-fat diet, aging, fat-specific Dicer knockout (a condition that cell autonomously inhibits browning in mice [92]) or treatment with β 3-adrenergic receptor agonist (CL-316,243), 2,4-dinitrophenol (a mitochondrial uncoupler), vitamin C, or enoxacin (an antibiotic and activator of the miRNA processing pathway). Ucp1-Luc BAT cells were differentiated under brown adipogenic conditions [93] and at day 9 the fetal bovine serum was replaced by 5% mouse serum. Cells were harvested after 24h and luciferase activity was measured as an indicator of *Ucp1* expression. The initial screen consisted of testing 69 independent pools of sera (N = 3-6 animals per condition) in uniplicate. Some conditions had more than one pool representing different cohorts of animals. Using

arbitrary criteria, we selected conditions that showed the most marked differences for further validation using a larger number of samples per condition. The only serum that was found to reproducibly change luciferase activity (reducing it by 44-72%) was the serum of mice subjected to DR (Figure 1). This was true when sera of individual animals were pooled within the same cohort and different cohorts were analyzed (Figure 1A) or when sera of different individual animals in a single cohort were used (Figure 1B), showing the consistency of the data across multiple animals and cohorts.

The protocol of DR reproduced the National Institute on Aging (NIA) protocol, which has been shown to increase lifespan and confer beneficial metabolic outcomes [94]. In brief, 14-week-old mice were subjected to 10% DR for one week, followed by 25% DR for an additional week and 40% DR for the next two weeks. *Ad libitum* (AL) fed mice were used as controls. The diet was based on the NIH31 formula, but the DR diet was supplemented with 40% more vitamins to avoid malnutrition (NIH31-Fortified diet). Under these conditions, DR promoted significant weight loss and increased glucose tolerance (data not shown).

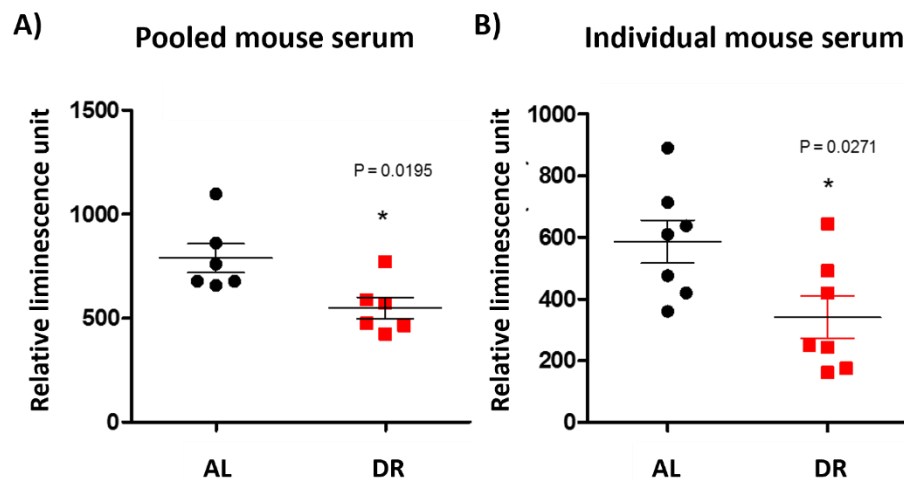


Figure 1. Serum of dietary restricted mice reduced *Ucp1* expression in murine differentiated brown preadipocytes. Twelve-week-old male mice were subjected to NIA's protocol of dietary restriction for one month. Luciferase activity was measured in

differentiated Ucp1-Luc BAT cells after 24h of incubation with 5% mouse serum. A, sera of mice within each independent cohort were pooled. Each pool contained sera of at least three mice. N=6 independent cohorts. B, sera of individual mice in two independent cohorts. N=6-7. Values represent mean $\pm$ SEM. *P<0,05 (Student's t-test). AL, Ad libitum diet. DR, dietary restriction.

Source: Adapted from my master's dissertation [91].

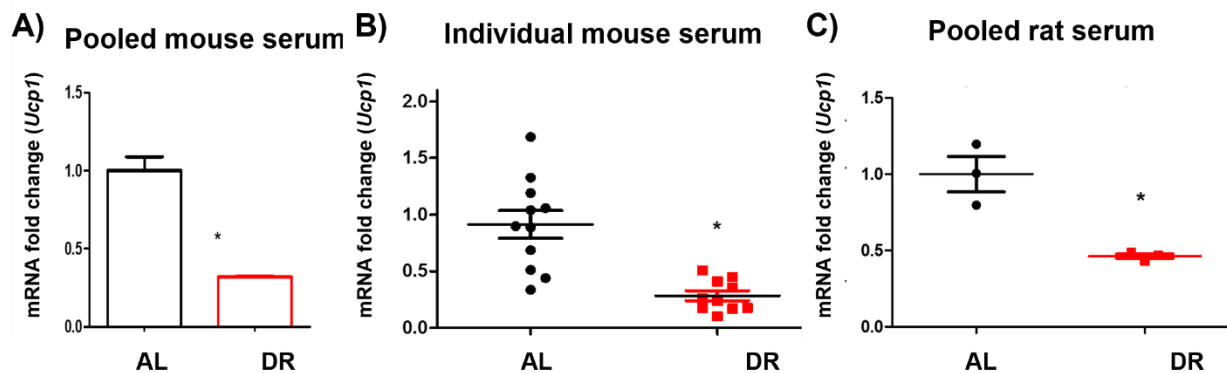


Figure 2. Effect of serum of rodents subjected to Dietary restriction (DR) or Ad libitum diet (AL) over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old male mice (A, B) or rats (C) were subjected to NIA's protocol of dietary restriction for one month and their serum samples were collected. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24 hours of incubation with 7.5% serum of pooled (A, B) or individual animal serum (C)). Values represent mean $\pm$ SEM.). In A, *p<0.05 (Two-Way ANOVA). In B, C, and D, *p<0,05 (Student's t-test).

Source: Adapted from my master's dissertation [91].

Importantly, the effects of the DR serum were reproduced when we assessed *Ucp1* mRNA levels using RT-qPCR. Pooled mouse sera (Figure 2A) and serum from

individual animals (Figure 2B) from the same cohort showed similar results, as well as when pooled sera of dietary-restricted rats (Figure 2C) were used instead.

Finally, by titrating the serum we concluded that the mouse DR serum lacks one or more inducers of *Ucp1* that are present in the serum of *ad libitum*-fed animals (Figure 3A). Also, we established 7.5% of serum as a concentration to sufficiently downregulate *Ucp1* expression; therefore, that was the concentration used in most of our following experiments. Our tests also indicated that the mouse serum components capable of inducing *Ucp1* are proteins or depend on proteins to act, as proteinase K treatment brings the *ad libitum* serum effect down to the DR effect (Figure 3B).

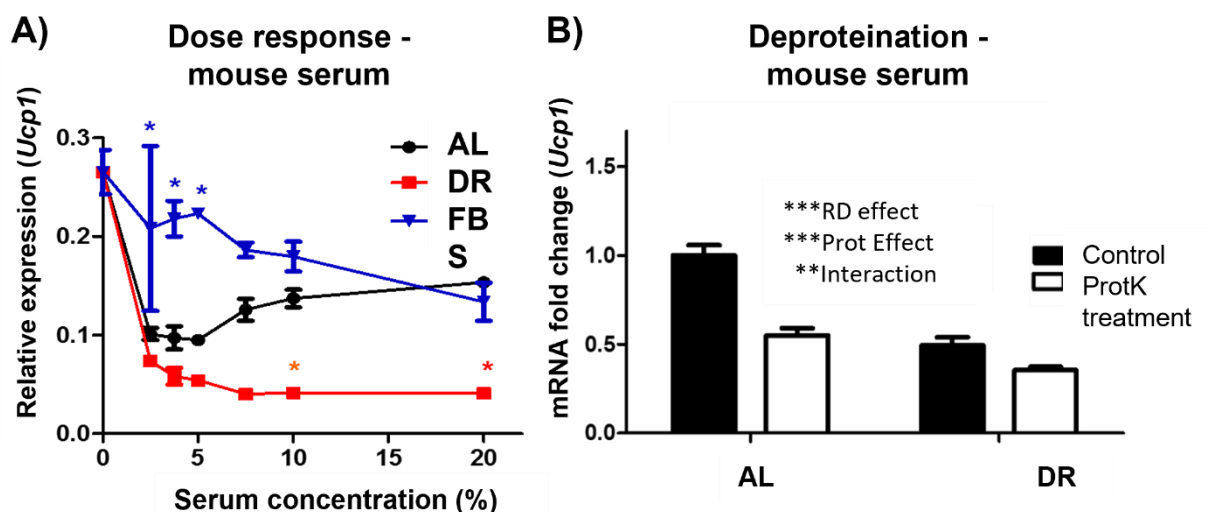


Figure 3. A protein component or protein-dependent molecule present in the serum of *ad libitum* mice induces *Ucp1* mRNA expression in 9B murine-differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old male mice were subjected to NIA's protocol of dietary restriction for one month. A) Dose-response curve after incubation with different concentrations of pooled serum samples for 24h. Each pool contained the serum of at least 10 mice. Each concentration point represents the mean of 3 experimental replicates. B) Sera from one cohort of animals were pooled (16 mice per pool) and treated (empty bars) or not (solid bars) with 50 μ g/ml proteinase K for 24h. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h

incubation with 7.5% serum. Values represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA).

Source: Adapted from my master's dissertation [91].

Downregulation of *Ucp1* expression in differentiated brown adipocytes by DR is consistent with a condition where energy needs to be conserved. In this sense, reducing UCP1 expression in the mitochondrial inner membrane could facilitate the passage of protons through ATP synthase to maximize ATP production. Reduction of UCP1 could also diminish the utilization of carbons from glucose and lipids to sustain BAT thermogenesis, thus conserving these molecules to be utilized by essential organs such as brain and heart. Although teleologically reasonable, the exact mechanism through which sera of DR mice lead to a reduction of *Ucp1* expression cannot be so easily anticipated. This is because browning of WAT (condition determined by increased beige cells that are UCP1+) happens in animals subjected to DR compared to AL-fed animals [95], together with no alterations in UCP1 protein or mRNA in the BAT [91]. This suggests that there are dominant factors that induce *Ucp1* modulation *in vivo* and act independently on BAT and WAT of dietary restricted animals (e.g., by the activation of the sympathetic nervous system [96] or by the infiltration and action of eosinophils and polarization of M2 macrophages [96][97]). Hence, circulating factors that control *Ucp1* levels are likely to act downstream as modulators of these factors. Also, although potent inducers of browning of WAT are upregulated in the circulation of mice and rats upon DR [49, 50], such as FGF21 and adiponectin [100], AL serum contains even more potent circulating factors that stimulate *Ucp1* and are missing in the serum of DR mice [91]. The characterization of this serum can lead us to a comprehensive guide to what serum sub-fractions are acting as brown adipose cell activators.

2. OBJETIVES

2.1. General objective:

To characterize the sub-fractions of the serum containing components whose levels are affected by dietary restriction and are capable of inducing *Ucp1* in murine brown adipocytes.

2.2. Specific objectives:

- A. Understand the role of some known upregulated proteins in AL serum (i.e., insulin and leptin) in modulating *Ucp1* expression in brown adipocytes *in vitro*
- B. Characterize rat serum effect over *Ucp1* expression in brown adipocytes *in vitro*
- C. Size-fractionate mouse and rat sera and test the effects of these fractions over *Ucp1* expression in brown adipocytes *in vitro*
- D. Test if the effect of mouse and rat serum over *Ucp1* expression depends on proteins
- E. Analyze the effect of mouse and rat serum metabolites from different classes over *Ucp1* expression in brown adipocytes *in vitro*
- F. Characterize the composition of mouse and rat serum molecules from one sub-fraction capable of inducing *Ucp1*
- G. Test candidate molecules among those characterized in specific objective [F] regarding their ability to modulate *Ucp1* expression in brown adipocytes *in vitro*
- H. Verify if the mouse and rat serum effect on BAT activation are translatable to humans

3. METHODS

3.1. Human samples

Patients were invited to participate by signing an informed consent form. All procedures were performed by ethical principles and approved by a local ethics committee (CAAE: 78577417.8.0000.5404).

Inclusion criteria were patients ranging from 18 to 65 years of age with obesity (IMC >30). Exclusion criteria for all groups were: significant intellectual limitation without adequate family support, uncontrolled psychiatric disorder, use of alcohol or illicit drugs, immunological or inflammatory diseases, Cushing's syndrome or other types of lipodystrophy or endocrine syndromes, liver diseases, acquired immunodeficiency (HIV), or coagulopathies.

Blood from participants who were subjected to bariatric surgery was collected 0 to 3 days before the surgery, which included diabetic and non-diabetic participants. Some of those individuals also had blood collected 6 and 12 months after surgery. It was centrifugated for separation of serum, which was then aliquoted and kept stored in a -80°C freezer until utilization. Adipose tissue of some individuals was collected during the surgery. The collected issue was immediately used for cell isolation purposes (described below in section 3.4). Blood was centrifugated for separation of serum, which was then aliquoted and kept stored in a -80°C freezer until utilization.

3.2. Animal care and diets

Wistar rats or C57BL/6J mice (protocol approved by CEUA nº 5449-1/2019; animals were acquired from CEMIB-UNICAMP) were kept until euthanasia in 12h/12h light and dark conditions with potable water sources. Control group animals were offered *ad libitum* food and in case of dietary restriction (DR), the protocol was performed according to the National Institute of Aging (NIA) [101] and as described before [95]. The diet was initiated when the animals were 14 weeks old. The diet started

with a one-week 10% reduction in food intake, a 25% reduction in the second week, and a 40% reduction in the third week until the end of the experiment (28 days in total). Offered food was calculated relative to ad libitum average consumption which was calculated weekly. A diet containing 40% of vitamin supplementation was offered to the DR group to prevent malnourishment [102]. Mice were euthanized on day 28 during morning hours, blood was collected, and centrifugated at 2000g for 10 minutes and the upper phase, which consists of the serum, was collected and stored in a -80°C freezer until utilization.

3.3. Mouse cells

For this study, we used brown immortalized pre-adipocytes lineage 9B that consisted of isolated adipocyte precursor cells from interscapular adipose tissue of newborn *ap2-ERT2(Cre)-Dicer^{lox/lox}*. Immortalization of the cells to generate the lineage was done by transduction of a lentivirus harboring the pBabe SV40 Large T antigen puromycin vector. Puromycin selection was performed and cells were evaluated for their ability to differentiate into mature adipocytes *in vitro*. 9B lineage generation was performed and described in [103].

3.4. Human preadipocyte isolation for primary culture

A total of 25 to 40g of subcutaneous adipose tissue from humans was collected. It was cut into small pieces in a petri dish. 25 to 30 ml of lysis buffer was added (3 ml of collagenase /mg of tissue in HBSS buffer - 2% BSA filtered in 0.22 µm) to approximately 10 g of tissue. All the content was kept at 37°C for 30-50 min in gentle agitation until it became homogenous, and the suspension was filtered in a 250 µm filter and collected in a separation funnel. After a quick rest, adipocytes floated, and the stromal vascular fraction (SVF) containing pre-adipocytes stayed in the infranatant. SVF was collected and put into a petri dish and was resuspended in basal culture medium, expanded, and frozen. As pre-adipocytes are adherents and other cell types remain on

the supernatant, after some washes and a couple of passages the remaining population consisted mainly of pre-adipocytes.

3.5. Cell maintenance and cellular differentiation to mature adipocytes

Cells were cultured with basal culture medium [DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics - penicillin (100 U/l), streptomycin (100 µg/ml)] and kept in a humid atmosphere containing 5% CO₂, at 37°C. Cells did not reach confluency unless differentiation for mature adipocytes was desired. The differentiation process starts when cells are 100% confluent (considered day 0). On day 2, it was added basal medium containing a drug cocktail: insulin (20nM), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (125 µM), T3 (1nM), indomethacin (125µM), dexamethasone (2µg/mL) and rosiglitazone (1µg/mL). On day 4, the medium was changed to basal medium containing insulin, T3, and rosiglitazone, in the same concentrations. On day 6, cells were added basal medium containing insulin and rosiglitazone only. On day 8, the medium was substituted for the basal culture medium for 24 hours to remove the influence of previously added drugs, and after this period treatments with serum, fractions or compound were performed [104].

3.6. Cell treatment with serum

Cells were differentiated as described above. On day 9, wash with PBS 1X was performed once and then FBS was replaced for 7.5% of the mouse, rat, or human serum or serum fractions, if not specified otherwise. After serum fractionation, each fraction was reconstituted to the initial volume used for fractionation. After 24h, cells were washed once with PBS 1X and harvested with the appropriate reagent for subsequent analysis.

3.7. Gene expression

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's specifications, with mild modifications. 300ul of TRIzol was added to each well of a 48-well plate containing the cells, and cells were scraped and collected. 60ul of chloroform was added and the solution was mixed vigorously. Centrifugation (14000g-15 min) was performed, and 100ul of the upper phase was collected with care not to disturb or collect interphase-containing DNA. To the upper phase, it was added 25ul of sodium acetate 3M, pH 5,2, 1ul of the coprecipitate glycoblue, and 126ul of isopropanol. The mixed solution was incubated overnight in a -20°C freezer. Centrifugation (14000g -10 min) was performed to generate a pellet, and after discarding the supernatant, the pellet was washed with 500ul of ethanol 75%, with one more centrifugation (7600g-5 min) and the supernatant was removed. The pellet was let dry and then resuspended in RNase-free water. 500ng of RNA was used to synthesize cDNA with Multiscribe reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and random hexamers. qPCR was performed with 7,5ng of cDNA with 1x SYBR Green Master Mix and PRiMErs (0,025uM) for Ucp1 (Fw: CTGCCAGGACAGTACCCAAG; Rev: TCAGCTGTTCAAAGCACACA). Relative expression was calculated by $2^{-\Delta Ct}$ with endogenous normalizer 36B4 (Fw: TTTGACAACGGCAGCATTTA; Rev: CCATTGATGATGGAGTGTGG). These experiments were previously performed in our lab and published in [92].

3.8. Size fractionation protocol

Pore Size or Nominal Molecular Weight Limit (NMWL) Amicon® centrifugal filters were used to fractionate serum by molecule size. 100-500ul of serum was added to a 100kDa filter coupled to an Eppendorf tube and was centrifugated, remained volume in the filter (retained part) was collected by inverting the filter to a new Eppendorf and centrifugated (fraction >100kDa). The flow through of this process was collected and added to a 50kDa filter. The same process was performed for this and the subsequent filters, proceeding with subjecting the flow-through to 50-kDa, 30-kDa, 10-kDa, and 3-kDa NMWL filters, in this order. Centrifugation speed and time for each filter is described in the table below. Each of the retained parts and the flow-through of the 3-

kDa filtration were reconstituted to the initial volume. Cells were incubated with DMEM containing antibiotics and 7.5% of each reconstituted fraction for 24h.

Filter	Centrifugation time to the passage of the flow through (14.000g)	Centrifugation time to collect the retained part (1.000g)
100 kDa	10 min	2 min
50 kDa	10 min	2 min
30 kDa	10 min	2 min
10 kDa	15min	2 min
3 kDa	15min	2 min

3.9. Deproteinization protocol

Protocol 37/37 - Serum from animals subjected to DR or AL diet was incubated with proteinase K (50ug/ml) and antibiotics - penicillin (100 U/l), streptomycin (100 µg/ml) – for 24h 37°C in a thermocycler with heated (95°C) lid. The serum of the control group was incubated only in the presence of antibiotics for the same time and temperature. At the end of the incubation, the control group serum was added to inactivated proteinase K to a final concentration of 50µg/ml, which consisted of enzyme incubated in PBS for 24h. At the end of the process treatment media was prepared by adding culture medium DMEM with antibiotics and 53.7µM of EDTA (concentration known not to kill or detach cells from the bottom of the plate) to serum for a final concentration of 7.5% of serum.

Protocol 37/95 – This protocol was performed equal to protocol 37/37 with the only difference being that treatment media was heated to 95°C for 10min and let to cool down for 30min before cell treatment.

Protocol 37/55 – This protocol was performed equal to protocol 37/37 with the only difference being that treatment media was heated to 55°C for 2h and let to cool down for 30min before cell treatment.

3.10. Solid phase extraction (SPE)

Each column was attached to a cartridge that were placed on a vacuum manifold which was used to control the solvent flow rate through the cartridges. Each column was calibrated first with methanol and then washed with 1% formic acid in water. The sample was added and let sit for 10 minutes for molecules to interact with the column. A specific solvent was determined according to the molecule type desired to obtain for each column. It was added in the order described below and eluted fractions were collected after each solvent flow. Fractions were air dried by speed vac and then were reconstituted with water. Those that did not directly dissolve in water were placed in a bath sonicator until complete resolution.

Column	Solvent used for Fraction 1	Solvent used for Fraction 2	Solvent used for Fraction 3	Solvent used for Fraction 4
Oasis HLB	-	3% ACN + 0,1% Formicacid	60% ACN + 0,1% Formicacid	100% ACN
Oasis PRiME HLB	No solvent (flowthrough collected)	1%Formic acid i water	N-Hexane	100% methanol

3.11. LC/MS-based metabolomics

Untargeted metabolomic analysis was performed by a Waters Xevo G2-XS ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS, Waters, Milford, Massachusetts). A column ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 mm, Waters Corporation) was used for chromatographic separation with a flow rate of 0.3 mL/min. Data was obtained by mass spectrometry with MSE mode. Blank samples and quality control samples (made by mixing equal volumes of serum fractions) were analyzed before and after injections to evaluate the data repeatability [105][106]. The raw data were first processed using Metaboanalyst for peak integration, and retention time alignment. Lipidomics data (including all ion features with their RT, m/z , and peak intensity) were extracted and normalization was conducted by using QC samples to effectively uncover differential lipids. The feature differences between groups were analyzed with the Student's t -test based on the distribution characteristics of the data. The value of $FDR < 0.05$ was considered to indicate significant differences. The main parameters were as follows: Interquartile Range Reduced to 2500 feature; normalization to sample median; Data transformation to Log10 Normalization; data range Scaling. Masses of interest were analyzed in the HMDB database to unveil annotated metabolites. The main parameters were as follows: mass error, 10 ppm; adduct type: M-H for the negative mode of the polar phase or M+H for the positive mode of the polar phase.

3.12. N-Acylglycines conjugation with BSA and micellar dilution

BSA conjugation – N-Acylglycines diluted in DMSO were added to a solution of culture media DMEM high glucose containing 0,5mM BSA, FA free, to make a stock BSA-diluted solution with the final concentration of 2,5mM N-acylglycines and 1,25% DMSO. Solutions were incubated overnight at 37°C, aliquoted and stored at -20°C. The solution was composed of FFA:BSA of 5:1 ratio (mol/mol), which did not exceed biological conditions in the serum [107].

Micellar formations – N-Acylglycines powder was mixed with miliQ water and sonicated until the resolution of precipitated to a final concentration of 6mM (C7-Gly) and 1,5mM (C-11-Gly).

3.13. Statistics

Results were presented as mean value +/- SEM. The t-student test was performed when comparing two groups. ANOVA test was performed when comparing three or more groups, followed by an appropriate *post hoc* test. For correlations, the Pearson test was done.

4. RESULTS

4.1. Leptin or insulin do not explain the differences in *Ucp1* expression of brown adipocytes exposed to AL vs. DR serum

As a first attempt to identify circulating molecules that could explain the differences in *Ucp1* levels observed in brown fat cells after incubation with serum of mice subjected to AL vs. DR, we took a candidate approach and looked specifically at insulin and leptin. This is because these two hormones are classically down-regulated after DR [108][109][110]. Also, at this point, we were directing our attention towards protein molecules, as our previous results indicated that proteins could be responsible to induce *Ucp1* expression in mouse AL serum, compared to DR serum [91].

The hypothesis was that those proteins were responsible for the differential expression of *Ucp1* in brown adipocytes *in vitro*. To make sure we rescued insulin or leptin amount in the DR serum up to the levels found in AL mice, we first measured insulin and leptin levels in AL or DR serum using ELISA commercial kits. We used the difference found in the mean concentration value for supplementation of the sera, i.e.,

655.18 pg/ml of insulin and 403.17 pg/ml of leptin. We treated the brown fat cells for 24h with sera supplemented or not with the hormones and then measured *Ucp1* mRNA.

We observed that leptin was not able to rescue the effect of AL serum or to stimulate *Ucp1* expression (Figure 4A). On the other hand, insulin was able to stimulate *Ucp1* when added to either AL or DR serum. Hence, insulin not only rescued *Ucp1* levels but increased these levels by approximately 2-fold when compared to non-supplemented serum (Figure 4A). That may have happened either because of an overestimation of the initial insulin levels or because of the nature of the insulin used in the treatment, i.e. bovine insulin (cat. I6634, Sigma). Indeed, insulin from different species may act with different potency [111].

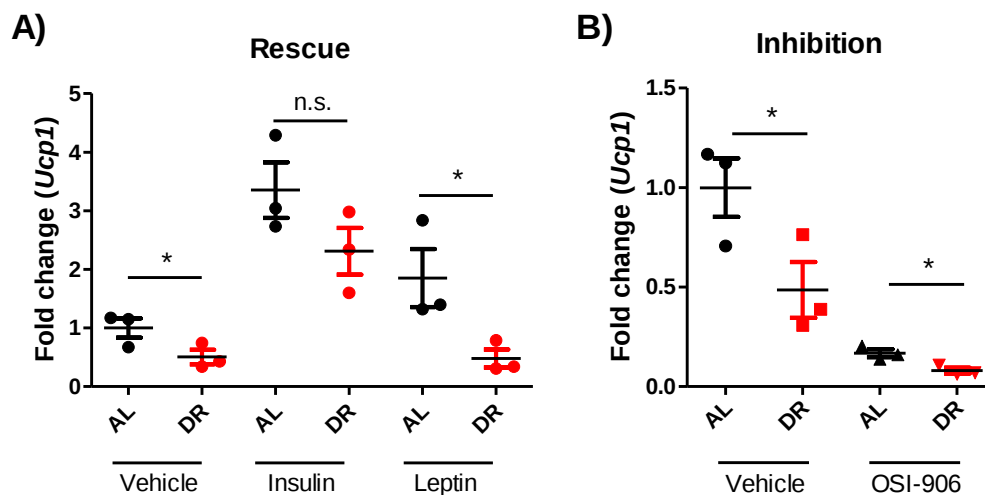


Figure 4. Contribution of insulin and leptin pathways to dietary restricted mouse serum effect over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old mice were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B-BAT differentiated cells after 24h of mice serum incubation. A) Cell were incubated with serum-supplemented or not with 655.18 pg/ml of insulin and 403.17

pg/ml of leptin. B) Cells were pre-incubated with or without 710 nM of OSI-906 (insulin/IGF1 inhibitor) and then incubated with 7.5% of serum. Sera from one cohort of animals were pooled and each pool contained sera of at least 16 mice. Values represent mean $\pm$ SEM of 3 experimental replicates. * $p < 0.05$ (Student's t-test). n.s., not significant.

In any case, even though we were able to identify that insulin can stimulate *Ucp1*, to check if this was the factor responsible for the differences in *Ucp1* expression upon AL vs. DR serum incubation, we inhibited insulin/IGF1 receptors with the antagonist OSI-906. The results indicate that even though insulin in serum can stimulate *Ucp1* in differentiated brown adipocytes, the initial serum effect observed in *Ucp1* levels was not dependent on insulin/IGF1 signaling as shown by no interaction after the two-way ANOVA test. In other words, after the inhibition of the receptors, the differences in *Ucp1* remained similar to serum treatment without the inhibitor (Figure 4B).

4.2. Incubation of brown adipocytes with rat serum affects *Ucp1* expression in a dose-dependent manner and is influenced by DR

Due to the complexity of the serum and because we excluded obvious candidates, we decided to pursue an unsupervised strategy that could help us to identify fractions in the serum responsible for *Ucp1* induction. First, we investigated if the behavior of rat serum reproduced the behavior of mouse serum. This would help us to have access to more serum volume per animal as well as to demonstrate evolutionary conservation. We performed a dose-response experiment using up to 20% of rat serum incubated with murine, differentiated brown adipocytes and analyzed *Ucp1* expression. Even though 5% incubation is already sufficient to render differences between AL and DR, the dose-dependent increase in *Ucp1* expression in

response to AL serum was observed only between 15-20% of serum (Figure 5A), which is higher than observed in mice (7.5%-10%) (Figure 3A [91]), indicating that the component of the rat serum that acts as an *Ucp1* inducer is less potent, less abundant, or more unstable than the one present in mouse serum. To confirm that AL serum contains an *Ucp1* inducer, and to exclude the possibility it is the DR serum that contains *Ucp1* inhibitors, we incubated the cells with a mixture of both AL and DR serum to analyze serum interaction. As observed in Figure 5C, DR serum was not able to block the induction of *Ucp1* exerted by the AL serum, demonstrating that AL serum does contain an inducer of *Ucp1* that acts independently of any inhibitor that DR serum may have. One important difference observed between mouse and rat sera is that incubation with mouse serum at lower concentrations evidences a potent *Ucp1* inhibitor (i.e., *Ucp1* expression decreases in comparison to 0% (Figure 3A [91])), however, this is not observed using rat serum (Figure 5B). This information is important while analyzing the effects of the subfractions on the *Ucp1* transcript.

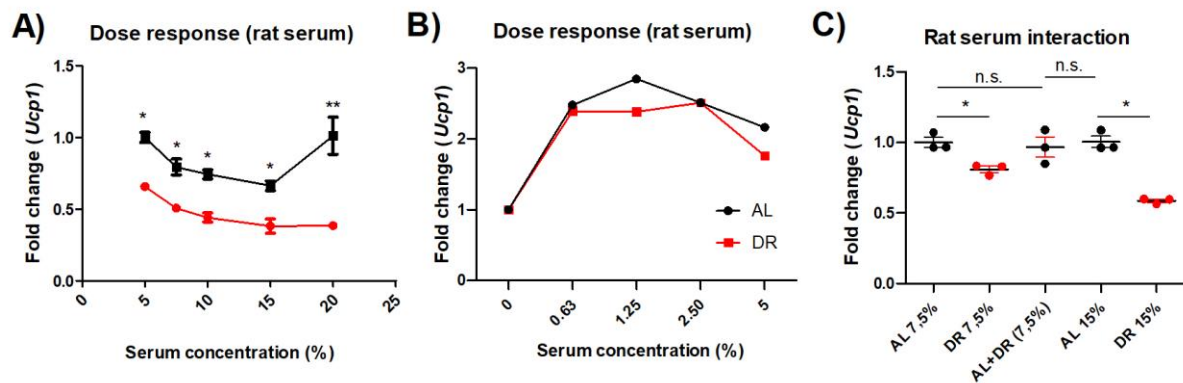


Figure 5. Effect of serum of rats fed *al libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old male rats were subjected to NIA's protocol of dietary restriction for one month. 9B differentiated cells after incubation with a pool of sera from those animals. Each pool contained the serum of at least 7 rats. Each concentration point represents the mean of 3 experimental replicates. *Ucp1* expression was measured by

RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h incubation. (A/B) Dose-response curve after incubation with higher (A) or lower (B) concentrations of pooled serum samples. (C) Cells were incubated with the indicated concentration of pooled sera from each group individually or in combination. Values represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA with Bonferroni post-test); n.s., not significant.

4.3. The differences between AL vs. DR serum are recapitulated by a fraction containing molecules/complexes with more than 100 kDa

To proceed with the characterization of the component(s) of the AL serum that promote(s) *Ucp1* expression, we performed size fractionation by filtering the serum samples according to their Nominal Molecular Weight Limit (NMWL). For this fractionation, mouse and rat serum samples were subjected to a series of subsequent filtering procedures, starting with filtration through a 100-kDa NMWL Amicon-Ultra filter unit and proceeding with subjecting the flow-through to 50-kDa, 30-kDa, 10-kDa, and 3-kDa NMWL filters, in this order. Each of the retained fractions and the flow-through of the 3-kDa filtration step was used to re-test for the capacity of the sub-fractions to downregulate *Ucp1* expression in mouse, differentiated brown preadipocytes.

The fraction responsible for the differential effect on *Ucp1* transcript between AL and DR appears to have a size larger than 100 kDa (Figure 6A). Interestingly, in mice, all fractions containing molecules/complexes of less than 100 kDa increased *Ucp1* levels in differentiated brown preadipocytes in comparison to the high molecular weight fraction (>100 kDa, Figure 6A). That means that fractions containing molecules larger than 100 kDa contain a serum factor responsible for *Ucp1* inhibition or lack inducers of *Ucp1* expression. However, the effect of the higher molecular weight fraction seems to be robust and occurs in both AL and DR conditions.

We performed the same fractionation protocol with rat serum and, like observed in mice, the rat serum factor responsible for *Ucp1* modulation is also a

molecule/complex larger than 100 kDa, since this was the only fraction able to reproduce the same pattern when compared to the integral serum after *in vitro* treatment (Figure 6B). Lower molecular weight AL serum fraction sizes lost the initial ability to increase *Ucp1* expression, suggesting that there is a >100 kDa molecule/complex/vesicle that is present in AL serum but absent in DR serum which can induce *Ucp1*. On the other hand, different from mouse serum, cells treated with small-sized (<100kDa) rat serum present a different pattern in *Ucp1* expression and likely do not contain the same potent *Ucp1* inhibitor.

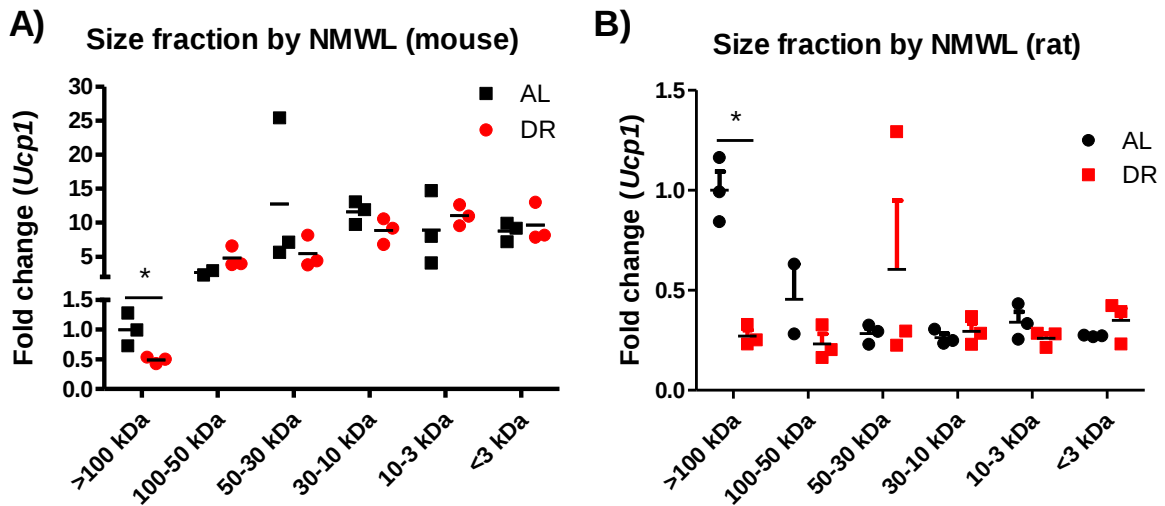


Figure 6. Effect of different molecule sizes within the serum of rats or mice fed *ad libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old mice (A) or rats (B) were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. Sera from one cohort of animals were pooled and fractionated according to their NMWL. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h incubation with 7.5% of fraction reconstituted to initial volume. Values represent the mean of 3 experimental replicates of pools of at least 16 mice or 7 rats per group. * $p < 0.05$ (Student's t-test).

4.4. The differences between AL vs. DR serum require proteins to be manifested

Next, we attempted to deproteinize serum samples with proteinase K to verify if the effects on *Ucp1* required a protein to occur. The protocol of deproteinization initially used consisted of incubating the serum with proteinase K or vehicle for 24 hours at 37°C (protocol 37/37). Using this process, proteinase K was expected to degrade proteins in the serum and at least partly degrade themselves in an auto-catalytic manner. At the end of the process, pre-treated serum was added to differentiated brown adipocytes along with EDTA, which decreases the stability of the remaining proteinase K, at a concentration known not to detach or kill the cells [112]. We observed previously that molecules in mouse serum responsible for inducing *Ucp1* were likely proteins or depend on proteins to act, as mouse serum treated with proteinase K brings the *ad libitum* serum effect down to the DR effect [91]. However, in this protocol, protein content was only partially degraded as observed after electrophoresis in an acrylamide gel (data not shown). When, however, we changed the protocol, where the serum was heated to 95°C for 10 min to inactivate proteinase K after incubation at 37 °C for 24h (protocol 37/95), the effect observed was a large increase in *Ucp1* expression regardless of the type of the serum (AL or DR) (Figure 7A). Again, as observed in the >100 kDa murine serum fraction (Figure 6A), these results point to the presence of a serum factor responsible for *Ucp1* inhibition that is sensitive to high temperature, that could be either a large protein or complex structure sensitive to heat.

For rat serum, we performed protocol 37/37 as described above and another protocol where we inactivated the enzyme at 55°C for 2 hours (protocol 37/55). We used the former protocol instead of protocol 37/95 since we wanted to minimize the effect of heat on other molecules. However, it was not possible to conclude the role of rat serum proteins over *Ucp1* after deproteinization by this protocol because we could not observe the expected DR serum effect in the

downregulation of *Ucp1* compared to the AL group after cell incubation with control serum (not treated with proteinase K) (Figure 7B, C). The fact that control serum was also subjected to the same heat conditions used to inactivate proteinase K, with the only difference being that it lacked the presence of the enzyme, indicates that the rat molecule responsible for *Ucp1* modulation is more thermounstable (Figure 7A), as previously suspected and described in section 3.5.2..

We could conclude, therefore, that the mouse serum effect on *Ucp1* expression is at least partially dependent on proteins, but it remains unknown if the same is true for rat serum as this hypothesis could not be tested by the protocol applied. While this finding can indicate that there is a protein responsible for this effect, another possibility would be that another molecule depends on a protein for its action (e.g., lipids carried by proteins).

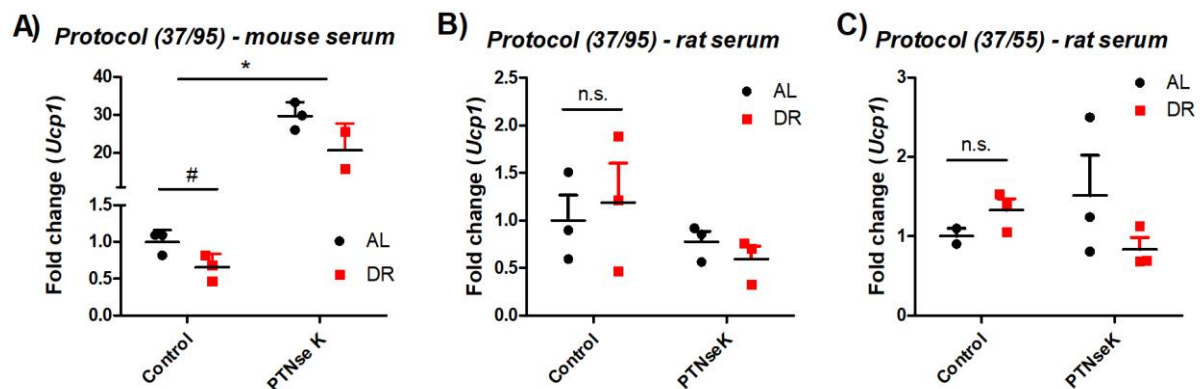


Figure 7. Effect of deproteinated serum of rats or mice fed *al libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old mice were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. Sera from one cohort of animals were pooled and treated with proteinase K by different protocols. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h incubation with 7.5% of pooled serum. A) Pooled mouse serum was treated or not with 50 µg/ml of proteinase K for 24h at 37°C.

B) Pooled rat serum was treated or not with 100 µg/ml of proteinase K for 24h at 37°C, then it was heated to 95°C for 10min. C) Pooled serum was treated or not with 100 µg/ml of proteinase K for 24h at 37°C, then it was heated to 55°C for 2h. Values represent mean $\pm$ SEM of 3 experimental replicates of pools of at least 16 mice or 7 rats per group. A) * $p < 0.05$ (Two-way ANOVA, treatment statistics). A-C) $\# < 0.05$ (Student's t-test). n.s., not significant. PTNse K, Proteinase K.

4.5. A fraction of serum containing hydrophobic metabolites recapitulates the differences between AL and DR

To continue the serum characterization, we used the SPE method to isolate metabolites from different molecular classes. Since by this methodology it is not possible to recover proteins, this is yet another method for deproteinization and can contribute to further evaluating the effect of proteins on the serum. We subjected rat and mouse serum to SPE columns and analyzed how different fractions affected *Ucp1* expression in murine, differentiated brown adipocytes after 24h incubation. Two different columns were used: Oasis HLB and Oasis PriME HLB. Columns will be referred to as HLB and PriME, respectively, to avoid name confusion. Column physical characteristics and solvents used to elute molecules after column interaction were designed to recover molecules based on their hydrophilic, amphipathic, or hydrophobic characteristics. In table 1, it is possible to observe examples of molecules that are expected to be extracted on the eluted fraction of each column. After the required time of interaction with the column, molecules were eluted with the proper solvent, and samples of each fraction were powdered dried, and resuspended in water with sonication to be able to treat the cells without solvent toxicity. Even though every solvent used was highly volatile and by this process, no toxicity was expected, it is possible that acetonitrile used in the elution in fraction 4 from HLB column residues remained in the tube in some of the samples as in one or more experiments with this group we observed evidence of cell death with all cells

detaching from the wells. Another possibility is that this solvent interacted with one or more molecules present in this fraction producing toxic products.

Table 1. Expected extracted molecules in each fraction after solid phase extraction.

Column	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
Oasis HLB	-	Amino acids/ small peptides	Carnitine/ nucleotides	Hydrophobic metabolites
Oasis HLB	PriME Flow-through	Soluble	Phospholipids	Other lipids

Changes in *Ucp1* levels when comparing AL and DR serum treatment (Figure 8, A-F) could be recapitulated in the most hydrophobic fractions of each column, i.e., fraction 4 (Figure 8, E, F), although rat serum fraction 4 from the PriME column did not result in significant differences (Figure 8, F).

Even though the sample lost to the tube is expected from a water-based hydrophobic solution, we observed that we could still successfully recover approximately half of the amount from the input sample, probably in micellar-like formations, since sonication process applied in the resuspension protocol is expected to generate micelles. Importantly, the spectrum from the recovered sample is qualitatively comparable to the left-over as indicated by LC/MS-based metabolomics profiling analysis (data not shown), indicating that we still ended up with a representative sample after recovery.

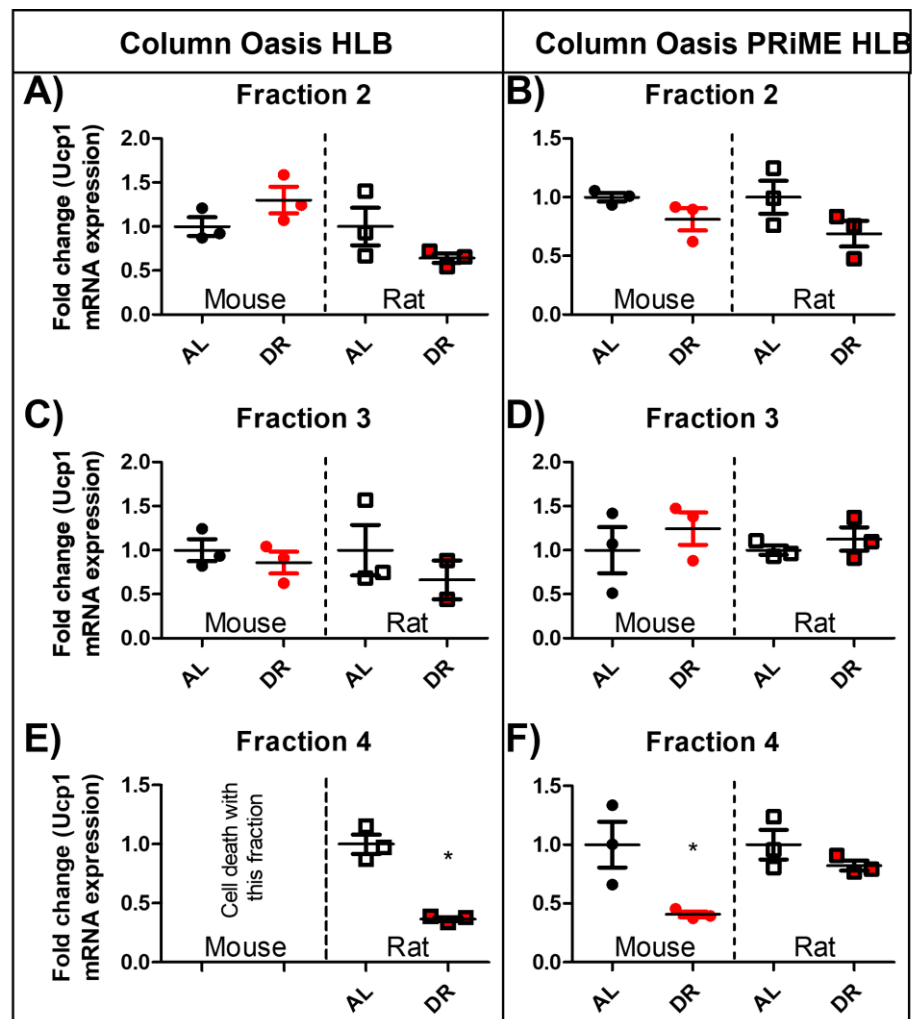


Figure 8. Effect of serum SPE fractions of rats or mice fed *al libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old mice were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h incubation with 7.5% of pooled serum fractions. Serum fractions were obtained by SPE in the columns Oasis HLB (A, C, E) or Oasis PRiME HLB (B, D, F). Hydrophilic fraction 2 (A, B), amphipathic fraction 3 (C, D), and hydrophobic fraction 4 (E, F) were used incubation and flowthrough fraction 1 was not used. Values represent mean $\pm$ SEM of 3 experimental replicates of serum fractions of pools of at least 16 mice or 7 rats per group. * $P < 0.05$ (Student's t-test).

Likewise the serum in its integral form, we were expecting to find inducers of *Ucp1* that are present in the serum of AL-fed animals that is decreased or absent in DR serum, as shown by our dose-response experiments [91]. To verify if this was also true for this fraction 4, which recapitulates the phenotype observed with unfractionated serum, we performed a dose-response experiment using up to 15% of rat or mouse fraction 4 serum after SPE using the PriME column. We treated mature brown adipocytes for 24h and analyzed *Ucp1* expression. We intended to do the same with the fractions of the HLB column, but for this replicate, even for the rat samples we experienced cell death after incubation with these fractions. Indeed, results show that AL mouse fraction 4 from the PriME column increase *Ucp1* expression at higher concentrations, which did not happen with the DR fraction 4 (Figure 9A). Rat PriME fraction 4 did not show a clear pattern as observed with the mouse serum, indicating that the molecule is either not present, very low, or is not differentially abundant between the diet groups (Figure 9B). Hence, it was clear that an active metabolite is decreased in mouse serum fraction 4 from the PriME column and is not differentially present or very low in the rat serum fraction 4 from the PriME column.

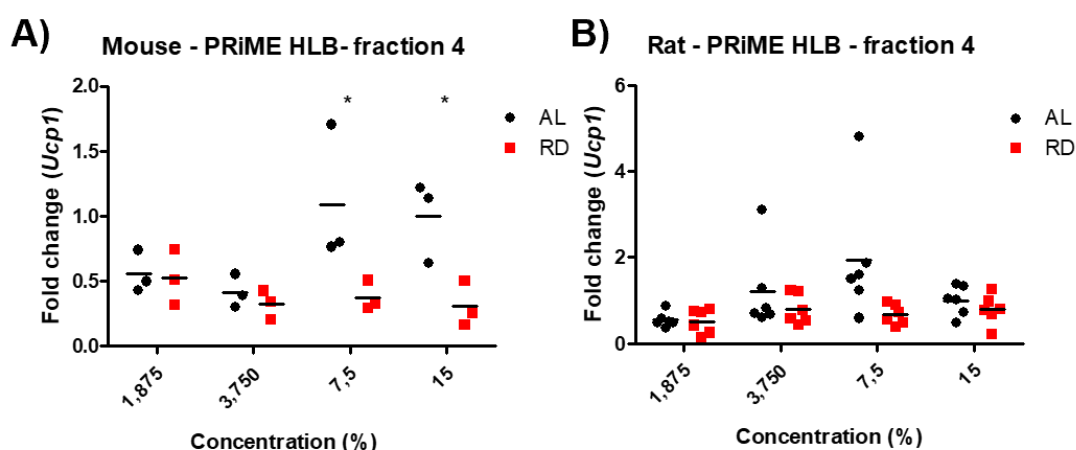


Figure 9. Effect of serum SPE fraction 4 of rats or mice fed *al libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Twelve-week-old mice or rats were subjected to

dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after 24h incubation with different concentrations of pooled serum fraction 4. Serum fractions were obtained by SPE in the columns Oasis HLB (A)) or Oasis PRiME HLB (B). Values represent mean $\pm$ SEM of 3 experimental replicates of serum fractions of pools of at least 16 mice or 7 rats per group. * $P < 0.05$ (Student's t-test).

4.6. LC-MS analysis of mouse and rat serum fraction 4 from SPE with PRiME HLB column reveals candidate *Ucp1* modulators

As the lipophilic fraction of the mouse and rat sera reproduced the phenotype observed with the whole serum even in the absence of proteins, we decided to characterize the composition of this lipid fraction.

In collaboration with Dr. Adriana Leandra Santoro, we performed untargeted LC/MS-based metabolomics/lipidomics analysis in the serum fraction 4 from the PRiME column of both rodent species. Since we observed cell death in some replicates after treatment with the HLB fraction 4, leading to a lack of data to confirm the reproducibility of results and problems with possible toxicity effects using these samples, we decided to focus on the PRiME column. Because molecules in this serum fraction were expected to be hydrophobic due to the solvent used to elute them, we used a hydrophobic column to resolve them on the mass spectrometer. The strategy we decided to follow to prioritize molecules of interest consisted in determining the retention time and molecular mass of molecules that are higher in AL vs. DR, clustering them according to their pattern, and comparing them between species, to then identify the metabolites whose characteristics align with the experimental findings. Figure 10A and 12A present a flowchart for the strategy used to select candidate molecule to be used for following up tests and the summary of features selected in each step from the negative (Figure 10) or positive (Figure 11) mode of the polar phase.

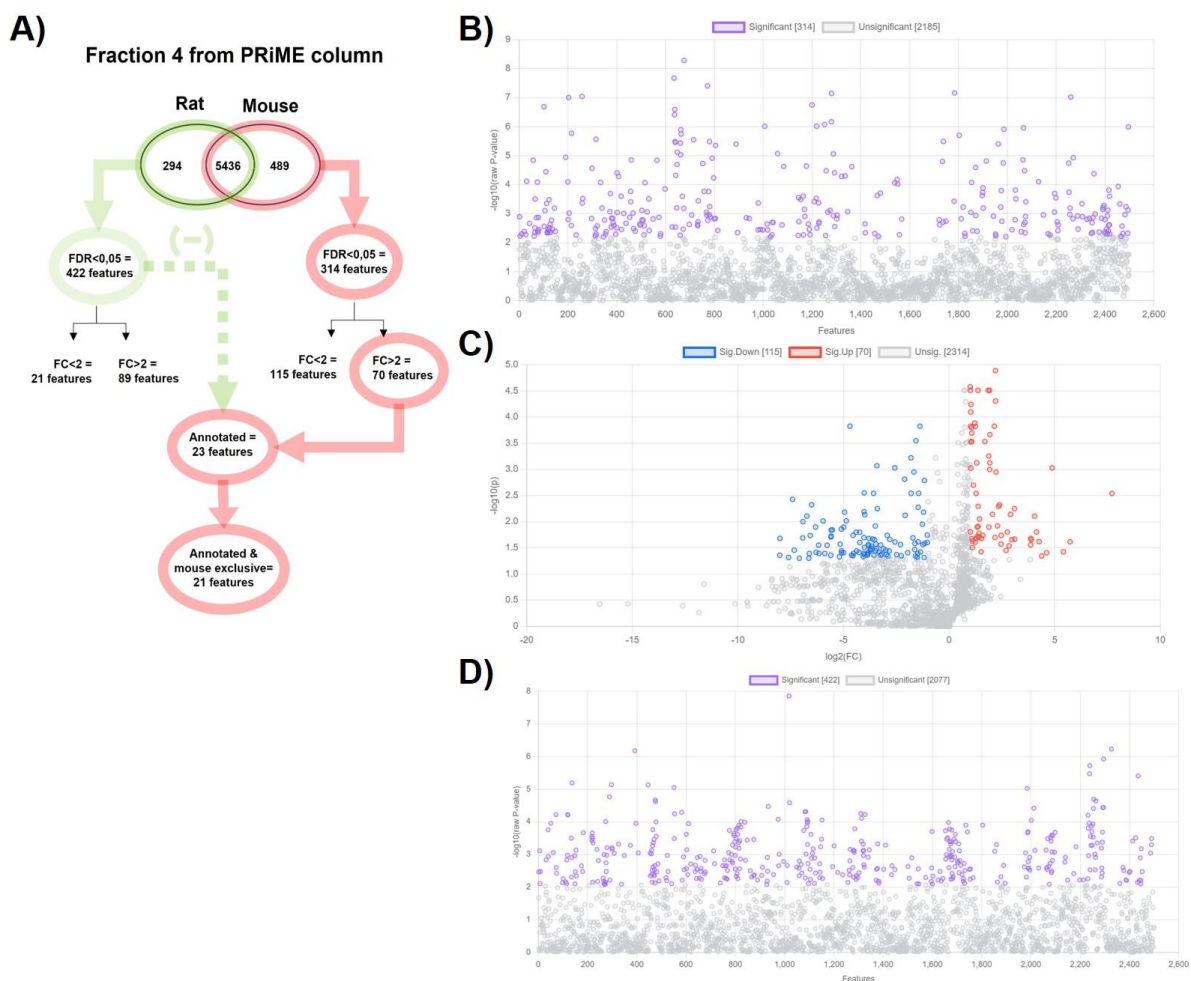


Figure 10. LC/MS-based metabolomics of serum SPE fraction 4 of rats or mice fed *ad libitum* or subjected to dietary restriction diet and selection of candidates in the negative mode of polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PRiME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize, and process the data in the negative mode of the polar phase. A) Flowchart for the strategy used to select candidate molecule to be used for following up tests and the summary of several features selected in each step. B, D) Graph representation of metabolites statistically different (FDR<0,05) between AL and DR serum fraction 4 of mice (B) or rat (D) and the number of detected features.

C) Volcano plot of metabolites statistically increased or decreased in mice AL group by 2-fold.

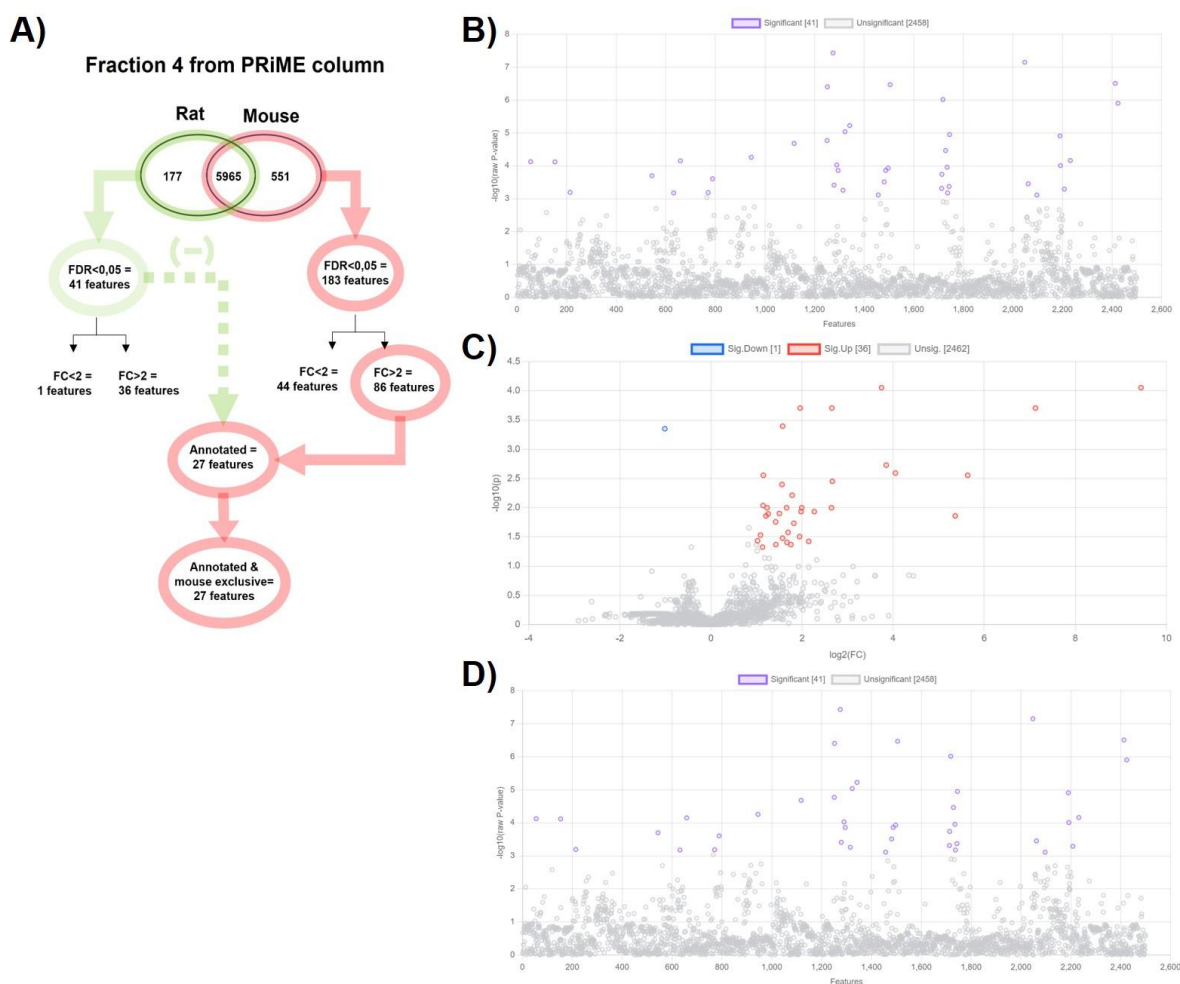


Figure 11. LC/MS-based metabolomics of serum SPE fraction 4 of rats or mice fed *ad libitum* or subjected to dietary restriction diet and selection of candidates in the positive mode of polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PRiME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data in the positive mode of the polar phase. A) Flowchart for the strategy used to select candidate molecule to be used for

following up analyzes and the summary of several features selected in each step. B, D) Graph representation of metabolites statistically different ($FDR < 0.05$) between AL and DR serum fraction 4 of mice (B) or rats (D) and the number of detected features. C) Volcano plot of metabolites statistically increased or decreased in mice from AL group by 2-fold.

Analyzing the negative mode of the polar phase of the samples, we obtained 5925 different features in the mouse serum fraction 4. We then used Metaboanalyst to filter, normalize and process the data. We selected the differentially abundant features between the AL and DR groups that presented $FDR < 0.05$ ending up with 314 candidates (Figure 10B).

As we were only interested in molecules upregulated in the AL group, we performed a volcano plot to select, within those statistically relevant molecules, those that were increased at least 2-fold, which represent 1/3 of all differentially abundant molecules, meaning 70 molecules in total (Figure 10C). We then used the HMDB database to predict which metabolite each feature represented and of the 70, only 23 had annotated matches.

Rat fraction 4 from the PRiME column was not able to affect *Ucp1* expression in murine cells even in higher concentrations (15%), indicating that the effector molecule present in the mouse fraction was not present, too low, or was not differentially abundant in the same rat fraction. Therefore, we used this information to help narrow the candidate molecules even further. Mass spectrometer analysis captured 5730 features in rat serum fraction 4 from the PRiME column, in which 5436 could be considered common metabolites between the rat and mouse fraction 4 from the PRiME column. Using Metaboanalyst to filter, normalize, and process the rat data, we selected 422 features differentially abundant between the AL and DR groups that presented $FDR < 0.05$ (Figure 10D). We then analyzed if any of those were also common to those 23 annotated candidates we selected from the same mouse fraction and observed that 2 of them were (Figure 12). Hence, they were excluded from possible candidates because if they were effectors of *Ucp1* expression we would see differential expression of this gene after *in vitro* incubation with this

fraction. Of course, this would not happen if the concentration of the metabolite in rat samples was too low to have an effect, but this was not the case as there was no drastic difference in the concentration among mouse and rat samples. Even though it is not possible to establish absolute values of metabolite concentration in our untargeted analysis, the peak intensity of those 2 excluded molecules indicates they are similar in quantity, making their exclusion valid.

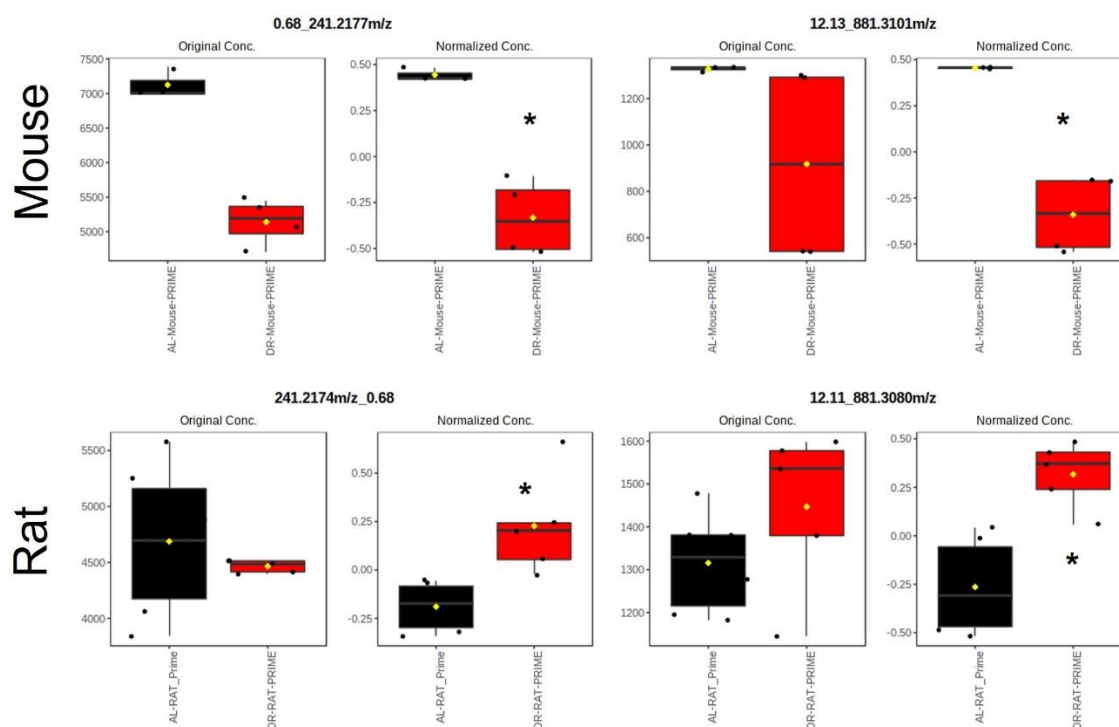


Figure 12. Excluded metabolites for follow-up analysis as potential modulators of *Ucp1* expression. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PRiME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data in the negative mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates 2-fold increased metabolites (FDR<0.05) in mouse AL compared to DR serum fraction 4 and common metabolites to rat differentially expressed metabolites (FDR<0.05) were selected. *p<0.05 (Student's t-test, statistics only performed in normalized concentration graphs).

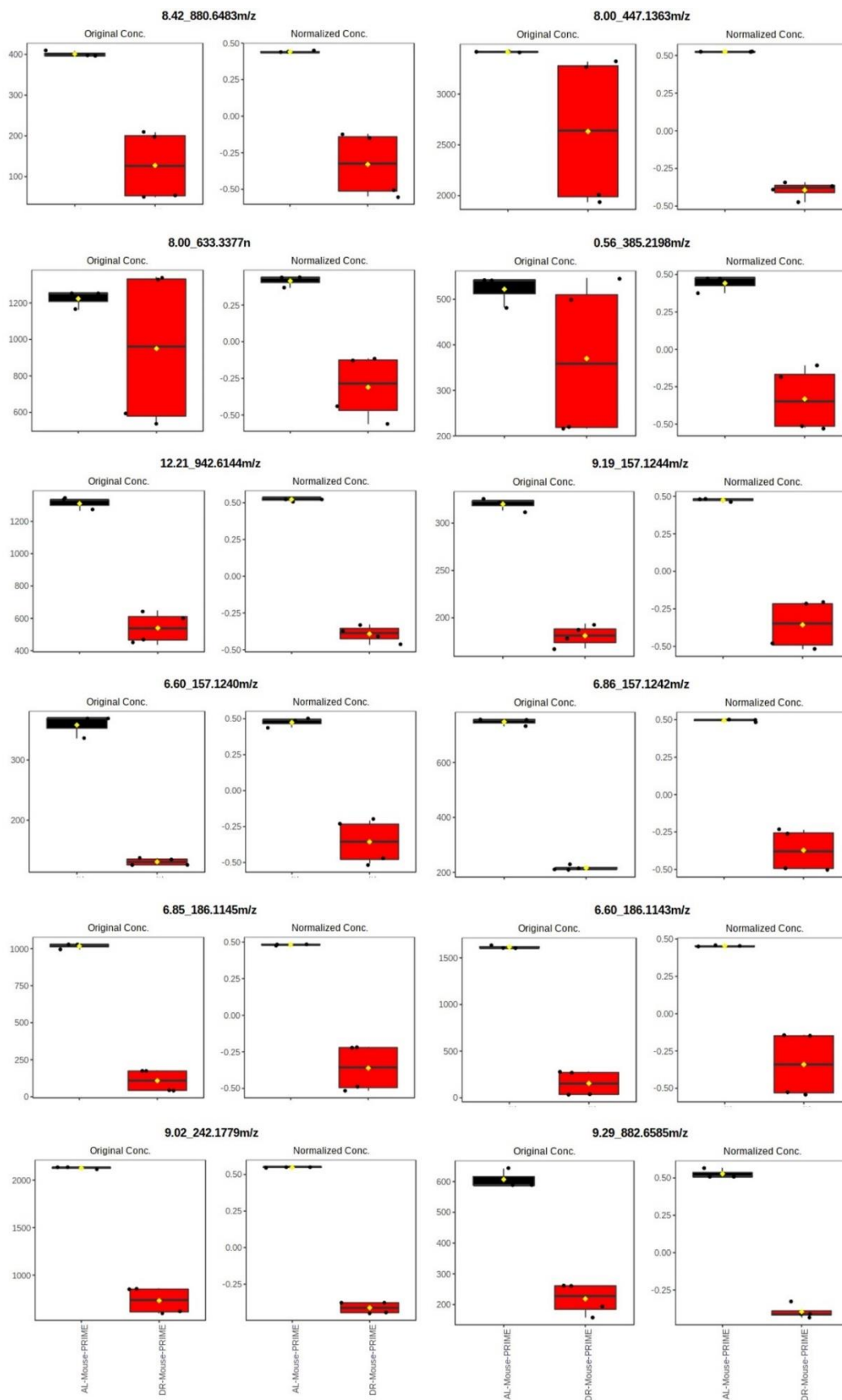


Figure 13. First group of metabolites selected for follow-up analysis as potential modulators of *Ucp1* expression from the negative mode of the polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PRiME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data in the negative mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates with 2-fold increased metabolites with $FDR < 0.05$ in the AL group compared to DR serum fraction 4 and exclusive to mice in this serum fraction. Statistics were only performed in normalized concentration graphs and for all $FDR < 0.05$.

From the negative mode of the polar phase, we selected 21 annotated candidates that were at least 2-fold upregulated in AL vs. DR and found them to be exclusively differentially abundant in mouse PriME fraction 4. Graph representation of peak intensities before data normalization and proportional values after data normalization of each candidate can be found in Figures 13 and 14. Fold change and annotated matched metabolites are listed in table 2.

The same pipeline was used to analyze the positive mode of the polar phase of the samples and for those we obtained 6516 different events in the mouse serum fraction 4. Those events may represent equal or different metabolites than those obtained in the negative mode of the polar phase. Using Metaboanalyst to filter, normalize and process the data, we selected the differentially abundant features between the AL and DR groups that presented $FDR < 0.05$ and we ended up with 183 candidates (Figure 11B). From those, we selected molecules that increased at least 2-fold in AL vs. DR (Figure 11C), representing 86 molecules in total. We then used the HMDB database to predict which metabolite each feature represented and of those 86 selected molecules only 27 had annotated matches.

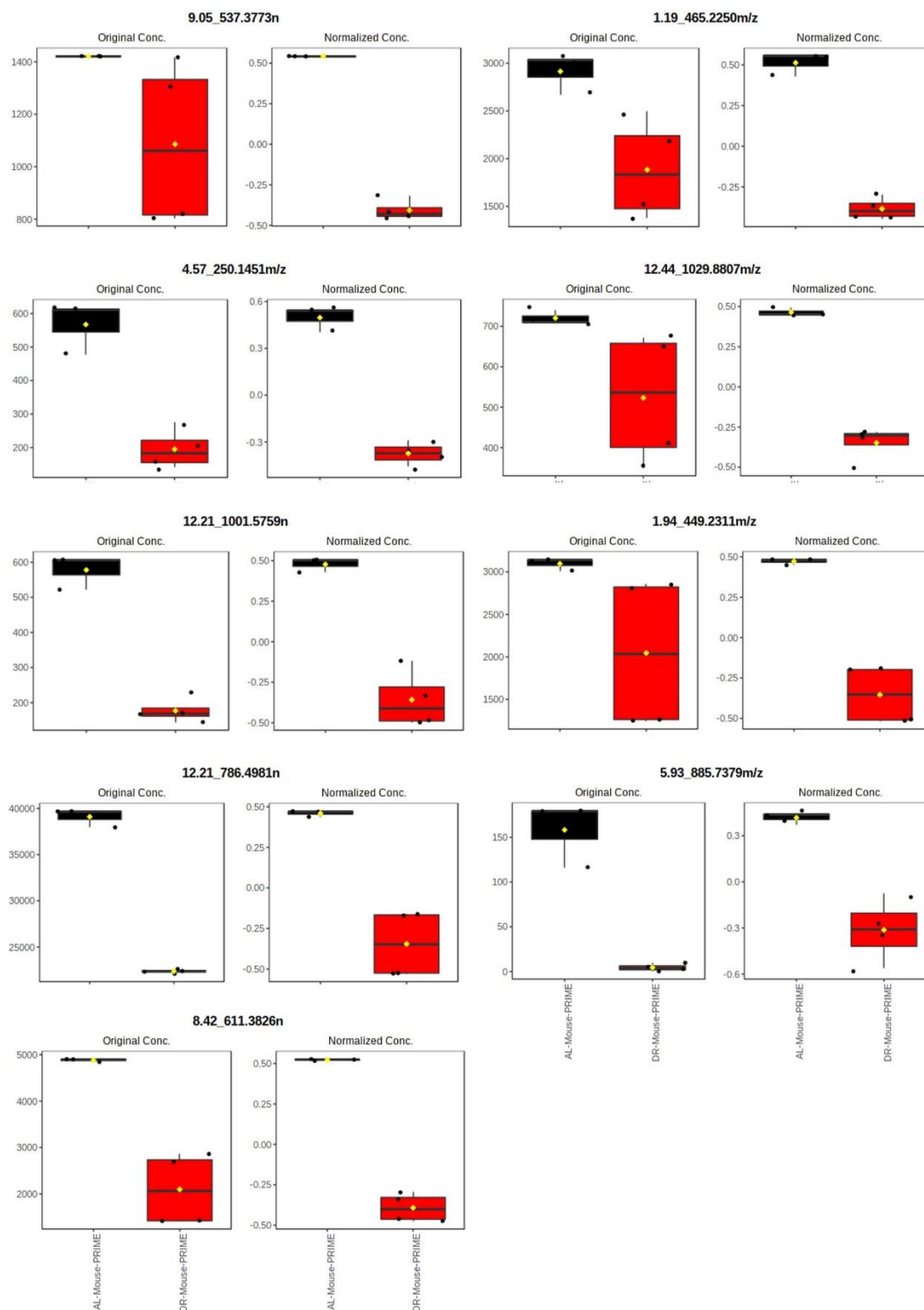


Figure 14. Second group of metabolites selected for follow-up analysis as potential modulators of *Ucp1* expression from the negative mode of the polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad*

libitum diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PriME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data in the negative mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates with 2-fold increased metabolites with $FDR < 0.05$ in the AL group compared to DR serum fraction 4 and exclusive to mice in this serum fraction. Statistics were only performed in normalized concentration graphs and for all $FDR < 0.05$.

We again looked to rat fraction 4 from PriME to exclude those differentially abundant in this fraction. Mass spectrometer analysis captured 6142 events in rat serum fraction 4 from the PriME column, in which 5965 could be considered common metabolites between rats and mice. Using Metaboanalyst to filter, normalize and process the rat data, we selected 41 features differentially abundant between the AL and DR groups that presented $FDR < 0.05$ (Figure 11D). We then analyzed if any of those were also common to those 27 annotated candidates that we selected from the same mouse fraction but none of them were.

From the positive mode of the polar phase, we selected 27 annotated candidates that were at least 2-fold upregulated in AL vs. DR and exclusively differentially abundant in the mouse PriME fraction 4. Graph representation of peak intensities before data normalization and proportional values after data normalization of each candidate can be found in Figures 15, 16, and 17. Fold change and annotated matched metabolites are listed in table 3. It is possible to notice that in Tables 2 and 3 more than one output molecule name was sometimes assigned to the same features. This happens because different molecules can have the same molecular mass, and with this information alone it is not possible to infer structural characteristics. Therefore, the certainty of which molecules our candidate features represent can only be confirmed after validation matched with analytical standards. Hence, we ended up with 48 candidate features that could represent effector molecules that stimulate *Ucp1* expression.

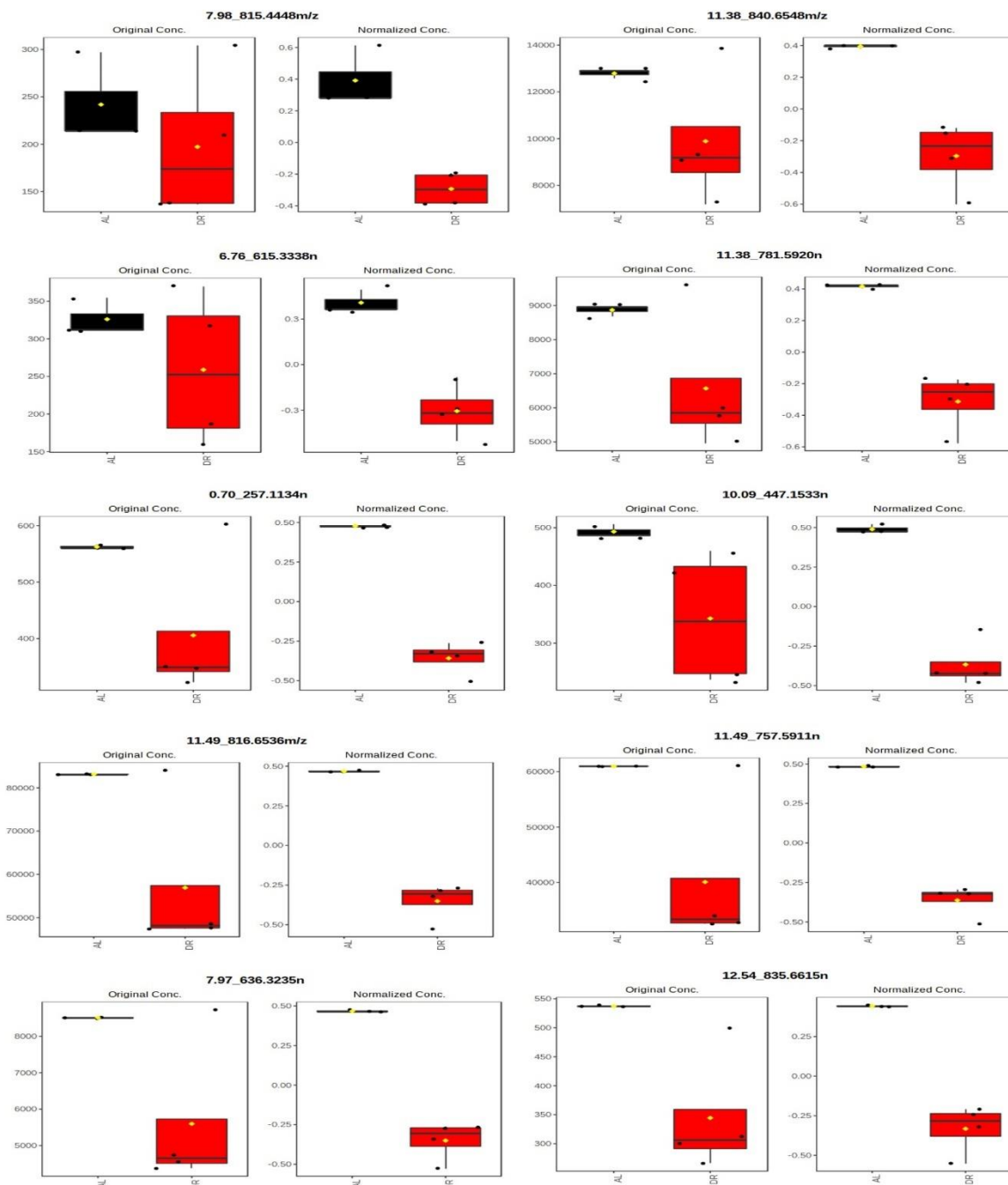


Figure 15. First group of metabolites selected for follow-up analysis as potential modulators of *Ucp1* expression from the positive mode of the polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PrIME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data

in the positive mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates with 2-fold increased metabolites with $FDR < 0.05$ in the AL group compared to DR serum fraction 4 and exclusive to mice in this serum fraction. Statistics were only performed in normalized concentration graphs and for all $FDR < 0.05$.

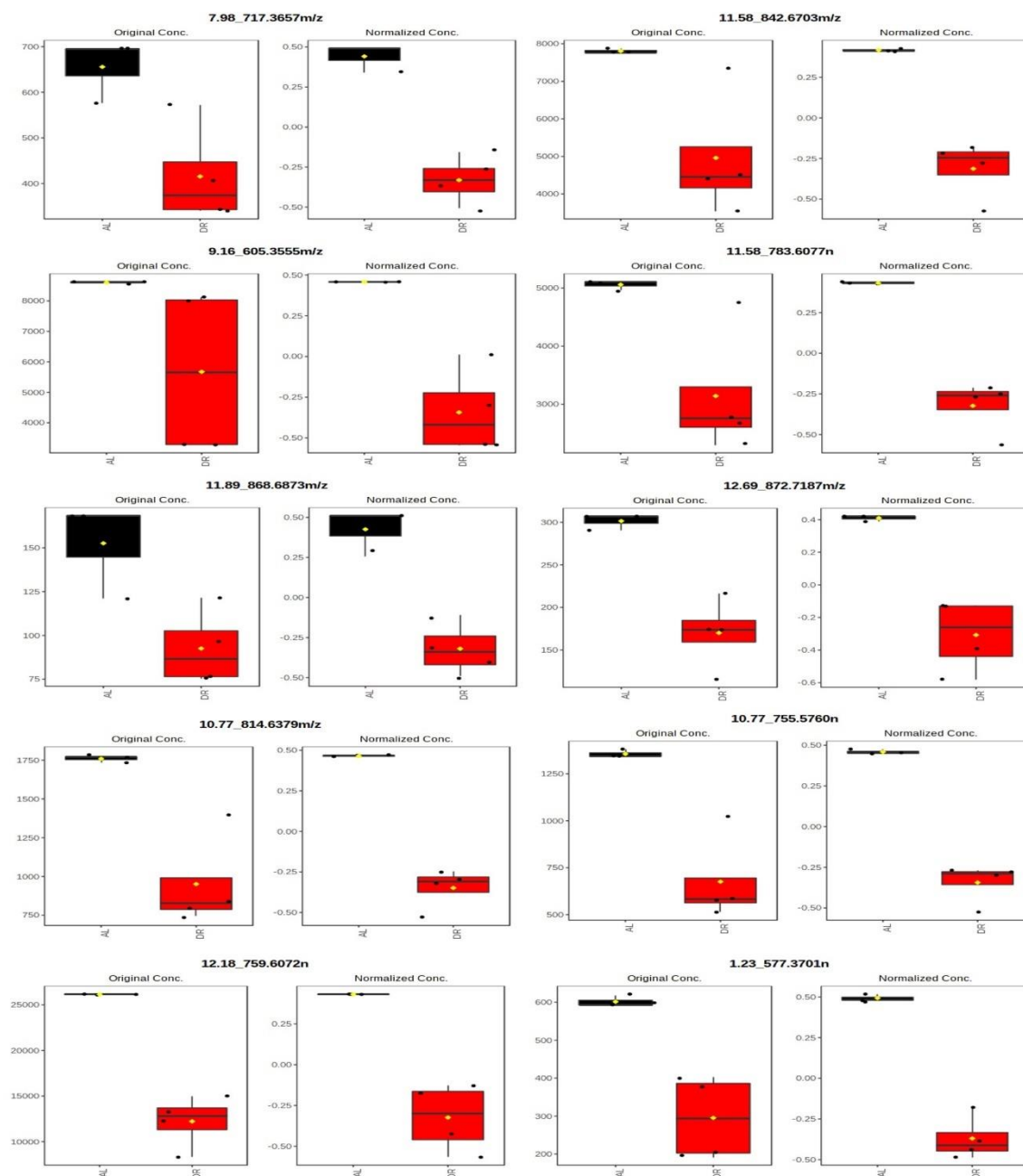


Figure 16. Second group of metabolites selected for follow-up analysis as

potential modulators of *Ucp1* expression from the positive mode of the polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PrIME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize and process the data in the positive mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates with 2-fold increased metabolites with FDR<0.05 in the AL group compared to DR serum fraction 4 and exclusive to mice in this serum fraction. Statistics were only performed in normalized concentration graphs and for all FDR<0.05.

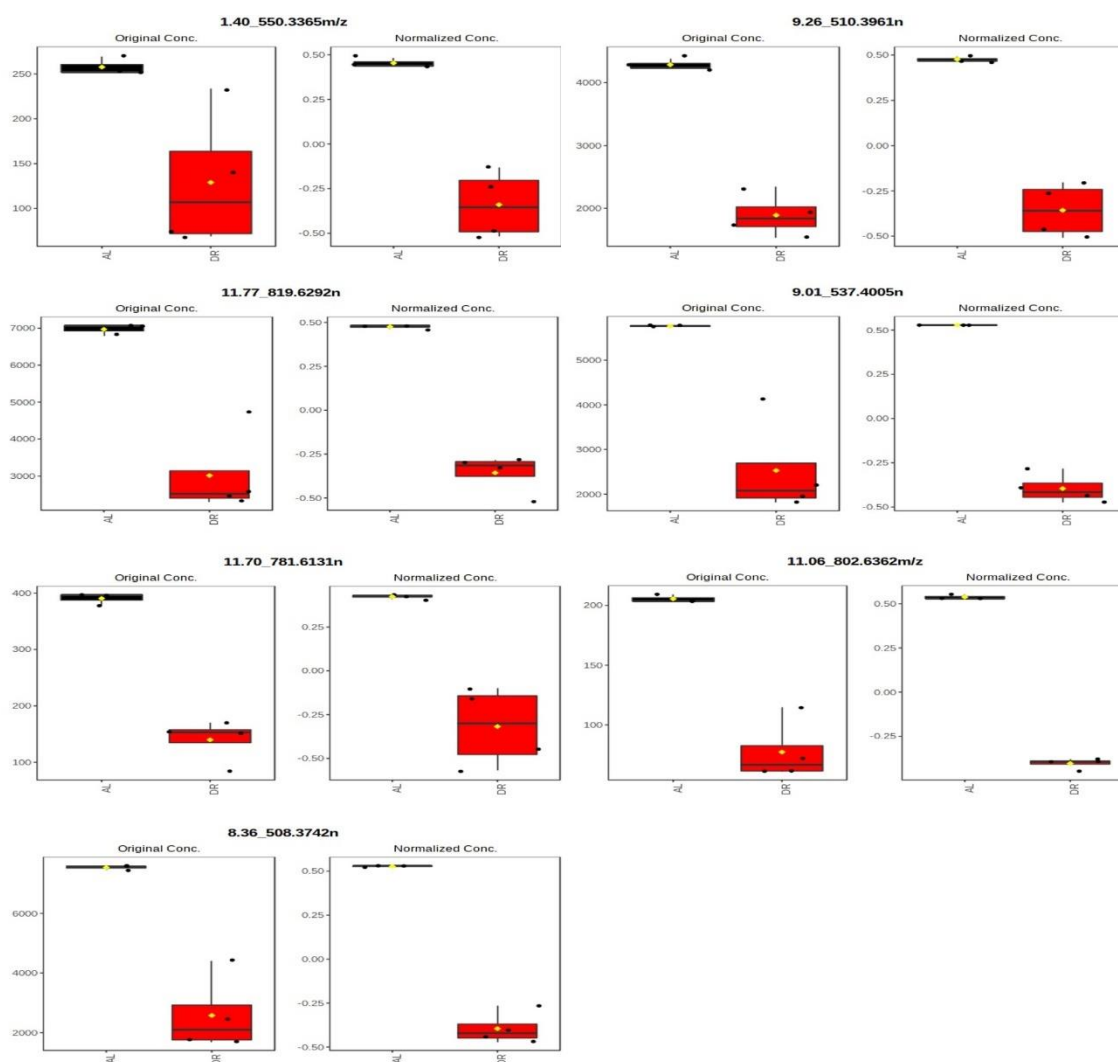


Figure 17. Third group of metabolites selected for follow-up analysis as potential modulators of *Ucp1* expression from the positive mode of the polar phase. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PriME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed and Metaboanalyst was used to filter, normalize, and process the data in the positive mode of the polar phase. HMDB program was used to select annotated candidates with 2-fold increased metabolites with FDR<0.05 in the AL group compared to DR serum fraction 4 and exclusive to mice in this serum fraction. Statistics were only performed in normalized concentration graphs and for all FDR<0.05.

4.7. Medium-chain N-acylglycines with 7 and 9 carbons induce *Ucp1* expression

We studied the fraction 4 from the PriME column composition to verify if any feature pointed towards potential molecules that could represent effector molecules that stimulate *Ucp1* expression. We decided to give preference to those that did not have too many (more than 5) annotated names related to the same feature, as it would make it difficult to know which metabolite represented the real match. Also, we gave preference to metabolites commercially available that could be tested promptly.

We observed that among all the molecules, two of them were assigned as N-acylglycines, i.e., N-heptanoylglycin (C7-Gly), related to mass 186.114m/z, and N-undecanoylglycine (C11-Gly), related to mass 242.176m/z, with fold changes of 16.5/19.2 and 4.6, respectively. We then decided to seek additional N-acylglycines in our dataset. We analyzed raw peak intensities data related to all detected metabolites and observed that N-nonanoylglycine (C9-Gly) was highly downregulated in DR samples (Figure 18), but probably did not appear in the final list of metabolites due to the initial

filtering process in Metaboanalyst that prioritized more abundant features. Those identified to possibly be palmitoylglycine (C16-Gly) and pentadecanoylglycine (C15-Gly) were not differentially abundant between AL and DR (Figure 18).

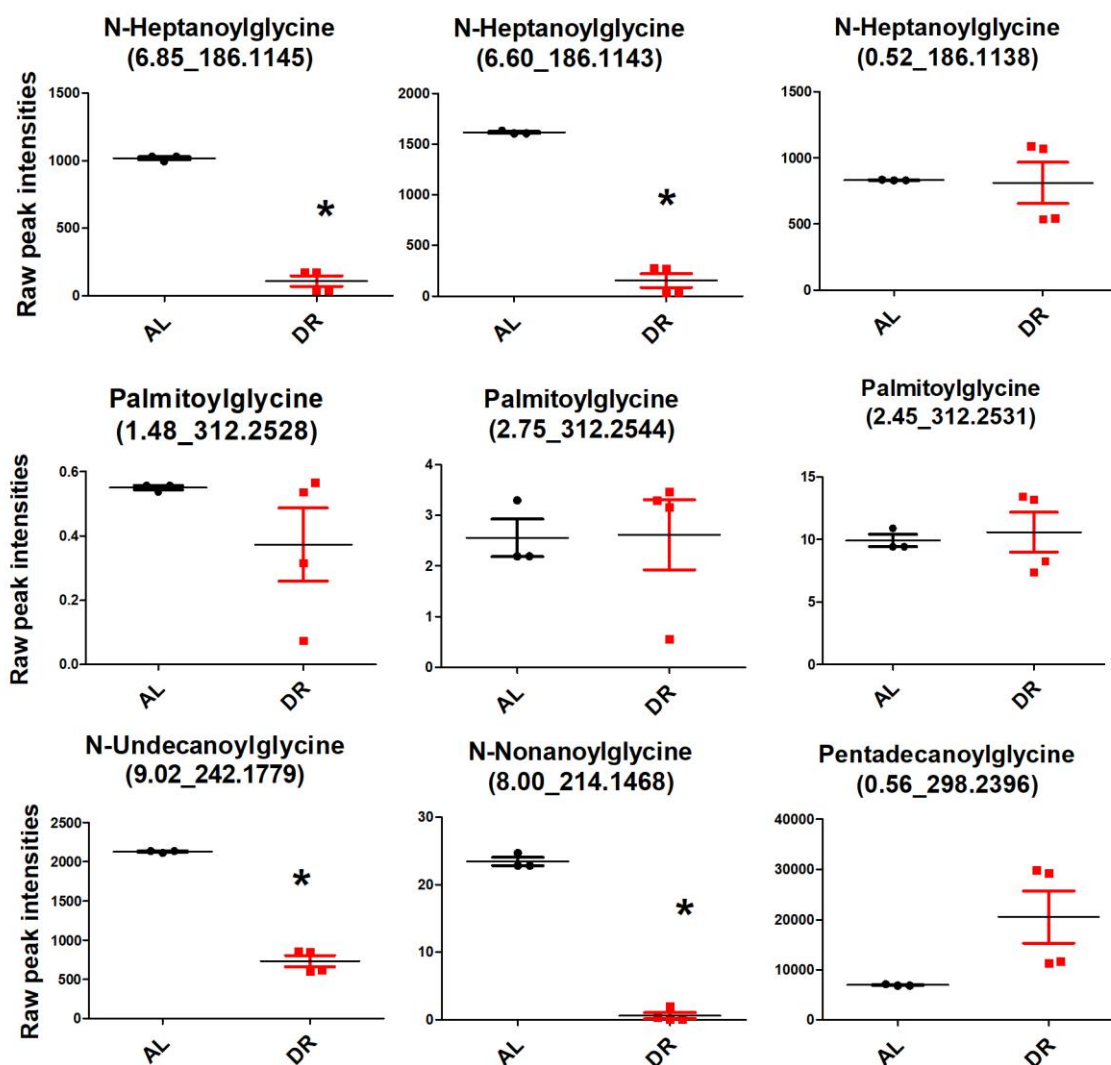


Figure 18. Candidate selection of N-acylglycines as *Ucp1* modulators. Twelve-week-old mice or rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. A pool of serum from one cohort was fractionated by SPE in column Oasis PriME HLB. LC/MS-based metabolomics of eluted fraction 4 was performed. HMDB program was used select masses that matched with N-acylglycines. Raw peak intensities data was used to evaluate statistical differences. *p<0.05 (Student's t-test)

The presence of many metabolites of the same class differentially abundant between AL and DR serum and the high fold change of some of them led us to hypothesize that those N-acylglycine molecules or related pathways were involved in *Ucp1* expression modulation.

First, we evaluated the viability of brown adipocytes in the presence of different dilutions and concentrations of C7-Gly and C11-Gly (Figure A-C), as well as triheptanoin (THN) (Figure 19 D), a triglyceride that contains three fatty acids with seven carbons (C7:0). We tried different forms of dilutions as little information is available regarding the mechanism of action or delivery of this compound. Also, considering that the differences between AL and DR serum relied upon molecules or complexes present in a high molecular weight fraction which depended on proteins to act, it would be reasonable to think that if N-acylglycines indeed induced *Ucp1*, they would require a carrier or other facilitator to reach cells. While DMSO (Figure 19A) is commonly used to dilute hydrophobic compounds and drugs, secreted or newly formed N-acyl amino acids in the blood are present in an active free form or bound to an albumin carrier in its inactive form as described previously [78]. Therefore, we also conjugated the N-acylglycines with BSA (Figure 19C). On the other hand, the SPE fraction 4 extracted from serum is not expected to contain any proteins in their composition. Indeed, molecules in this fraction were expected to be found in micellar formations after resuspension; therefore, similar dilution was also performed (Figure 19B). None of the concentrations used up to 100 μ M were toxic to the cells (<90% viability) when incubated for 24h in the presence of FBS (Figure 19), except for 100 μ M of C11-Gly diluted in DMSO that presented mild toxicity (Figure 19A).

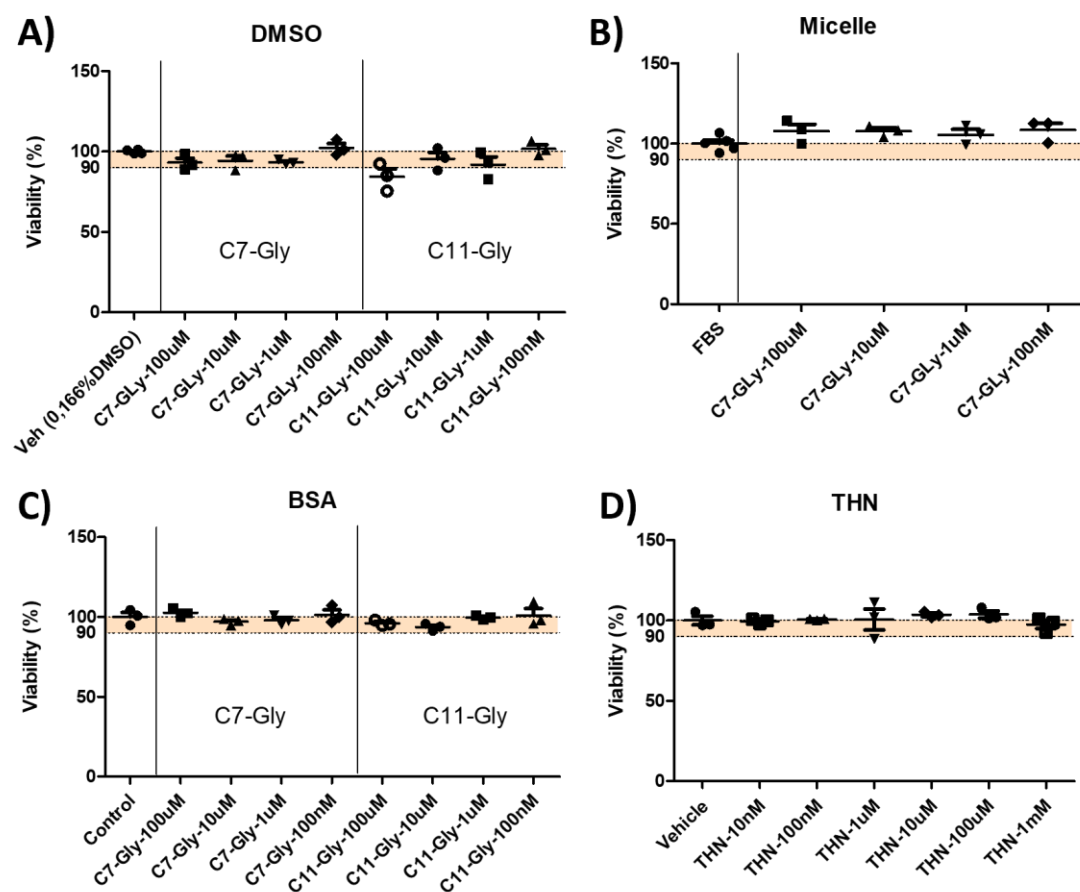


Figure 19. N-Acylglycines and Triheptanoin are not toxic to brown cells even in high concentrations. Viability was measured by MTT assay in 9B differentiated cells after 24h incubation with different concentrations of N-Acylglycines (A-C) and Triheptanoin (D). A,D) compounds were diluted in DMSO (DMSO concentration in cells was always <0,25%). B) compounds were eluted with sonication until a clear solution was observed and micellar formations were formed. C) compounds were conjugated with BSA, fat acid-free. Values represent mean $\pm$ SEM of 3 experimental replicates and no statistical significance was found.

A study that analyzed shorter N-acyl amino acids (that did not include C7-Gly or C11-Gly) on their ability to induce brown adipocyte differentiation [64] reported that the phenomenon was observed when cells were incubated with concentrations between 1μM and 100μM. Based on this, we first tested if the incubation of 9B brown adipocytes

with the highest non-toxic concentration (i.e., 10 μ M) could modulate *Ucp1* expression. The experiment was performed in the presence of FBS for 24h, however no effect was observed (Figure 20 A,B,C).

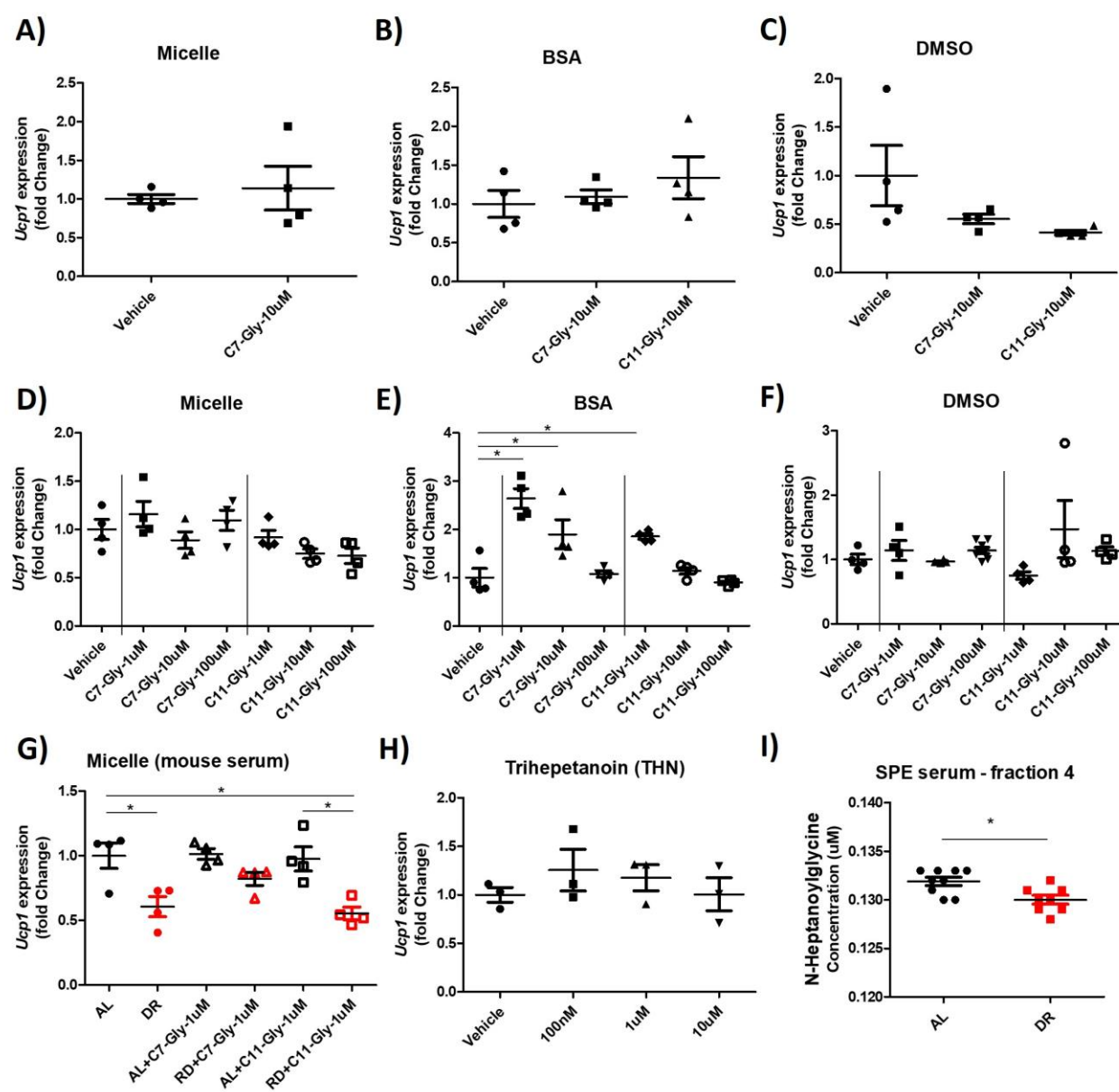


Figure 20. Effect of N-Acylglycines and Triheptanoin on brown adipocyte *Ucp1* expression. A-H) *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B differentiated cells after incubation with of N-Acylglycines (A-G) and Triheptanoin (H). Incubation was performed in culture media containing 10% FBS for 24 hours (A, B, C, G, H) or 6

hours in a serum-free media (D, E, F). Vehicle from DMSO groups contains 0,166% of DMSO (C,F) or 0,25% of DMSO (H). Samples containing BSA, including vehicle of the group contain 20 μ M of BSA and 0,166% DMSO. (B, E). I) C7-Gly concentration in mice serum fraction 4 from SPE. A-H) Values represent mean $\pm$ SEM of 4 experimental replicates. * $p < 0.05$ (One-way ANOVA with Dunnett post-test). I) Values represent mean $\pm$ SEM of 3-5 experimental replicates from 2 independent cohorts. * $p < 0,05$ (student's t-test).

To eliminate the possibility that bovine serum components were hampering the effects, we decided to evaluate the effect of the N-acylglycines in a serum-free condition and also because all previous experiments were performed without serum or in the presence of mouse serum. To prevent cell death caused for long periods of incubation without serum we incubated the cells with C7-Gly and C11-Gly for 6 hours. AL vs DR serum effect on *Ucp1* expression was previously shown to be already present after 6h of incubation [91]. BSA-conjugated C7-Gly at the concentrations of 1 μ M and 10 μ M and C11-Gly in the concentration of 1 μ M were able to increase the expression of *Ucp1*, however these effects were not seen with higher concentrations (Figure 20E). DMSO dilution and micellar formation of those fatty acids were not able to modulate *Ucp1* expression at any concentration used (Figure 20D,F). By incubating the cell with AL or DR serum in the presence or not with 1 μ M of N-acylglycines eluted in the micellar form we observed that DR serum with C7-Gly was able to approach the AL serum effect (Figure 20G). By using a standard curve, C7-Gly was validated to be decreased in SPE fraction 4 of mouse DR serum compared to AL serum with average concentrations around 130nM (Figure 20I).

Table 2. Annotated matched metabolites from the negative mode of the polar phase

Fold Change	Retention time_ MS peak	Formula	Monoiso_ Topic mass	Adduct (m/z)	Delta (ppm)	Compound name
2.1	8.00_447.1363	C25H24N2O4S	448.1457	447.138	5	Pamcogrel
2.1	0.68_241.2177	C15H30O2	242.2246	241.217	2	2,6,10-Trimethyldodecanoic acid 13-Methylmyristic acid Isopropyl laurate Ethyl tridecanoate Dodecyl propionate Hexyl nonanoate 7(14)-Farnesene-9,12-diol Heptyl octanoate 3-Methylbutyl decanoate Octyl heptanoate Methyl tetradecanoate Pentyl decanoate Pentadecanoic acid
2.1	8.00_633.3377	C31H55O11P	634.3482	633.341	5	PA(PGD1/8:0)
2.1	8.22_633.3608	C31H55O11P	634.3482	633.341	5	PA(8:0/PGD1) PA(PGE1/8:0) PA(PGF2alpha/8:0) PA(5-iso PGF2VI/10:0) 2-(4-Hydroxy-1,3-thiazol-3-ium-3-yl)ethyl [2-(octadecylcarbamoyloxymethyl)oxolan-2-yl]methyl phosphate
		C30H55N2O8PS	634.3417	633.334	5	10,11-dihydro-20-trihydroxy-leukotriene B4
2.4	0.56_385.2198	C20H34O7	386.2305	385.223	9	Cyanine dye 3
2.4	12.13_881.3101	C43H54N4O12S2	882.3180	881.311	1	Cholestane-3,7,12,25-tetrol-3-glucuronide
3.8	8.42_611.3826	C33H56O10	612.3873	611.38	4	PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/DiMe(13,5)) PC(DiMe(13,5)/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)) PC(22:6(4Z,7Z,10Z,13E,15E,19Z)-OH(17)/DiMe(13,5)) PC(22:6(4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z)-OH(14)/DiMe(13,5)) PC(22:6(4Z,8Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-OH(7)/DiMe(13,5)) PC(22:6(5Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-OH(4)/DiMe(13,5)) PS(20:4(7E,9E,11Z,13E)-3OH(5S,6R,15S)/24:0) PS(PGD2/24:0) PS(PGE2/24:0)
3.8	12.21_942.6144	C54H90NO10P	943.6302	942.623	9	
		C50H90NO13P	943.6150	942.608	7	
5.2	9.02_157.1244	C9H18O2	158.1307	157.123	6	4-Hydroxynonanal 2-Heptyl acetate Ethyl 5-methylhexanoate Isobutyl-2-methylbutyrate 2-Methylbutylbutyrate 3-Octyl formate 3-Heptyl acetate 5-Methylhexyl acetate 2-Methylpropyl 3-methylbutanoate Isoamyl butyrate Butyl 3-methylbutanoate Isopropyl hexanoate 1-Hydroxy-3-nonanone 3-(Hydroxymethyl)-2-octanone 4-Methyl-2-pentyl-1,3-dioxolane Octyl formate Butyl pentanoate Hexyl propionate 3-Methylbutyl 2-methylpropanoate Methyl caprylate Propyl hexanoate Butyl 2-methylbutanoate Pentyl butanoate Heptyl acetate 1-Methylbutyl butanoate xi-2-Ethylheptanoic acid 4-Methyloctanoic acid Pelargonic acid Oenanthic ether
5.2	6.86_157.1242					
5.2	6.60_157.1240					
16.5	6.85_186.1145	C9H17NO3	187.1208	186.114	5	1-Hydroxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-3-carboxylic acid Privagabine 8-Amino-7-oxononanoic acid N-Heptanoylglycine
19.2	6.60_186.1143					
4.6	9.02_242.1779	C13H25NO3	243.1834	242.176	7	N-Undecanoylglycine
4.4	9.29_882.6585	C50H94NO9P	883.6666	882.659	1	PC(18:1(9Z)-O(12,13)/24:1(15Z)) PC(18:1(12Z)-O(9S,10R)/24:1(15Z))

						PC(18:3(9,11,15)-OH(13)/24:0) PC(18:3(10,12,15)-OH(9)/24:0) PC(18:2(9Z,11E)+=O(13)/24:0) PC(18:2(10E,12Z)+=O(9)/24:0) PC(20:3(6,8,11)-OH(5)/22:0)
2.1	9.05_537.3773	C31H54O7	538.3870	537.38	4	DG(20:3(8Z,11Z,14Z)-2OH(5,6)/0:0/8:0) DG(8:0/0:0/20:3(8Z,11Z,14Z)-2OH(5,6)) DG(20:3(8Z,11Z,14Z)-2OH(5,6)/8:0/0:0) DG(8:0/20:3(8Z,11Z,14Z)-2OH(5,6)/0:0)
2.5	1.19_465.2250	C29H30N4O2 C21H39O9P	466.2369 466.2332	465.23 465.226	10 2	4-[3-[4-(Diphenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-hydroxypropoxy]-1H-indole-2-carbonitrile Dolichyl b-D-glucosyl phosphate
4.7	4.57_250.1451	C14H21NO3	251.1521	250.145	1	2-Nitrophenyl octyl ether
2.2	12.44_1029.8807	C68H118O6	1030.8928	1029.89	5	TG(24:0/18:2(9Z,12Z)/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))
4.9	12.21_1001.5759	C48H92O17P2	1002.5810	1001.57	2	CL(8:0/10:0/10:0/11:0) CL(8:0/8:0/11:0/i-12:0) CL(8:0/8:0/11:0/12:0) CL(8:0/8:0/10:0/i-13:0) CL(8:0/8:0/10:0/a-13:0) CL(8:0/8:0/10:0/13:0) CL(8:0/8:0/8:0/i-15:0) CL(8:0/8:0/8:0/15:0) CL(8:0/8:0/8:0/a-15:0)
2.5	1.94_449.2311	C23H34N2O7	450.2366	449.229	4	Remogliflozin A
2.7	12.21_786.4981	C41H74NO11P	787.4999	786.493	7	PE(18:1(12Z)-2OH(9,10)/DiMe(9,3)) PS(20:3(6,8,11)-OH(5)/15:0) PE(5-iso PGF2VI/18:1(9Z)) PE(5-iso PGF2VI/18:1(11Z)) PE(PGD1/16:1(9Z)) PE(PGE1/16:1(9Z)) PE(PGF2alpha/16:1(9Z)) PE(20:4(7E,9E,11Z,13E)-3OH(5S,6R,15S)/16:0) PE(PGD2/16:0) PE(PGE2/16:0)
53.0	5.93_885.7379	C52H103O8P	886.7391	885.732	7	PA(i-24:0/a-25:0) PA(a-25:0/i-24:0)
		C59H98O5	886.7414	885.734	4	TG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/O-18:0) TG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/O-18:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))
5.5	8.42_880.6483	C50H92NO9P	881.6510	880.644	5	PC(18:3(9,11,15)-OH(13)/24:1(15Z)) PC(18:3(10,12,15)-OH(9)/24:1(15Z)) PC(18:2(9Z,11E)+=O(13)/24:1(15Z)) PC(18:2(10E,12Z)+=O(9)/24:1(15Z)) PC(20:3(6,8,11)-OH(5)/22:1(13Z)) PC(20:4(5Z,7E,11Z,14Z)-OH(9)/22:0) PC(20:4(5E,8Z,12Z,14Z)-OH(11R)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,10E,14Z)-OH(12S)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,13E)-OH(15S)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(16R)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(17)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(18R)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(19S)/22:0) PC(20:4(6E,8Z,11Z,14Z)-OH(5S)/22:0) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(20)/22:0) PC(20:3(8Z,11Z,14Z)-O(5,6)/22:0) PC(20:3(5Z,11Z,14Z)-O(8,9)/22:0) PC(20:3(5Z,8Z,14Z)-O(11S,12R)/22:0) PC(20:3(5Z,8Z,11Z)-O(14R,15S)/22:0)

Table 3. Annotated matched metabolites from the positive mode of the polar phase

Fold Change	Retention time_ MS peak	Formula	Monoiso_ Topic mass	Adduct (m/z)	Delta (ppm)	Compound name
2.0	7.98_815.4448	C38H72O14P2	814.4397	815.447	3	PGP(18:1(9Z)-O(12,13)/i-14:0)
		C45H67O11P	814.4421	815.4494	6	PGP(18:1(12Z)-O(9S,10R)/i-14:0)
2.0	11.38_840.6548	C48H90NO8P	839.6404	840.6477	8	PA(20:5(7Z,9Z,11E,13E,17Z)-3OH(5,6,15)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))
						Alphitollic acid
						PE-NMe(22:1(13Z)/20:2(11Z,14Z))
						PE-NMe(24:1(15Z)/18:2(9Z,12Z))
						PE-NMe(24:0/18:3(9Z,12Z,15Z))
						PE-NMe(24:0/18:3(6Z,9Z,12Z))
						PE-NMe(22:2(13Z,16Z)/20:1(11Z))
						PE-NMe(22:0/20:3(5Z,8Z,11Z))
						PE-NMe(22:0/20:3(8Z,11Z,14Z))
						PC(22:2(13Z,16Z)/18:1(9Z))
						PC(22:2(13Z,16Z)/18:1(11Z))
						PC(22:1(13Z)/18:2(9Z,12Z))
						PC(22:0/18:3(9Z,12Z,15Z))
						PC(22:0/18:3(6Z,9Z,12Z))
						PC(20:1(11Z)/20:2(11Z,14Z))
						PC(20:0/20:3(5Z,8Z,11Z))
						PC(20:0/20:3(8Z,11Z,14Z))
2.1	6.76_615.3338	C31H51O10P	614.322	615.3293	7	PA(PGJ2/8:0)
2.2	11.38_781.592	C44H81N2O7P	780.5781	781.5854	8	SM(d19:1/20:4(5Z,7E,11Z,14Z)-OH(9))
						SM(d19:1/20:4(5E,8Z,12Z,14Z)-OH(11R))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,10E,14Z)-OH(12S))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,13E)-OH(15S))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(16R))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(17))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(18R))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(19S))
						SM(d19:1/20:4(6E,8Z,11Z,14Z)-OH(5S))
						SM(d19:1/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(20))
						SM(d19:1/20:3(8Z,11Z,14Z)-O(5,6))
						SM(d19:1/20:3(5Z,11Z,14Z)-O(8,9))
						SM(d19:1/20:3(5Z,8Z,14Z)-O(11S,12R))
						SM(d19:1/20:3(5Z,8Z,11Z)-O(14R,15S))
						SM(d19:0/20:5(6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-OH(5))
						SM(d19:0/20:5(5Z,8Z,10E,14Z,17Z)-OH(12))
						SM(d19:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,16E)-OH(18))
						SM(d19:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,16E)-OH(18R))
						SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,13E)+=O(15))
						SM(d19:0/20:4(6E,8Z,11Z,14Z)+=O(5))
2.2	0.7_257.1134	C11H16N2O5	256.1059	257.1132	1	2-(2-Aminopropanoylamino)bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid
						Edoxudine
						5'-o-Methylthymidine
						3-Methylthymidine
						1-(beta-D-Ribofuranosyl)-1,4-dihydronicotinamide
2.3	10.09_447.1533	C19H26O12	446.1424	447.1497	8	Monotropeoside
						Lucuminic acid
2.3	11.49_816.6536	C46H90NO8P	815.6404	816.6477	7	PE-NMe2(24:1(15Z)/15:0)
						PE-NMe(24:1(15Z)/16:0)
						PE-NMe(24:0/16:1(9Z))
						PE-NMe(22:1(13Z)/18:0)
						PE-NMe(22:0/18:1(11Z))
						PE-NMe(22:0/18:1(9Z))
						PE-NMe(20:1(11Z)/20:0)
						PC(24:1(15Z)/14:0)
						PC(24:0/14:1(9Z))
						PC(22:1(13Z)/16:0)
						PC(22:0/16:1(9Z))
						PC(20:1(11Z)/18:0)
						PC(20:0/18:1(9Z))
						PC(20:0/18:1(11Z))
2.5	11.49_757.5911	C47H80O7	756.5904	757.5977	9	DG(22:6(4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z)-2OH(10S,17)/i-22:0/0:0)
						DG(22:6(5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z)-2OH(7S, 17S)/0/i-22:0)
						DG(22:6(4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z)-2OH(10S,17)/0/22:0)

		C42H81N2O7P	756.5781	757.5854	8	DG(22:6(5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z)-2OH(7S, 17S)/0/22:0) SM(d19:1/18:1(9Z)-O(12,13)) SM(d19:1/18:1(12Z)-O(9S,10R)) SM(d19:0/18:3(9,11,15)-OH(13)) SM(d19:0/18:3(10,12,15)-OH(9)) SM(d19:0/18:2(9Z,11E)+=O(13)) SM(d19:0/18:2(10E,12Z)+=O(9))
		C47H80O7	756.5904	757.5977	9	DG(9D5/13D5/0:0) DG(13M5/11M5/0:0) DG(13D5/9D5/0:0) DG(13D5/11D3/0:0) DG(11M5/13M5/0:0) DG(11D5/11D5/0:0) DG(11D3/13D5/0:0)
2.5	7.97_636.3235	C29H45N7O7S	635.3101	636.3174	10	Glycylserylprolylmethionylphenylalanylvalinamide
2.5	12.54_835.6615	C57H86O4	834.6526	835.6599	2	3,4-dihydroxy-5-all-trans-decaprenylbenzoate 3-Decaprenyl-4,5-dihydroxybenzoate
2.5	7.98_717.3657	C35H56O15	716.3619	717.3692	5	Lyciumoside IX
2.5	11.58_842.6703	C48H92NO8P	841.6561	842.6633	8	PE-NMe(22:0/20:2(11Z,14Z)) PE-NMe(20:1(11Z)/22:1(13Z)) PE-NMe(20:0/22:2(13Z,16Z)) PE-NMe(18:2(9Z,12Z)/24:0) PE-NMe(18:1(9Z)/24:1(15Z)) PE-NMe(18:1(11Z)/24:1(15Z)) PC(20:1(11Z)/20:1(11Z)) PC(20:0/20:2(11Z,14Z)) PC(18:2(9Z,12Z)/22:0) PC(18:1(9Z)/22:1(13Z)) PC(18:1(11Z)/22:1(13Z)) PC(18:0/22:2(13Z,16Z)) PC(16:1(9Z)/24:1(15Z))
2.5	9.16_605.3555	C27H44N10O6	604.3445	605.3518	6	[(S)-1-Carboxy-2-phenyl-ethyl]-carbamoyl-Arg-Val-Arg-aldehyde
2.6	11.58_783.6077	C44H83N2O7P	782.5938	783.6011	8	SM(d19:1/20:3(6,8,11)-OH(5)) SM(d19:0/20:4(5Z,7E,11Z,14Z)-OH(9)) SM(d19:0/20:4(5E,8Z,12Z,14Z)-OH(11R)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,10E,14Z)-OH(12S)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,13E)-OH(15S)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(16R)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(17)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(18R)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(19S)) SM(d19:0/20:4(6E,8Z,11Z,14Z)-OH(5S)) SM(d19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)-OH(20)) SM(d19:0/20:3(8Z,11Z,14Z)-O(5,6)) SM(d19:0/20:3(5Z,11Z,14Z)-O(8,9)) SM(d19:0/20:3(5Z,8Z,14Z)-O(11S,12R)) SM(d19:0/20:3(5Z,8Z,11Z)-O(14R,15S))
2.6	11.89_868.6873	C50H94NO8P	867.6717	868.679	10	PE-NMe(20:2(11Z,14Z)/24:1(15Z)) PE-NMe(22:1(13Z)/22:2(13Z,16Z)) PE-NMe(20:3(8Z,11Z,14Z)/24:0) PE-NMe(20:3(5Z,8Z,11Z)/24:0) PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/22:0) PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/22:0) PC(20:2(11Z,14Z)/22:1(13Z)) PC(20:1(11Z)/22:2(13Z,16Z)) PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/24:0) PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/24:0) PC(18:2(9Z,12Z)/24:1(15Z))
2.7	12.69_872.7187	C50H98NO8P	871.703	872.7103	10	PE-NMe(24:1(15Z)/20:0) PE-NMe(22:0/22:1(13Z)) PE-NMe(20:1(11Z)/24:0) PE-NMe(20:0/24:1(15Z)) PC(20:1(11Z)/22:0) PC(20:0/22:1(13Z)) PC(18:1(9Z)/24:0) PC(18:1(11Z)/24:0) PC(18:0/24:1(15Z))
3.0	10.77_814.6379	C46H88NO8P	813.6248	814.632	7	PE-NMe(20:2(11Z,14Z)/20:0) PE-NMe(20:1(11Z)/20:1(11Z)) PE-NMe(18:2(9Z,12Z)/22:0) PE-NMe(18:1(9Z)/22:1(13Z)) PE-NMe(18:1(11Z)/22:1(13Z)) PE-NMe(18:0/22:2(13Z,16Z)) PE-NMe(16:1(9Z)/24:1(15Z))

						PC(18:2(9Z,12Z)/20:0) PC(18:1(9Z)/20:1(11Z)) PC(18:1(11Z)/20:1(11Z)) PC(18:0/20:2(11Z,14Z)) PC(16:1(9Z)/22:1(13Z)) PC(16:0/22:2(13Z,16Z)) PC(14:1(9Z)/24:1(15Z))
3.2	10.77_755.576	C42H79N2O7P	754.5625	755.5698	8	SM(d19:1/18:3(9,11,15)-OH(13)) SM(d19:1/18:3(10,12,15)-OH(9)) SM(d19:1/18:2(9Z,11E)+=O(13)) SM(d19:1/18:2(10E,12Z)+=O(9)) SM(d17:1/20:3(6,8,11)-OH(5))
3.3	12.18_759.6072	C42H83N2O7P	758.5938	759.6011	8	SM(d19:0/18:1(9Z)-O(12,13)) SM(d19:0/18:1(12Z)-O(9S,10R))
3.3	1.23_577.3701	C33H52O8	576.3662	577.3735	6	Collettiside I
3.4	1.4_550.3365	C26H43N7O6	549.3275	550.3348	3	Val-Tyr-Leu-Arg
3.5	9.26_510.3961	C26H56NO6P	509.3845	510.3918	8	LysoPC(O-18:0/0:0)
3.7	11.77_819.6292	C44H87N2O9P	818.6149	819.6222	9	SM(d19:0/PGF1alpha)
3.8	9.01_537.4005	C36H48N4	536.3879	537.3952	10	2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21,22,23,24-tetrahydroporphyrin
4.2	11.7_781.6131	C53H79O4	779.5984	781.6129	0	3-methoxy-4-hydroxy-5-all-trans-nonaprenylbenzoate
		C53H80O4	780.6057	781.6129	0	3-Demethylubiquinone-9
4.3	11.06_802.6362	C45H88NO8P	801.6248	802.632	5	PE-NMe2(18:1(9Z)/20:0) PE-NMe2(18:1(11Z)/20:0) PE-NMe2(18:0/20:1(11Z)) PE-NMe2(16:1(9Z)/22:0) PE-NMe2(16:0/22:1(13Z)) PE-NMe2(14:1(9Z)/24:0) PE-NMe2(14:0/24:1(15Z)) PE-NMe2(24:1(15Z)/15:0) PE(20:0/20:1(11Z)) PE(18:1(9Z)/22:0) PE(18:1(11Z)/22:0) PE(18:0/22:1(13Z)) PE(16:1(9Z)/24:0) PE(16:0/24:1(15Z)) PC(15:0/22:1(13Z))
		C45H87NO10	801.633	802.6403	5	Culinariside
4.9	8.36_508.3742	C26H54NO6P	507.3689	508.3762	4	LysoPC(P-18:0/0:0)

Note: Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidic acid (PA), Diradylglycerolipids (DG), Sphingomyelin (SM), Triradylglycerolipids (TG), Cardiolipins (CL), monomethyl phosphatidylethanolamine (PE-MMe).

4.8. The differences in *UCP1* expression can be recapitulated in human differentiated adipocytes after incubation with murine AL vs. DR serum

To begin to explore the translational potential of our findings, we decided to evaluate the effect of murine serum on human differentiated adipose derived stem cells (ADSC), as all previous experiments were performed in a mouse brown adipocyte-derived cell lineage. To assess if our molecule of interest would also affect

human cells, in collaboration with Dr. Jeremie Boucher (Gothenburg University, Sweden), we treated primary human differentiated pre-adipocytes with rat serum subjected to AL or DR. Again, a similar reduction of *UCP1* expression was observed in response to the DR serum, although borderline significant ($P = 0.0552$, Figure 21).

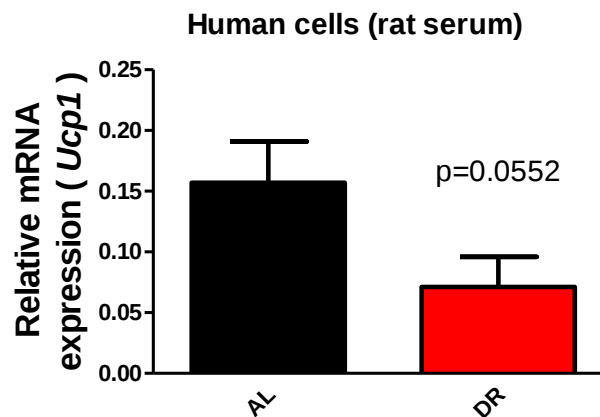


Figure 21. Effect of serum of rat fed *ad libitum* or subjected to dietary restriction diet over *Ucp1* mRNA expression in human ADSC differentiated brown/beige adipocytes. Twelve-week-old rats were subjected to dietary restriction (DR) or *ad libitum* diet (AL) for one month. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in human ADSC differentiated cells after 24h incubation with 7.5% of serum. Each pool contained sera of at least 7 rats. Values represent mean $\pm$ SEM (Student's t-test).

4.9. Incubation with serum of patients after bariatric surgery leads to downregulation of *Ucp1* expression in murine, differentiated brown adipocytes

Given the translational appeal of using human serum, we decided to study if human serum samples had a similar effect as observed with rodent sera. Even though DR and bariatric surgery interventions are distinct in many ways, we decided to use serum from individuals subjected to bariatric surgery as a surrogate for a human

condition associated with reduced calorie intake with progressive weight loss. This was mainly due to sample availability and the fact that bariatric surgery not only results in decreased food intake/absorption but also has been shown to influence BAT activity in humans [113][114].

Differentiated murine brown preadipocytes were incubated with 7.5% of human serum collected from patients at different moments before and after bariatric surgery and *Ucp1* was analyzed after 24h. A paired test indicated that *Ucp1* expression was significantly decreased by the serum from individuals with obesity after 6 and 12 months of bariatric surgery, with the strongest effect being with serum collected after 6 months. Like murine DR serum, serum from humans who lost weight after bariatric surgery resulted in the downregulation of *Ucp1* (Figure 22). This data, combined with the fact that human adipocyte cells are responsive to DR murine serum discussed in the previous section, provides strong evidence that a similar effect on *Ucp1* expression found in DR murine serum is translatable to human biology.

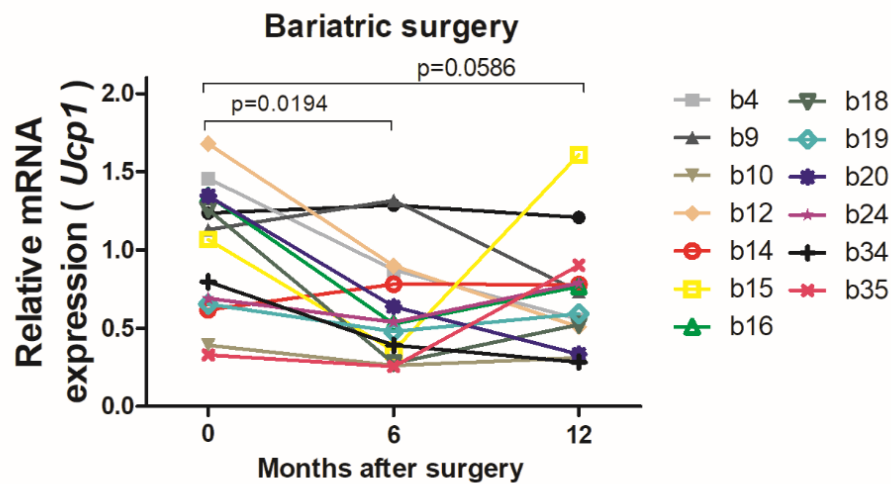


Figure 22. Effect of serum of humans before and after bariatric surgery over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes. Obese individuals were subjected to bariatric surgery and their serum samples were collected before and after 6 and 12 months of surgery. *Ucp1* expression was measured by RT-qPCR in 9B

differentiated cells after 24 hours of incubation with 7.5% serum. Values represent mean. Paired student's t-test.

4.10. Incubation with serum of patients with diabetes mellitus leads to downregulation of *Ucp1* expression in murine, differentiated brown adipocytes

Due to insulin contribution to *Ucp1* expression observed in section 4.1., we decided to evaluate the effect of diabetes mellitus by incubating murine mature brown adipocytes for 24 hours with serum from diabetic individuals (type 1 or 2) and then analyzing *Ucp1* expression. Another reason for that was an anecdotal, but a curious observation based on the serum of only one obese type 2 diabetic individual from the bariatric surgery cohort that resulted in a marked 3- to 4-fold downregulation in *Ucp1* expression when compared to the serum of non-diabetic individuals. Blood from obese people that had not been subjected to surgery was collected and among those, there were diabetic and non-diabetic individuals.

Interestingly, *Ucp1* mRNA levels were consistently downregulated upon incubation with serum from both type 1 and type 2 diabetic individuals (Figure 23A). However, *Ucp1* levels do not correlate with body weight or glycated hemoglobin (Figure 23 B-C).

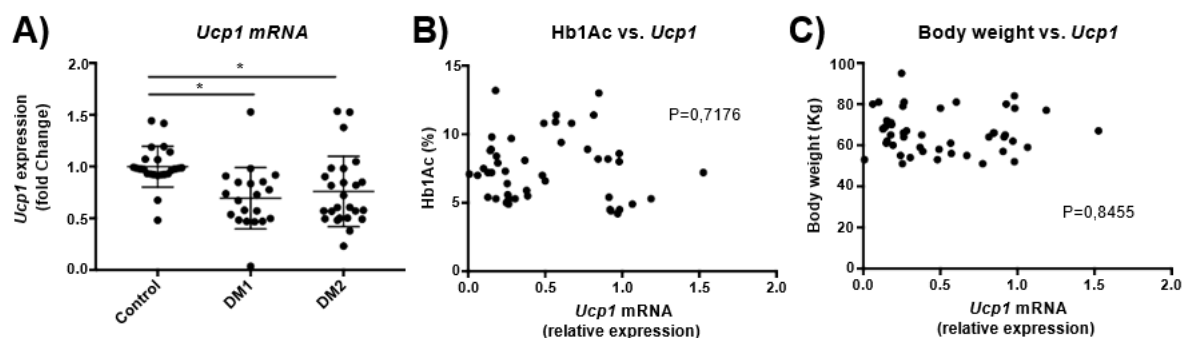


Figure 23. Effect of serum of humans with diabetes mellitus type 1 and 2 over *Ucp1* mRNA expression in 9B murine differentiated brown adipocytes and the

correlation with metabolic parameters. *Ucp1* expression of 9B differentiated cells was measured by RT-qPCR after 24 hours of incubation with 7.5% serum from diabetic or healthy participants (A) and then *Ucp1* levels were correlated with serum clinical parameters (B, C). Values represent mean $\pm$ SEM. In A, (one-way ANOVA with Dunnett post-test). In B-C, (Pearson correlation test). Hb1Ac, glycated hemoglobin.

5. DISCUSSION

Previous efforts have been made to understand the functional effects of the serum samples studied in this project. Nonetheless, a clear interpretation of the results has been hindered by the complex nature of the serum. Therefore, we decided that the characterization of the serum components affecting *Ucp1* expression could be beneficial for understanding how this serum can affect BAT activation. Using *Ucp1* expression as a readout for the regulation of brown adipocyte function, we first directed the aims of this project to the selection of a sub-fraction responsible for the different effects observed between AL and DR serum.

First, we investigated two possible candidates to be modulators of *Ucp1* that are well-known to be increased in AL condition, i.e. insulin and leptin. Our results indicate that only insulin was able to stimulate *Ucp1* expression, but it does not represent the molecule responsible for the effect we observe, given that the effect was maintained after insulin/IGF1 receptor inhibition and with the addition of insulin. This is consistent with the serum fractionation studies that point to a high molecular molecule or complex as responsible for *Ucp1* induction. It is worth mentioning that in addition to the insulin/IGF1 pathway, the role of the beta-adrenergic pathway was ruled out as demonstrated in my master's dissertation [91].

As previously observed in mice, AL serum was expected to have one or more molecules that are increased and stimulate *Ucp1* expression in murine brown differentiated pre-adipocytes. We observed a similar effect of *Ucp1* induction in rat

serum, although less potent, less abundant, or more unstable than the one present in mouse serum. Nonetheless, this inducer seems to be present in rat serum as indicated by the tendency of increasing *Ucp1* expression in cells incubated with higher concentrations of serum. Even though the effect was only present in the higher concentration of serum (20%), a mixture of both AL and DR serum was not able to block the induction of *Ucp1* exerted by the AL serum, confirming the observation that AL serum does contain an inducer of *Ucp1* that acts independently of any inhibitor that DR serum could have. Furthermore, we observed no evidence of the presence of a *Ucp1* inhibitor in the rat serum in any of the analyses made. This is different from the mouse serum, which seems to contain a potent *Ucp1* inhibitor that is present in >100kDa fraction and is degraded by heat.

Given the abundant and complex nature of serum, we decided to proceed with unbiased strategies to profile serum components that could affect *Ucp1* levels. By performing size fractionation of mouse and rat serum samples, we could observe the lack of a very potent *Ucp1* suppressor among the <100 kDa mouse serum fractions. Also, this phenomenon is independent of the AL or DR effect, once it was observed in both AL and DR sera. This effect indicates that mouse serum has a factor larger than 100 kDa that inhibits *Ucp1* levels. This factor could be a stable protein complex, a protein-bound lipid, or an extracellular vesicle, among other complex structures, since the same inhibitory effect seems to be lost when the samples were heated (protocol 37/95) – an intervention that results in protein denaturation and facilitates degradation of stable complexes by proteinase K. Heat can also affect lipid solubility and/or stability [115]. We previously observed a similar strong downregulation of *Ucp1* after mouse serum incubation compared to situations of serum deprivation or after fetal bovine serum substitution for mouse serum. However, this suppressive factor does not seem to be present (or is very low or inactive) in rat serum samples.

The fact that we could still see an induction in *Ucp1* expression with AL compared to DR serum in unfractionated or >100kDa fraction of mouse serum, even in the presence of such a strong inhibitory molecule(s), indicates that the molecule

responsible for *Ucp1* induction effect by AL serum can partially overcome the inhibitory pressure or act through different pathways. Agreeing with data obtained with the mouse serum, rat serum fractionated by size indicated that an effector responsible for the AL vs. DR differences is present in a fraction of serum containing molecules or complexes larger than 100 kDa.

When trying to deproteinate the serum samples with proteinase K applying protocol 37/37, proteins were expected to be fully degraded, as well as most of proteinase K, but the conditions used could not completely digest the proteins in the samples. Even so, partially digestion of proteins using this protocol indicated that a protein molecule was needed for *Ucp1* upregulation by the AL serum. This conclusion is based on the observation that proteinase K treatment brings the AL serum effect down to the DR effect. Even though not statistically significant, a tendency of a reduction in the *Ucp1* transcript by 28% in DR-treated serum compared to AL-treated is observed. However, this difference is not nearly as large as the 45% downregulation comparing AL and DR untreated serum samples. These results could indicate that proteins seem to play a role in *Ucp1* expression regulation even though they may not explain the full spectrum of the differences between AL and DR. As increasing proteinase K concentration with the same protocol killed the cells, we decided to use other methods to inactivate the enzyme and residue of active proteins. Using an alternative protocol, we included heat as a final step for proteinase K inactivation that would also denature the remaining proteins on the sample. Heat affected the possible *Ucp1* inhibitor mentioned before increasing overall *Ucp1* expression in both AL and DR groups and high variability led to inconclusive results. When analyzing rat serum, we could not evaluate the effect of proteins using a similar protocol as the effector molecule responsible for inducing *Ucp1* seems to be unstable under the protocol conditions as untreated serum subjected to the same time and temperature lost its effect. The observation that proteins can contribute to *Ucp1* regulation by serum incubation, at least for mouse serum, indicates that we have a protein that participates in the process of inducing *Ucp1*. This protein could be a direct effector or an auxiliary for the action of another effector molecule, for instance, molecules contained inside extracellular vesicles like miRNA or lipids

carried by proteins.

The SPE experiment performed represents another way for deproteinization. Since it is not possible to recover proteins using this method, it can contribute to the evaluation of the direct effect of proteins in the serum on *Ucp1* expression. The finding that one of the fractions was indeed functional indicates that either we have at least two different molecules that can induce *Ucp1* expression (one a protein and another a metabolite) or that proteins are necessary for the function or the delivery of the functional metabolite within the serum, although this mechanism may no longer be required in the situation where the metabolite is recovered and exposed to cells in micellar-like particles. By using two different columns for SPE of serum from mice and rats subjected to AL or DR diet we isolated metabolites from different molecular classes according to their hydrophobicity. Even though both columns in combination with the solvent used could recover the same sub-classes of metabolites (hydrophilic, amphipathic and hydrophobic), the profile of the targeted molecules could vary slightly and could facilitate comprehension of the biological composition in affecting *Ucp1* expression. The SPE protocol performed showed that the differential *Ucp1* expression observed upon AL vs. DR mouse serum incubation could be recapitulated by hydrophobic molecules expected to be present after elution in fraction 4.

By evaluating the composition of fraction 4, we selected 48 annotated candidates at least 2-fold upregulated in AL vs. DR in the mouse serum fraction 4 of the PRiME column but not in the same fraction of the rat serum, which did not lead to the same differences observed in mice. While the list of metabolites generated is long and may contain many molecules capable of inducing *Ucp1*, we decided to pursue the role of N-acylglycines.

We selected those molecules by observing that two of the most downregulated features in DR serum were identified as potential N-acylglycines (C7-Gly and C11-Gly). C7-Gly was then validated to be higher in the AL mouse serum fraction 4 of the PRiME column in a concentration around 130nM. Concentration in the whole serum must still be evaluated. In addition, C9-Gly was also present in the

metabolomic analysis and showed to be increased in AL vs. DR serum fraction, even though this metabolite was present in a much lower concentration compared to the other N-acylglycines. Given the low abundance and the fact we could only find C7-Gly and C11-Gly molecules commercially available for testing, we did not investigate C9-Gly any further.

The study of N-acylglycines was further motivated by reports in the literature placing these molecules as an emerging class of bioactive lipids associated with adipose metabolism [63] and because their changes were consistent with other findings. In that regard, if we consider that the serum contains an acyltransferase that conjugates fatty acids with glycine, it could explain why *Ucp1* modulation was also observed in molecules present in the >100 kDa size serum fraction and was at least partially dependent on proteins. For instance, the N-acyl amino acid synthase and hydrolase enzyme PM20D1 is exclusively localized to lipoproteins in mouse and human plasma [78], although we still do not know if this protein is more abundant in AL compared to DR serum. Also, if protein-fatty acid conjugation is important for N-acylglycine function, that also agrees with the findings that indicate that *Ucp1* modulation is at least partially dependent on proteins. Indeed, secreted or newly formed N-acyl amino acids in the blood are present in a free active form or bound to an albumin carrier in its inactive form as described previously [78], and BSA-conjugated C7-Gly and C11-Gly was sufficient to induce *Ucp1* expression.

We understand, however, that given the complexity of the serum and the abundance of different types of molecules in it, it is possible that we observed the effects of different molecules when we look at different fractions. For instance, the fact that the C7-Gly and C11-Gly act as an inducer of *Ucp1* expression only in BSA-conjugated does not exclude the possibility of other dilutions methods to be more or less efficient for the delivery of the molecules, since both insufficient and excessive concentrations of these molecules may hinder the differences on *Ucp1* expression. Discussion about this topic in light of the literature is difficult since there is a lack of information about how the dilutions of N-acylglycines were performed in papers, or which vehicles were used. Actually, this problem is not restricted to this class of

molecules since 55% of scientific papers that use fatty acids do not specify the dilution methods [107]. In part for this reason, the experimental information gathered in this thesis is so important to serve as a guide to propose hypotheses that could lead to a better understanding of the origin, pathway, and mechanism of action of N-acylglycines or other molecules in circulation.

It is important to notice that, up to date, only long-chain fatty acids (C14 or more) N-acylglycines have been reported to have biological functions and our data found N-acylglycines with medium-length (C7 – C11) carbon chains as altered in serum of AL vs. DR mice. That could be only a reflection of those smaller fatty acids being less explored in the literature, but it could also mean that this type of molecules are specifically related to how DR modulate metabolism *in vivo*. This last hypothesis is supported by the fact that palmitoylglycine (C16) and pentadecanoylglycine (C15) were not found to be differentially concentrated in our analysis.

Another important aspect of the N-acylglycines described here and those described in the literature is that all our initial candidate molecules found to be altered in serum of AL vs. DR mice were composed of radicals with odd numbers of carbons (C7, C9, C11). If not incidental, this could indicate that odd- and even-chain fatty acid-containing N-acylglycines are differentially metabolized during DR. It is known that odd-chain fatty acids can replenish deficient tricarboxylic acid cycle intermediates after being broken into acetyl-coenzyme A (CoA) and propionyl-CoA [116]. This was proposed to be the mechanism by which THN (commercialized by the brand name Dojolvi) has beneficial effects in clinical trials to treat patients with Long-chain Fatty Acid Oxidation Disorders (LC-FAOD) [116]. Because THN is a triglyceride composed of three molecules with odd and medium-size chain fatty acids (C7:0), we decided to evaluate if it could modulate *Ucp1* expression. The fact that THN had no effect on *Ucp1* expression indicates that the glycine-fatty-acid combination must be essential to the C7-Gly molecule to induce *Ucp1* expression. The question if THN could be used as a substrate to produce N-acyl amino acids remains unknown.

To answer the important question of whether the findings regarding murine

serum could be translatable to human biology, we isolated human preadipocyte cells from adipose tissue and incubated them with rat DR serum, which resulted in a strong trend towards downregulation of *Ucp1*, indicating that there is at least some component of rodent serum that affects *Ucp1* expression in murine cells that will also be relevant to human biology.

Also, we hypothesize that humans after bariatric surgery, a condition where people lose a great amount of weight, may also affect circulating factors that control *Ucp1*. The fact that human serum reproduced the mouse and rat serum phenotypes and that human adipocyte showed a similar downregulation of *UCP1* expression in response to the DR serum indicates the translational importance of the effect observed.

As part of this study, we intended to collect more serum from individuals undergoing bariatric surgery to increase the amount of serum volume to also be able to characterize those serum samples. Samples would have been collected before and after 6 months of surgery when we had the more robust result in *UCP1* expression modulation. Due to the COVID-19 pandemic, all elective surgeries were stopped, the access to the hospital was restricted, and sample collection was compromised. Although we could not get sufficient human serum to directly pursue candidates for *Ucp1* expression regulators, mouse and rat serum characterization was enough to generate good candidates that can be validated in human serum samples. Also, it was essential to understand the importance of this effect for human biology.

Also, when sera from type 2 and type 1 diabetic patients were tested, *Ucp1* was downregulated in murine differentiated brown adipocytes in comparison to controls, although no differences were observed between type 1 and 2. Moreover, the fact that we could not find any correlation between *Ucp1* expression and glycated hemoglobin as a readout for diabetic severity reinforces that the insulin/IGF1 pathway is probably not relevant to explain the changes in *Ucp1* levels when AL and DR serum is compared. This is consistent with the result that demonstrated that insulin is not responsible for the AL serum effect in stimulating

Ucp1 expression.

Here we demonstrate that sub-fractionation strategies for samples with high molecular complexity, similar to those applied in this thesis, may be useful in the search for candidates with functional potential. By applying this strategy, we propose C7-Gly and C11-Gly as good candidates for further investigation regarding their role in adipose tissue metabolism.

6. CONCLUSION

Overall, our data shows that there is one or more serum molecule(s) in AL-fed rodents in higher concentrations than in dietary-restricted animals that induce *Ucp1* mRNA in murine or human adipocytes. This molecule is not leptin or insulin and acts independently of insulin and IGF1 receptors. This effect can be reproduced by a subfraction of the serum containing >100kDa molecules/complexes which seems to be at least partially dependent on proteins for its action. Also, a lipophilic fraction of the mouse serum reproduced the phenotype observed with the whole serum. By performing metabolomics, we analyzed the composition of this serum fraction. Among the identified candidates, we confirmed increased levels of N-acylglycines in the hydrophobic metabolite fraction of AL serum compared to the same fraction of DR serum from mice. Specifically, C7-Gly and C11-Gly were able to induce *Ucp1* expression indicating that they are good candidates for follow-up studies that aim to understand what functional effects those molecules can have in BAT. Furthermore, similar to DR in rodents, the serum of individuals subjected to bariatric surgery after weight loss or patients with type 1 and 2 diabetes mellitus also led to a reduction in *Ucp1* expression in murine differentiated brown preadipocytes, highlighting the potential translational relevance of this study.

7. REFERECES

- [1] E. Candi *et al.*, “Differences in the vascular and metabolic profiles between metabolically healthy and unhealthy obesity,” *Endocr. Metab. Sci.*, vol. 2, p. 100077, Mar. 2021.
- [2] F. Hu, “Measurements of Adiposity and Body Composition,” *Obes. Epidemiol.*, pp. 53–83, Sep. 2008.
- [3] WHO, “Obesity and overweight,” *World Health Organisation Media Centre Fact Sheet No. 311*, 2012. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/#.U2gDIH5zIZ4.mendeley>.
- [4] D. Cooke and S. Bloom, “The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 11, pp. 919–931, 2006.
- [5] National Heart Lung and Blood Institute and N. National Institutes of Health (NIH) National Heart, Lung, and Blood Institute, “Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. The Evidence Report, NIH Publication No. 98-4083,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 158, no. Suppl 2, pp. 51S-209S, 1998.
- [6] G. Peltz, M. T. Aguirre, M. Sanderson, and M. K. Fadden, “The role of fat mass index in determining obesity,” *Am. J. Hum. Biol.*, vol. 22, no. 5, p. 639, Sep. 2010.
- [7] C. D. C. Panel, “Gastrointestinal Surgery for severe obesity,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 115, no. 12, p. 956, 1991.
- [8] K. Fujioka, “Follow-up of nutritional and metabolic problems after bariatric surgery,” *Diabetes Care*, vol. 28, no. 2, pp. 481–484, 2005.
- [9] K. J. Thun, “Treatment of obesity,” *Hippokrates*, vol. 48, no. 1, pp. 84–85, 1977.

- [10] T. D. Müller, M. Blüher, M. H. Tschöp, and R. D. DiMarchi, “Anti-obesity drug discovery: advances and challenges,” *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021 213, vol. 21, no. 3, pp. 201–223, Nov. 2021.
- [11] I. J. Onakpoya, C. J. Heneghan, and J. K. Aronson, “Post-marketing withdrawal of anti-obesity medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review,” *BMC Med.*, vol. 14, no. 1, Nov. 2016.
- [12] B. G. Tchang, M. Aras, R. B. Kumar, and L. J. Aronne, “Pharmacologic Treatment of Overweight and Obesity in Adults,” *Endotext*, Aug. 2021.
- [13] J. G. Kang and C.-Y. Park, “Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety,” *Diabetes Metab. J.*, vol. 36, no. 1, p. 13, 2012.
- [14] C. Ayyad and T. Andersen, “Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999,” *Obes Rev*, vol. 1, no. 2, pp. 113–119, 2000.
- [15] P. K. Whelton *et al.*, “The effects of nonpharmacologic interventions on blood-pressure of persons with high normal levels: Results of the trials of hypertension prevention, phase I,” *Jama-Journal Am. Med. Assoc.*, vol. 267, no. 9, pp. 1213–1220, 1992.
- [16] R. R. Henry, P. Wallace, and J. M. Olefsky, “Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *Diabetes*, vol. 35, no. 9, pp. 990–998, 1986.
- [17] R. R. Wing *et al.*, “Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 34, no. 7. pp. 1481–1486, 2011.
- [18] J. M. Jakicic and K. K. Davis, “Obesity and Physical Activity,” *Psychiatr. Clin. North Am.*, vol. 34, no. 4, pp. 829–840, Dec. 2011.
- [19] K. S. Petersen and P. M. Kris-Etherton, “Diet Quality Assessment and the

Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk,” *Nutrients*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021.

- [20] B. Bjørndal, L. Burri, V. Staalesen, J. Skorve, R. K. Berge, and R. K. Berge, “Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents,” *J. Obes.*, vol. 2011, p. 490650, Feb. 2011.
- [21] S. Cinti, “The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues,” *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 60, no. 03, pp. 319–328, Aug. 2001.
- [22] J. K. Sethi and A. J. Vidal-Puig, “Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation,” *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 1253–1262, 2007.
- [23] A. Bartelt and J. Heeren, “Adipose tissue browning and metabolic health,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 1, pp. 24–36, 2014.
- [24] R. Xue *et al.*, “Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 760–768, 2015.
- [25] S. Y. Min *et al.*, “Diverse repertoire of human adipocyte subtypes develops from transcriptionally distinct mesenchymal progenitor cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 36, pp. 17970–17979, Sep. 2019.
- [26] C. H. Saely, K. Geiger, and H. Drexel, “Brown versus white adipose tissue: A mini-review,” *Gerontology*, vol. 58, no. 1, pp. 15–23, 2011.
- [27] D. Richard, A. C. Carpentier, G. Doré, V. Ouellet, and F. Picard, “Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis,” *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 34 Suppl 2, pp. S59–S66, 2010.
- [28] M. Rosenwald, A. Perdikari, T. Rülcke, and C. Wolfrum, “Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp.

659–67, Jun. 2013.

- [29] M. Harms and P. Seale, “Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential.,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 10, pp. 1252–63, 2013.
- [30] P. Cohen and S. Kajimura, “The cellular and functional complexity of thermogenic fat,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 22, no. 6, p. 393, Jun. 2021.
- [31] K. Ikeda, P. Maretich, and S. Kajimura, “The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 3, pp. 191–200, Mar. 2018.
- [32] A. Park, W. K. Kim, and K.-H. Bae, “Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells.,” *World J. Stem Cells*, vol. 6, no. 1, pp. 33–42, 2014.
- [33] W. D. van Marken Lichtenbelt *et al.*, “Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 15, pp. 1500–8, Apr. 2009.
- [34] K. A. Virtanen *et al.*, “Functional brown adipose tissue in healthy adults.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 15, pp. 1518–25, Apr. 2009.
- [35] M. Saito *et al.*, “High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity.,” *Diabetes*, vol. 58, no. 7, pp. 1526–31, Jul. 2009.
- [36] A. M. Cypess and C. R. Kahn, “The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis.,” *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 22, no. 4, pp. 478–484, 2010.
- [37] M. T. Truong *et al.*, “Focal FDG Uptake in Mediastinal Brown Fat Mimicking Malignancy: A Potential Pitfall Resolved on PET/CT,” *Nucl. Med.*, vol. 183, no. 4, pp. 1127–1132, Nov. 2012.
- [38] R. Bar-Shalom, D. Gaitini, Z. Keidar, and O. Israel, “Non-malignant FDG uptake in infradiaphragmatic adipose tissue: A new site of physiological tracer biodistribution

- characterised by PET/CT,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 31, no. 8, pp. 1105–1113, Mar. 2004.
- [39] C. B. Ueta *et al.*, “ β 1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice,” *J. Endocrinol.*, vol. 214, no. 3, pp. 359–365, Sep. 2012.
 - [40] F. Villarroya, R. N. Cereijo, J. Villarroya, A. Gavaldà -Navarro, and M. Giralt, “Cell Metabolism Minireview Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology,” *Cell Metab.*, vol. 27, pp. 954–961, 2018.
 - [41] R. G. Ludwig, A. L. Rocha, and M. A. Mori, “Circulating molecules that control brown/beige adipocyte differentiation and thermogenic capacity,” *Cell Biol. Int.*, vol. 42, no. 6, pp. 701–710, Jun. 2018.
 - [42] L. Sidossis and S. Kajimura, “Brown and beige fat in humans : thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. February, pp. 478–486, 2015.
 - [43] M. Petruzzelli *et al.*, “A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia,” *Cell Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 433–447, Sep. 2014.
 - [44] S. Kir *et al.*, “Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia,” *Nature*, vol. 513, no. 7516, pp. 100–104, 2014.
 - [45] E. Paulo *et al.*, “Sympathetic inputs regulate adaptive thermogenesis in brown adipose tissue through cAMP-Salt inducible kinase axis,” *Sci. Reports 2018 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2018.
 - [46] J. Simcox *et al.*, “Global analysis of plasma lipids identifies liver-derived acylcarnitines as a fuel source for brown fat thermogenesis,” *Cell Metab.*, vol. 26, no. 3, p. 509, Sep. 2017.
 - [47] R. R. Rao *et al.*, “Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis,” *Cell*, vol. 157, no. 6, pp. 1279–

1291, 2014.

- [48] P. Lee *et al.*, “Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans,” *Cell Metab.*, vol. 19, no. 2, pp. 302–309, 2014.
- [49] A. Carrière *et al.*, “Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure,” *Diabetes*, vol. 63, no. October, pp. 3253–3265, 2014.
- [50] T. Quesada-López *et al.*, “The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 13479, 2016.
- [51] A. Worthmann *et al.*, “Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis,” *Nat. Med.* 2017 237, vol. 23, no. 7, pp. 839–849, Jun. 2017.
- [52] E. P. M. Broeders *et al.*, “The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 3, pp. 418–426, Sep. 2015.
- [53] V. Golozoubova, H. Gullberg, A. Matthias, B. Cannon, B. Vennström, and J. Nedergaard, “Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 18, no. 2, pp. 384–401, Feb. 2004.
- [54] C. Rippe, K. Berger, C. Böiers, D. Ricquier, and C. Erlanson-Albertsson, “Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 279, no. 2 42-2, 2000.
- [55] L. Nikonova, R. A. Koza, T. Mendoza, P.-M. Chao, J. P. Curley, and L. P. Kozak, “Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance,” *FASEB J.*, vol. 22, no. 11, p. 3925, Nov. 2008.
- [56] H. ERIKSON, J. EIROG, K. L. ANDERSEN, and P. F. SCHOLANDER, “The Critical Temperature in Naked Man,” *Acta Physiol. Scand.*, vol. 37, no. 1, pp. 35–

39, 1956.

- [57] J. Nedergaard, T. Bengtsson, and B. Cannon, "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 293, no. 2, pp. E444-52, Aug. 2007.
- [58] D. P. Blondin *et al.*, "Increased Brown Adipose Tissue Oxidative Capacity in Cold-Acclimated Humans," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 99, no. 3, pp. E438–E446, Mar. 2014.
- [59] H. Park, A. He, and I. J. Lodhi, "Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 30, no. 10, p. 710, Oct. 2019.
- [60] M. D. Lynes *et al.*, "The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue," *Nat. Med.*, 2017.
- [61] T. Hoang, M. D. Smith, and M. Jelokhani-Niaraki, "Expression, Folding, and Proton Transport Activity of Human Uncoupling Protein-1 (UCP1) in Lipid Membranes: EVIDENCE FOR ASSOCIATED FUNCTIONAL FORMS*," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 51, p. 36244, Dec. 2013.
- [62] Y. Lee, C. Willers, E. R. S. Kunji, and P. G. Crichton, "Uncoupling protein 1 binds one nucleotide per monomer and is stabilized by tightly bound cardiolipin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 22, pp. 6973–6978, Jun. 2015.
- [63] J. Z. Long *et al.*, "The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria," *Cell*, vol. 166, no. 2, pp. 424–435, 2016.
- [64] C. Guijas *et al.*, "Drug-Initiated Activity Metabolomics Identifies Myristoylglycine as a Potent Endogenous Metabolite for Human Brown Fat Differentiation," *Metabolites*, vol. 12, no. 8, Aug. 2022.
- [65] S. Wang *et al.*, "N-Oleoyl glycine, a lipoamino acid, stimulates adipogenesis associated with activation of CB1 receptor and Akt signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 466, no. 3, pp. 438–443, Oct.

2015.

- [66] J. Wu *et al.*, "N-Oleoylglycine-Induced Hyperphagia Is Associated with the Activation of Agouti-Related Protein (AgRP) Neuron by Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 5, pp. 1051–1057, Feb. 2017.
- [67] C. G. Costa *et al.*, "Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of β -oxidation defects using GC-NCI-MS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 21, no. 6, pp. 1215–1224, Jan. 2000.
- [68] N. Rimmerman *et al.*, "N-palmitoyl glycine, a novel endogenous lipid that acts as a modulator of calcium influx and nitric oxide production in sensory neurons," *Mol. Pharmacol.*, vol. 74, no. 1, pp. 213–224, Jul. 2008.
- [69] S. Chaturvedi, W. J. Driscoll, B. M. Elliot, M. M. Faraday, N. E. Grunberg, and G. P. Mueller, "In Vivo Evidence that N-Oleoylglycine Acts Independently of Its Conversion to Oleamide," *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 81, no. 3–4, p. 136, Dec. 2006.
- [70] L. Zhao *et al.*, "Specific Interaction of the Human Mitochondrial Uncoupling Protein 1 with Free Long-Chain Fatty Acid," *Structure*, vol. 25, no. 9, pp. 1371-1379.e3, Sep. 2017.
- [71] A. M. Bertholet and Y. Kirichok, "UCP1: a transporter for H⁺ and fatty acid anions," *Biochimie*, vol. 134, p. 28, Mar. 2017.
- [72] D. Y. Oh *et al.*, "Identification of Farnesyl Pyrophosphate and N-Arachidonylglycine as Endogenous Ligands for GPR92," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 30, pp. 21054–21064, Jul. 2008.
- [73] D. P. Waluk, N. Schultz, and M. C. Hunt, "Identification of glycine N-acyltransferase-like 2 (GLYATL2) as a transferase that produces N-acyl glycines in humans," *FASEB J.*, vol. 24, no. 8, pp. 2795–2803, Aug. 2010.
- [74] A. E. Lewis-Stanislaus and L. Li, "A Method for Comprehensive Analysis of

Urinary Acylglycines by Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 12, pp. 2105–2116, Dec. 2010.

- [75] M. Pasquali, G. Monsen, L. Richardson, M. Alston, and N. Longo, “Biochemical findings in common inborn errors of metabolism,” *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, vol. 142C, no. 2, pp. 64–76, May 2006.
- [76] D. E. Hale and M. J. Bennett, “Fatty acid oxidation disorders: a new class of metabolic diseases,” *J. Pediatr.*, vol. 121, no. 1, pp. 1–11, 1992.
- [77] K. G. Sim, J. Hammond, and B. Wilcken, “Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 323, no. 1–2, pp. 37–58, 2002.
- [78] J. T. Kim *et al.*, “A Plasma Protein Network Regulates PM20D1 and N-Acyl Amino Acid Bioactivity,” *Cell Chem. Biol.*, vol. 27, no. 9, pp. 1130-1139.e4, Sep. 2020.
- [79] S. H. Chang, N. J. Song, J. H. Choi, U. J. Yun, and K. W. Park, “Mechanisms underlying UCP1 dependent and independent adipocyte thermogenesis,” *Obes. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 241–251, Feb. 2019.
- [80] H. M. Feldmann, V. Golozoubova, B. Cannon, and J. Nedergaard, “UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality,” *Cell Metab.*, vol. 9, no. 2, pp. 203–9, Feb. 2009.
- [81] Y. Li and T. Fromme, “Uncoupling Protein 1 Does Not Produce Heat without Activation,” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, Page 2406, vol. 23, no. 5, p. 2406, Feb. 2022.
- [82] D. O. Foster and M. L. Frydman, “Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis,” *Can. J. Physiol.*

Pharmacol., vol. 57, no. 3, pp. 257–270, 1979.

- [83] P. Lee *et al.*, “Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans,” *Diabetes*, vol. 177, no. 11, pp. 3686–3698, 2014.
- [84] N. Nagai, N. Sakane, L. M. Ueno, T. Hamada, and T. Moritani, “The –3826 A→G Variant of the Uncoupling Protein-1 Gene Diminishes Postprandial Thermogenesis after a High Fat Meal in Healthy Boys,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 88, no. 12, pp. 5661–5667, Dec. 2003.
- [85] D. Sramkova *et al.*, “The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population,” *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 115, no. 5, pp. 303–307, May 2007.
- [86] A. M. Cypess *et al.*, “Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 15, pp. 1509–17, Apr. 2009.
- [87] M. G. G. Sturkenboom, E. J. F. Franssen, J. Berkhof, and O. S. Hoekstra, “Physiological uptake of [18F]fluorodeoxyglucose in the neck and upper chest region: are there predictive characteristics?,” *Nucl. Med. Commun.*, vol. 25, no. 11, pp. 1109–1111, 2004.
- [88] A. G. Wibmer *et al.*, “Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity,” *Cell Reports Med.*, vol. 2, no. 7, Jul. 2021.
- [89] M. L. T. W.C. Cutting, H.G. Mehrtens, “Actions and Uses Of Dinitrophenol.,” *J. Am. Med. Assoc.*, 2022.
- [90] P. M. O’Neil *et al.*, “Efficacy and safety of semaglutide compared with liraglutide and placebo for weight loss in patients with obesity: a randomised, double-blind, placebo and active controlled, dose-ranging, phase 2 trial,” *Lancet (London, England)*, vol. 392, no. 10148, pp. 637–649, Aug. 2018.
- [91] R. G. Ludwig, “Caracterização metabólica de adipócitos em resposta ao soro de

roedores submetidos à restrição dietética,” Universidade Estadual de Campinas, 2018.

- [92] M. A. Mori *et al.*, “Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 8, pp. 3339–3351, 2014.
- [93] A. Galmozzi *et al.*, “ThermoMouse : An In Vivo Model to Identify Modulators of UCP1 Expression in Brown Adipose Report ThermoMouse : An In Vivo Model to Identify Modulators of UCP1 Expression in Brown Adipose Tissue,” *CellReports*, vol. 9, no. 5, pp. 1584–1593, 2014.
- [94] A. Turturro, W. W. Witt, S. Lewis, B. S. Hass, R. D. Lipman, and R. W. Hart, “Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 54, no. 11, pp. B492–B501, 1999.
- [95] B. A. Guerra *et al.*, “Dietary sulfur amino acid restriction upregulates DICER to confer beneficial effects,” *Mol. Metab.*, vol. 29, pp. 124–135, Nov. 2019.
- [96] L. Cao *et al.*, “White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 3, pp. 324–338, Sep. 2011.
- [97] R. M. Pirzgalska *et al.*, “Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine,” *Nat. Med.*, vol. 23, no. 11, pp. 1309–1318, 2017.
- [98] T. Laeger *et al.*, “FGF21 is an endocrine signal of protein restriction,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 9, pp. 3913–3922, 2014.
- [99] X. Hui *et al.*, “Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 2, pp. 279–290, 2015.

- [100] F. F. Fisher *et al.*, “FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 3, pp. 271–281, 2012.
- [101] A. Turturro, W. W. Witt, S. Lewis, B. S. Hass, R. D. Lipman, and R. W. Hart, “Growth Curves and Survival Characteristics of the Animals Used in the Biomarkers of Aging Program,” *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 54, no. 11, pp. B492–B501, 1999.
- [102] D. Tan *et al.*, “A class of anti-inflammatory lipids decrease with aging in the central nervous system,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 19, no. 2, Feb. 2023.
- [103] M. A. Mori *et al.*, “Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 3, pp. 336–347, 2012.
- [104] S. Fried *et al.*, “Symposium: Adipocyte function, differentiation and metabolism,” *J Nutr*, pp. 3122–3126, 2000.
- [105] S. Huan *et al.*, “Fine particulate matter exposure and perturbation of serum metabolome: A longitudinal study in Baoding, China,” *Chemosphere*, vol. 276, Aug. 2021.
- [106] A. Annibal *et al.*, “Regulation of the one carbon folate cycle as a shared metabolic signature of longevity,” *Nat. Commun.* 2021 121, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, Jun. 2021.
- [107] A. Römer, D. Rawat, T. Linn, and S. F. Petry, “Preparation of fatty acid solutions exerts significant impact on experimental outcomes in cell culture models of lipotoxicity,” *Biol. Methods Protoc.*, vol. 7, no. 1, 2022.
- [108] W. Duan, Z. Guo, H. Jiang, M. Ware, X.-J. Li, and M. P. Mattson, “Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice,” *PNAS March*, vol. 4, no. 5, pp. 2911–2916, 2003.

- [109] M. Portero-Tresserra, D. Rojic-Becker, C. Vega-Carbajal, G. Guillazo-Blanch, A. Vale-Martínez, and M. Martí-Nicolovius, "Caloric restriction modulates the monoaminergic system and metabolic hormones in aged rats," *Sci. Reports* 2020 101, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Nov. 2020.
- [110] N. Velingkaar, V. Mezhnina, A. Poe, K. Makwana, R. Tulsian, and R. V. Kondratov, "Reduced caloric intake and periodic fasting independently contribute to metabolic effects of caloric restriction," *Aging Cell*, vol. 19, no. 4, p. e13138, Apr. 2020.
- [111] H. Werner and E. A. Chantelau, "Differences in bioactivity between human insulin and insulin analogues approved for therapeutic use- compilation of reports from the past 20 years," *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2011.
- [112] E. Borenfreund and C. Shopsis, "Toxicity monitored with a correlated set of cell-culture assays," *Xenobiotica.*, vol. 15, no. 8–9, pp. 705–711, 1985.
- [113] G. H. E. J. Vijgen *et al.*, "Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 7, Jul. 2012.
- [114] P. Dadson *et al.*, "Brown adipose tissue lipid metabolism in morbid obesity: Effect of bariatric surgery-induced weight loss," *Diabetes. Obes. Metab.*, vol. 20, no. 5, pp. 1280–1288, May 2018.
- [115] L. Brühl, "Fatty acid alterations in oils and fats during heating and frying," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2014.
- [116] E. Sklirou, A. N. Alodaib, S. F. Dobrowolski, A. W. A. Mohsen, and J. Vockley, "Physiological Perspectives on the Use of Triheptanoin as Anaplerotic Therapy for Long Chain Fatty Acid Oxidation Disorders," *Front. Genet.*, vol. 11, p. 1651, Jan. 2021.

ANNEX 1 – Document for C57BL/6J mouse research approval (CEUA)



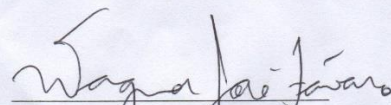
CERTIFICADO

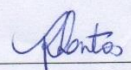
Certificamos que a proposta intitulada **Screening and Characterization of Circulating Molecules that Affect Energy Expenditure**, registrada com o nº **5449-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori e Raissa Guimarães Ludwig**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **14/11/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/01/2020 a 01/01/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 01/01/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	17
Idade/Peso:	3.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	17 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	23
Idade/Peso:	3.00 Meses / 25.00 Gramas
Sexo:	23 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Roedores da Biologia Tecidual (bloco H), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **05 de dezembro de 2019**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávoro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANNEX 2 – Document for Wistar rat research approval (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Caracterização metabólica de adipócitos em resposta ao soro de roedores submetidos à restrição dietética, registrada com o nº 4581-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori e Raissa Guimarães Ludwig, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 03 de julho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2017-17/02/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	03/07/2017-17/02/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	14
Peso / Idade:	03 meses / 400g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 03 de julho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANNEX 3 – Document for Human research approval (CEP)



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE MOLÉCULAS CIRCULANTES REGULADORAS DO PROCESSO DA OBESIDADE E DO ENVELHECIMENTO

Pesquisador: Carolina Mie Kawagosi Onodera

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 78577417.8.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.459.658

Apresentação do Projeto:

Introdução: O número de indivíduos obesos e idosos vem aumentando exponencialmente nos últimos anos, o que tem sido considerado um grave problema de saúde pública mundial e importante foco de estudo. O envelhecimento é um processo complexo caracterizado por um comprometimento progressivo da resposta do organismo ao estresse ambiental e à deterioração metabólica em geral. Este processo resulta em um importante dano celular que pode levar ao desenvolvimento de doenças como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares. A obesidade também é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas que contribuem para a ocorrência das doenças cardiovasculares, a maior causa de morbimortalidade mundial. Apesar do envelhecimento ser um processo fisiológico, a obesidade é um processo patológico e pode ser capaz de agravar os riscos para doenças naturalmente adquiridos com o aumento da idade. Compreender os processos envolvidos na prevenção e tratamento da obesidade, tanto como a interação desta com o processo de envelhecimento, é, portanto, fundamental para melhorar a qualidade de vida em qualquer fase da vida, mas, principalmente, ao longo do envelhecimento. Algumas intervenções como restrição calórica e exercício físico têm se mostrado eficazes no

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

retardo do envelhecimento e na prevenção e tratamento da obesidade. Dessa forma, melhoram a habilidade do organismo de responder ao estresse e auxiliam na prevenção de complicações metabólicas. Um mecanismo pelo qual estas intervenções agem é pela liberação de moléculas no sangue que agem nos tecidos e regulam a sua expressão. Este projeto utiliza-se das intervenções de restrição calórica e/ou atividade física como ferramentas para a compreensão do papel das moléculas circulantes e sua relação com o tecido adiposo para buscar mecanismos que regulem o processo de obesidade e envelhecimento, assim como das doenças associadas a estes processos. De maneira geral pretende-se abordar duas vertentes ligadas à obesidade: complicações cardiovasculares e do processo em si, assim como compreender os efeitos da obesidade sobre o envelhecimento celular.

Justificativa: O número de indivíduos obesos e idosos tem sido foco de preocupação mundial, tendo em vista o maior risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas encontrado nessas populações. Algumas intervenções como a restrição calórica e o exercício físico têm se mostrado eficazes no retardo do envelhecimento e na prevenção e tratamento da obesidade. Um dos possíveis mecanismos para a regulação do processo de obesidade e envelhecimento é pela liberação de moléculas circulantes que atingem os tecidos e controlam a expressão gênica e proteica nos tecidos. A compreensão dos fatores circulantes que controlam os processos nos permitirá compreender mecanismos envolvidos na regulação de aspectos relacionados à saúde dessas populações.

METODOLOGIA:

Desenho da pesquisa: Trata-se de estudo clínico prospectivo, longitudinal, randomizado, controlado e com intervenções cirúrgicas e clínicas, que envolverá 131 indivíduos, divididos em dois grandes grupos; grupo A (intervenção por cirúrgica bariátrica e restrição calórica, oriundos do Ambulatório de Cirurgia Bariátrica do HC-UNICAMP e do Ambulatório de Cirurgia do HC-UNICAMP – Subgrupo controle 1), e grupo B (submetido a exercícios físicos, pessoas da comunidade da UNICAMP e da região metropolitana de Campinas, atingidos por meio de divulgação no rádio e cartazes). O primeiro grupo contém dois subgrupos controle e três fases. O segundo grupo contém dois subgrupos e três fases e participará de programa de treinamento na Faculdade de Educação Física da Unicamp. Os participantes serão acompanhados por cerca de até 18 meses (por 12 meses após intervenções cirúrgicas e por 20 semanas após programa de exercícios físicos), com avaliações e coleta de amostras diversas no momento inicial, em 6 meses e em 12 meses para o grupo A e no momento inicial, após 10 e após 20 semanas para o grupo B.

GRUPO A (n=89, divididos em três subgrupos; intervenção por cirurgia bariátrica, restrição

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

calórica):

Os voluntários que participarão deste projeto de pesquisa submetidos a intervenção de restrição calórica serão pacientes do ambulatório de cirurgia bariátrica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Elinton Adami Chaim. Serão incluídos no estudo pacientes que: apresentem obesidade grau II e III; diabéticos ou não; de 18 aos 65 anos de idade; de acordo com as Portarias GM 424 e 425 / 2013 – Ministério da Saúde. Como critério de exclusão somente neste grupo será considerada a perda de peso inferior a 20% do peso corporal do momento de admissão no programa até o retorno para avaliação cirúrgica. Os pacientes que não conseguirem atingir uma perda de peso inferior a 20% do peso corporal do momento de admissão no programa até o retorno para avaliação cirúrgica serão realocados para o grupo controle 2. Para o grupo controle 1 serão selecionados no ambulatório de cirurgia do Hospital das Clínicas da UNICAMP pacientes que serão submetidos à colecistectomia eletiva, com idades entre 18 e 65 anos, diabéticos ou não, com IMC $\geq 24,9$.

Grupo A, controle 1 (n=21, Pacientes obesos): Pacientes que passarão pela cirurgia de colecistectomia e que se enquadram nos critérios de inclusão do grupo controle. Material que será coletado para experimentos: Sangue, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal, biópsia de tecido adiposo visceral (omental) e biópsia hepática.

Grupo A, controle 2 (n=21, Pacientes de cirurgia de colecistectomia): Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão, mas não conseguiram perder 20% do peso inicial e não passarão pelo processo de cirurgia. Material que será coletado para experimentos: Sangue e biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal.

Grupo A (n=47, Cirurgia bariátrica), fase 1: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão, perderam 20% do peso corporal e passarão pelo processo cirúrgico. Amostras deste grupo serão coletadas pouco tempo antes da cirurgia ou no dia desta. Material que será coletado para experimentos: Sangue, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal, biópsia de tecido adiposo visceral (omental) e biópsia hepática.

Grupo A, fase 2: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão, perderam 20% do peso corporal e passarão pelo processo cirúrgico. Amostras deste grupo serão coletadas após 6 meses do processo cirúrgico. Material que será coletado para experimentos: Sangue e biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal.

Grupo A, fase 3: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão, perderam 20% do peso corporal e passarão pelo processo cirúrgico. Amostras deste grupo serão coletadas após 12 meses do processo cirúrgico. Material que será coletado para experimentos: Sangue.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

GRUPO B (n=42, divididos em dois subgrupos, Intervenção por exercício físico aeróbico): Os voluntários que farão o protocolo de treinamento serão selecionados a partir dos seguintes critérios de inclusão: idade igual ou superior a 60 anos; robustos; aptos a realizar o teste de VO₂máx, que consigam andar independentemente; obesidade grau I. Os grupos serão randomizados. Serão excluídos do estudo todos participantes que possuam: doenças pulmonares; diabéticos; doenças vasculares periféricas; doenças ortopédicas que dificultem a realização do exercício físico; osteoporose; doenças com alto risco de quedas como Parkinson ou acidente cérebro vascular. A intervenção e as coletas serão realizadas na Faculdade de Educação Física da UNICAMP. Serão considerados como perda de seguimento os participantes que não cumprirem com 90% de frequência nas atividades programadas.

Grupo B, fase 1: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão. Amostras deste grupo serão coletadas antes do início do treinamento. Material que será coletado para experimentos: Sangue e biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal.

Grupo B, fase 2: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão. Material que será coletado após 6 meses de intervenção para os experimentos: Sangue.

Grupo B, fase 3: Pacientes que se enquadram nos critérios de inclusão. Amostras deste grupo serão coletadas no final do treinamento. Material que será coletado para experimentos: Sangue e biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal.

Como critérios de exclusão para todos os grupos serão considerados a limitação intelectual significativa sem suporte familiar adequado; quadro de transtorno psiquiátrico não controlado; uso de álcool ou drogas ilícitas; doença cardiopulmonar grave e descompensada que influenciem a relação risco-benefício; hipertensão portal, com varizes esofagogástricas; doenças imunológicas ou inflamatórias do trato digestivo superior que venham a predispor o indivíduo a sangramento digestivo ou outras condições de risco; síndrome de Cushing decorrente de hiperplasia suprarrenal não tratada e tumores endócrinos; hepatopatias crônicas; obstrução biliar atual ou recente.

Locais de realização da pesquisa: As amostras de pacientes que serão submetidos às cirurgias serão coletadas pelo Prof. Dr. Elinton Adami Chaim, professor Associado do Depto. de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O procedimento cirúrgico será realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Em parceria com Prof. Dr. Marco Carlos Uchida, do Departamento de Estudos da Atividade Física Adaptada da Faculdade de Educação Física da UNICAMP, será desenvolvido o protocolo de treinamento aeróbio. As análises biológicas serão realizadas no laboratório de Biologia do Envelhecimento (LaBE) do Prof. Dr. Marcelo A. Mori, do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, do Instituto de Biologia da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

UNICAMP.

Justificativa para existência de grupos controle no grupo exercício aeróbico: Haverá um grupo controle para a prática de exercício aeróbico, desta forma conseguiremos analisar quais serão os efeitos exclusivamente do exercício. Durante o período da pesquisa os voluntários do grupo controle não realizarão nenhuma prática de exercício. Porém ao final da pesquisa, todos serão devidamente orientados para seguirem uma prática de atividade física.

PROTOCOLOS:

Protocolo de cirurgia bariátrica: Os pacientes serão entrevistados em uma consulta de admissão ao programa para cirurgia bariátrica no ambulatório de cirurgia do Hospital das Clínicas da Unicamp, e aqueles considerados como possíveis participantes do estudo, serão selecionados para uma segunda consulta em até 6 meses. Os pacientes que conseguirem perder 20% do peso corporal passarão pelo processo cirúrgico. Nesta segunda avaliação, de acordo com os critérios de inclusão serão incluídos no grupo de pacientes que serão submetidos a cirurgia bariátrica ou no grupo de pacientes que não perderam 20% do peso inicial e que não farão a cirurgia. Aqueles que forem encaminhados para cirurgia bariátrica serão internados um dia antes da cirurgia. Após a cirurgia serão encaminhados para a UTI onde ficarão em observação até receberem liberação médica. Os pacientes serão também acompanhados mensalmente após a cirurgia no ambulatório de cirurgia bariátrica até receberem liberação médica. Todas as cirurgias são padronizadas e serão realizadas pela mesma equipe, conforme a técnica descrita por Fobi e Capella na realização do bypass gastrojejunal em Y de Roux com gastroplastia vertical redutora com banda de silicone. O acesso à cavidade abdominal é realizado através de laparotomia mediana supraumbilical e abertura por sucessivos planos (pele, tecido celular subcutâneo, linha alba e peritônio parietal). O estômago é apreendido manualmente e é então confeccionado um reservatório gástrico vertical na pequena curvatura com o uso de grampeadores lineares cortantes de 80 milímetros, sendo um disparo horizontal e dois verticais em direção ao ângulo de Hiss. A linha de grampeamento é reforçada por sutura manual com fio absorvível de poligalactina (Vicryl® 3.0) tanto no reservatório quanto no estômago excluído. É colocado o anel de silicone ao redor do reservatório e fixado com fio não absorvível de polipropileno (Prolene® 3.0). O intestino delgado é apreendido junto ao ligamento de Treitz e são contados manualmente 100 centímetros. Neste ponto, é realizada a secção do mesmo com grampeador linear cortante de 80 milímetros. O coto entérico distal é então transposto por via transmesocólica e é realizada anastomose gastrojejunal manual término-lateral calibrada por sonda de Foucher em dois planos com fios absorvíveis de poligalactina (Vicryl® 3.0) e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

polidioxanona (PDS® 3.0). São contados 150 cm a partir do coto distal e então se realiza neste ponto a anastomose entero-entérica látero-lateral manual em dois planos com fios absorvíveis de poligalactina (Vicryl® 3.0) e polidioxanona (PDS® 3.0). Os óstios do mesentério e mesocólon são fechados com fios não absorvíveis de Algodão 3.0. É então colocado dreno de sucção laminar (J-Vac®) e realizado o fechamento da cavidade por planos: aponeurose do músculo reto abdominal com fios absorvíveis de polidioxanona (PDS® II 1); tecido celular subcutâneo com poligalactina (Vicryl® 3.0); pele com sutura intradérmica com poligalactina (Vicryl Rapide® 4.0). A anestesia utilizada é a geral venosa associada à peridural. Todos os pacientes recebem antibioticoprofilaxia na indução anestésica com 3,0 gramas de ampicilina-sulbactam. Protocolo de cirurgia de colecistectomia: Os pacientes serão entrevistados em uma consulta de admissão ao programa para cirurgia de retirada da vesícula no ambulatório de cirurgia do Hospital das Clínicas da Unicamp, e os que forem encaminhados para cirurgia serão internados com um dia de antecedência. Após a cirurgia serão encaminhados para a ala de pós-operatório onde ficarão em observação até receberem liberação médica. Este grupo será o grupo controle saudável para os pacientes que fizerem a intervenção de restrição calórica.

Protocolo de biópsia de gordura periférica ou coleta de tecido adiposo subcutâneo: Será extraída uma pequena porção (aproximadamente 50 - 80 mg por amostra/momento) da gordura subcutânea da região lateral da cintura. Esta quantificação de amostra de tecido adiposo subcutâneo seguirá a padronização usualmente descrita na literatura, para análises de expressão gênica. O procedimento de biópsia será realizado da seguinte forma: todo o material será estéril, incluindo um campo cirúrgico para o procedimento. A partir da utilização de uma agulha especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de tecido adiposo subcutâneo (de tamanho aproximado de dois grãos de arroz cozidos), o participante deverá manter-se deitado lateralmente em uma maca. Depois da identificação da área subcutânea, esta terá seus pelos removidos com o uso de lâminas descartáveis individuais (caso necessário), e limpa com gazes molhadas em antisséptico cirúrgico pelo profissional médico utilizando luvas esterilizadas. Após a remoção dos pelos e limpeza da área, um primeiro campo cirúrgico será inserido sob a região lateral da cintura. O médico responsável (utilizando luvas esterilizadas) fará então a anestesia do local com a utilização de xilocaína a 1%, administrando-a com seringa e agulha hipodérmica descartáveis de forma subcutânea (sob a pele). Durante este procedimento, o voluntário poderá, de acordo com o seu grau de sensibilidade, sentir um breve desconforto, parecido com uma sensação de calor local, devido à ação do anestésico. Após a aplicação do anestésico, a área a ser biopsiada e seus arredores serão novamente limpos com antisséptico cirúrgico e cobertos com um

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

segundo campo-cirúrgico, esterilizado, individual e descartável. Uma vez anestesiado o local, será feita então a incisão para se obter a amostra de tecido adiposo subcutâneo. Para tal, o médico responsável utilizará uma fina e pequena lâmina de bisturi (No.11), esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0,5 cm de extensão. A incisão cortará a pele e o tecido adiposo a ser biopsiado. O voluntário não deverá sentir qualquer dor durante a realização deste procedimento, uma vez que a região envolvida estará anestesiada. Feita a incisão, a agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, é então inserida pelo médico responsável através do orifício da incisão e realizada uma pequena sucção, gerada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120cc, assim, um pequeno pedaço do tecido adiposo é puxado para o interior da agulha e cortado para ser então removido juntamente com a agulha. Durante este procedimento, o qual deve durar ao redor de 15 a 30 segundos, o voluntário deverá sentir apenas uma pequena pressão pela agulha, e não dor, sendo sempre informado dos procedimentos que tomarão sequência. Após a retirada da agulha, será aplicada pressão manual, seguida de ataduras de gaze esterilizadas, sobre o local de incisão para prevenir eventual sangramento (usualmente não se observa sangramento). Não será necessária a sutura cirúrgica (ponto cirúrgico). A incisão será então fechada com fita adesiva cirúrgica esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Gazes serão aplicadas com esparadrapos sobre a região da incisão, aplicando pressão contínua, a fim de evitar formação de edema local. O voluntário será instruído a manter a pequena atadura e as gazes por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo mesmo período, além de ainda manter a fita adesiva cirúrgica por 72 horas. Também será informado que o participante se abstenha de exercícios físicos pelas próximas 72 horas. Estes procedimentos diminuem a possibilidade de sangramentos e dor posteriores. No local da incisão poderá ficar uma pequena cicatriz na pele, que dependendo de características individuais desaparecerá com o tempo. Alguns indivíduos podem sentir um pouco de dor localizada no período de aproximadamente 24 horas após o procedimento. Tal sensação não deve ser maior do que aquela devido a um pequeno hematoma proveniente de alguma batida na pele. As complicações devido a este procedimento são raras, e se estendem a sangramento posterior e edema local, os quais devem ser tratados com aplicação breve de frio (gelo envolvido em saco e pano) e compressão. Tais complicações podem estender o período pelo qual o indivíduo sentirá dor, mas uma vez que a região não apresenta grandes vasos sanguíneos ou nervos, é extremamente rara a ocorrência de complicações desta natureza. Eventuais complicações serão acompanhadas pelo médico responsável pelo projeto, à assistência realizada.

RESUMO DAS COLETAS NO GRUPO DE RESTRIÇÃO DIETÉTICA: Entre 2 e 6 meses antes da cirurgia:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Coleta de sangue para exames de rotina e para o estudo, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal. Avaliação da composição corporal, medidas antropométricas, aspectos físicos e funcionais e questionários. 6 meses após a cirurgia: Coleta de sangue para exames de rotina e para o estudo, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal. Avaliação da composição corporal, medidas antropométricas, aspectos físicos e funcionais e questionários.

Ao final do experimento, aos 12 meses de acompanhamento, coleta de sangue para exames de rotina.

Protocolo de treinamento aeróbio: Os voluntários realizarão um programa de treinamento aeróbio que será periodizado durante 20 semanas, com frequência de 5 dias na semana. O treino terá duração de 60 minutos (5 minutos de aquecimento), numa intensidade de 40 a 60% do VO₂máx de acordo com as recomendações do American College of Sports Medicine. Todos os treinos serão realizados na Faculdade de Educação Física da UNICAMP e serão devidamente supervisionados.

Procedimento, metodologia de avaliação e amostras: Todos os participantes da pesquisa clínica, independentemente da intervenção irão realizar exames laboratoriais de rotina (hemograma completo, sódio, potássio, uréia, creatinina, triglicérides, colesterol total, LDL, HDL, glicemia, insulina, hemoglobina glicada, RNI, TAP, zinco, cálcio, vitamina D, PCR, TSH) e biópsia de gordura periférica. A composição corporal será avaliada por bioimpedância elétrica (Tanita BC-108, Tóquio, Japão), com dados de percentual de gordura corporal absoluta (em kg) e massa muscular absoluta (em kg). Medidas de circunferência de pescoço, cintura e quadril, além das medidas de peso e IMC também serão coletadas. Para avaliação de aspectos físicos serão realizados o teste de equilíbrio unipodal sem apoio lateral e o teste de força de preensão manual (FPM) utilizando um dinamômetro digital (Jamar Plus+®; Sammons Preston, Rolyon, Bolingbrook, IL). A capacidades funcional dos voluntários será analisada através de testes de velocidade da marcha normal e máxima; Time up and go test (TUG); Teste de potência muscular (Sentar e levantar da cadeira 5 vezes - Five Times Chair Stand). A fragilidade será avaliada por meio do Kihon Checklist (KCL PT-BR), para avaliação da qualidade de vida dos participantes da pesquisa e será utilizado o Medical Outcomes Study 36 Short-Form Health Survey (SF-36).

Restrição Dietética: Os participantes do estudo serão recrutados no Ambulatório Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas - Unicamp após passarem por sua rotina de assistência, por meio de abordagem direta pelos investigadores responsáveis, que perguntarão sobre a disposição de participar da entrevista clínica e autorizar a utilização dos dados da sua respectiva consulta e registros médicos, tanto em relação à história clínica e os resultados anteriores e atuais dos testes

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

laboratoriais. Se o indivíduo deseja não tomar parte do estudo, ele/ela será dispensado e agradecido pela atenção; se ele/ela demonstrarem interesse, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será lido, então as explicações e esclarecimentos adequados serão fornecidos. Pacientes dos grupos vulneráveis (menores de idade, indivíduos mentalmente deficientes, indivíduos institucionalizados) não serão selecionados para participar do estudo.

Treinamento aeróbio: Apenas os indivíduos que irão realizar o treinamento aeróbio realizarão o teste de VO₂máx. O protocolo consistirá em um aquecimento de 2 minutos a 4 km /h-1, seguido de incrementos de 0,3 km /h-1 a cada 30 segundos e elevação de 1% de grau até a exaustão [63]. Ao final do teste haverá um período de recuperação de 4 minutos, com o primeiro minuto a 5 km/h-1, e a cada minuto diminuindo progressivamente 1km/h-1. O maior valor médio de consumo de oxigênio de 30 segundos [64]. Para a realização do teste de VO₂máx., os voluntários passarão por uma familiarização, farão o teste e o reteste com um intervalo de no mínimo 72 horas. A divulgação do programa de exercício físico será realizada por meio de cartazes que serão colados nos murais dos institutos e faculdades da UNICAMP e na rádio CBN da região metropolitana de Campinas. Após a divulgação, os voluntários serão contatados para uma triagem que será feita por telefone, e serão chamados para assistirem uma palestra de apresentação do projeto em que poderão tirar todas as dúvidas, essa palestra será ministrada na Faculdade de Educação Física da UNICAMP. Os voluntários que aceitarem participar do estudo assinarão o TCLE. Depois de incluídos no projeto, os voluntários darão início as avaliações e ao treinamento. As avaliações (coleta de sangue, biópsia de gordura subcutânea abdominal, aplicação dos questionários, avaliação de composição corporal e medidas antropométricas, e a avaliação dos aspectos físicos e funcionais) serão feitas pré intervenção, 10 semanas após o primeiro dia de intervenção e ao final da intervenção (20ª semana). Ao final do estudo será realizada uma palestra de encerramento do estudo, na qual explicaremos como interpretar o relatório que será entregue aos voluntários sobre os resultados obtidos quanto aos seus índices de saúde.

RESUMO DAS INTERVENÇÕES NO GRUPO DE TREINAMENTO AERÓBICO: Avaliação prévia (T0): Coleta de sangue para exames de rotina e para o estudo, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal. Avaliação da composição corporal, medidas antropométricas, aspectos físicos e funcionais questionários. Décima semana de treinamento (T1): Coleta de sangue para exames de rotina e para o estudo. Avaliação da composição corporal, medidas antropométricas, aspectos físicos e funcionais questionários. Vigésima semana de treinamento (T2): Coleta de sangue para exames de rotina e para o estudo, biópsia de tecido adiposo subcutâneo abdominal. Avaliação da composição corporal, medidas antropométricas, aspectos físicos e funcionais questionários.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA:

Os pesquisadores informaram que “Nenhum procedimento clínico ou cirúrgico experimental será executado. Todos os procedimentos propostos podem ser encontrados na extensa literatura de acompanhamento em longo prazo mencionado entre as referências e já foram avaliados em seres humanos.

Para o grupo que irá realizar a restrição calórica os participantes serão informados de que não haverá coleta de exame ou procedimento invasivo que serão realizados exclusivamente para o desenvolvimento de investigação. Todos os dados relativos a exames laboratoriais serão a partir da coleta padronizada no protocolo de assistência os pacientes submetidos ou que aguardem a cirurgia bariátrica no setor de cirurgia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Gostaríamos de reiterar que os dados laboratoriais utilizados se referem exclusivamente aos que seriam recolhidos mesmo que a pesquisa não fosse realizada. Inicialmente, não há desconfortos ou riscos previsíveis ou evitáveis que decorram exclusivamente da investigação, uma vez que não há procedimentos adicionais ou coletas de exame serão realizados, que não são de rotina para os pacientes submetidos.

Para o grupo que realizará o treinamento aeróbico os exames de sangue serão solicitados para o acompanhamento dos índices de saúde de cada voluntário. Inicialmente, não há desconfortos ou riscos previsíveis ou evitáveis. Todas as medidas de segurança serão tomadas para que não haja nenhum dano ao voluntário. O teste de VO₂máx será acompanhado por um médico cardiologista do Hospital das Clínicas da UNICAMP e o treinamento aeróbico será periodizado para que os desconfortos causados pelo esforço físico (como por exemplo dores musculares e cansaço) e o risco a lesão, sejam reduzidos. Além disso, o treinamento será sempre supervisionado.

Os participantes serão identificados com siglas e códigos alfanuméricos nas folhas de protocolo de investigação e o investigador responsável assume total responsabilidade por manter total confidencialidade das informações coletadas. As fichas de dados serão armazenadas separadamente dos termos de consentimento, a fim de evitar qualquer possível identificação. O uso de siglas correspondentes às letras iniciais dos nomes dos participantes será evitado. É garantido o completo anonimato dos dados colhidos. Os participantes serão informados sobre os riscos potenciais de participação e benefícios. Os investigadores serão responsáveis por custos de qualquer natureza decorrentes do estudo que afetem os participantes. Não haverá remuneração de qualquer tipo e a confidencialidade da informação recolhida será assegurada.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS do estudo clínico: Todo sangue coletado será centrifugado, aliqotado e armazenado a uma temperatura de -80°C até a sua utilização. Os tecidos serão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

fixados e processados para análise histopatológica ou congelados em gelo seco e também estocados a uma temperatura de -80°C até a sua utilização, no biorrepositório do Laboratório de Hemostasia do HEMOCENTRO. Parte dos tecidos adiposos serão usados para isolamento de adipócitos e pré-adipócitos, os quais serão cultivados e congelados em nitrogênio líquido. Essas células poderão ser descongeladas, amplificadas por algumas passagens e usadas para as finalidades descritas aqui. Os pré-adipócitos isolados serão armazenados em nitrogênio líquido no Instituto de Biologia da UNICAMP até sua utilização. Parte das amostras poderá ser enviada à AstraZeneca para a realização de análises estritamente relacionadas ao projeto em questão, como parte de uma colaboração que o Prof. Mori desenvolve com a empresa.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS:

Expressão gênica: O RNA total será extraído com o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) segundo o manual do fabricante. A expressão de RNAs global será feita com sequenciamento de RNA. Para isso as amostras serão submetidas ao Centro de Genomas da ESALQ/USP e à AstraZeneca, Molndal. Além disso, para validação e análise dirigida de expressão gênica, a partir do RNA total será sintetizado cDNA com o kit miRScript II (Qiagen) ou High Capacity Reverse Transcription e hexâmeros randômicos (Thermo). O qPCR será realizado utilizando o reagente 2x SYBR green Master Mix (Fermentas) e primers específicos para os genes de interesse. A expressão relativa do RNAm será determinada pelo cálculo do 2-Ct com normalizadores endógenos (TBP, 18S e 36B4).

Quantificação de proteínas e triglicérides: Os níveis de proteínas serão medidos no soro e nas células por meio de proteômica em larga escala não dirigida por hipótese baseada em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e kits de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com os protocolos dos fabricantes. Os níveis de triglicérides nas amostras de tecido e soro serão quantificados por um kit comercial. Esse parâmetro será usado para avaliar o acúmulo de gordura.

Western blot: As células ou tecidos serão homogeneizados no tampão RIPA (radioimmunoprecipitation assay) contendo 0,5% NP-40, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, e inibidores de protease e fosfatase (Pierce Biotechnology). O lisado será submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferido para uma membrada de PVDF (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, a membrana será bloqueada com StartingBlock (ThermoScientific, Pierce) e então incubada com os anticorpos apropriados na mesma solução, seguida pela incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP e detecção quimioluminescente.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Células imortalizadas: Pré-adipócitos imortalizados oriundos do tecido adiposo marrom (células 9B) foram gerados pelo grupo e descritos em M. A. Mori et al., "Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. Cell Metab., vol. 16, no. 3, pp. 336–347, 2012".

Diferenciação de adipócitos: Pré-adipócitos imortalizados serão incubados em DMEM, 10% SFB (soro fetal bovino), penicilina (100 U/l), estreptomicina (100 g/ml) e fungisone (50 g/ml) (meio de cultura) em atmosfera saturada de umidade e 5% CO₂ a 37°C. Será considerado o dia 0 quando atingida 100% de confluência. No dia 2, a diferenciação será induzida com meio de cultura contendo os seguintes fármacos: insulina (20nM), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (125 µM), T3 (1nM), indometacina (125µM), dexametasona (2µg/mL) e rosiglitasona (1µg/mL). No dia 4 o meio será trocado por meio de cultura contendo insulina, T3 e rosiglitasona nas mesmas concentrações anteriores. No dia 6, o meio será trocado por meio de cultura contendo apenas insulina. No dia 8 o meio será substituído por meio de cultura.

Tratamento das células com os soros: As células serão diferenciadas assim como descrito acima. No dia 9, o soro fetal bovino será substituído pelo soro dos roedores na concentração de 7,5%, a não ser nos experimentos de titulação em que diferentes concentrações serão testadas. Após 24 horas de tratamento, as células serão lisadas com o reagente apropriado e o extrato será congelado a -80°C para posterior análise.

Respiração celular (Seahorse Flux Analyzer): Utilizando o analisador de fluxo extracelular Seahorse Bioscience XFe24, será medida a tensão de O₂ imediatamente ao redor das células por biosensores óticos fluorescentes embebidos em um cartucho estéril descartável, colocado sobre os poços da microplaca durante o ensaio. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) será calculada pelo consumo de O₂ em função do tempo (pmol.min⁻¹). A OCR será medida durante 4 minutos por quatro vezes em intervalos de tempo de 10 minutos. Primeiramente, a respiração celular será medida sem nenhum aditivo. Depois, será medido o turnover de ATP em resposta à adição de oligomicina (10 µM). A respiração máxima será medida após estimulação com FCCP (1 µM). Finalmente, a respiração mitocondrial será bloqueada pela adição de rotenona (1 µM) e a OCR residual será considerada como a respiração não-mitocondrial. O vazamento de prótons (estimativa de desacoplamento) será calculado pela subtração do turnover de ATP da respiração mitocondrial basal. Esses procedimentos foram realizados antes pelo laboratório e publicados em [M. A. Mori et al., "Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy," J. Clin. Invest., vol. 124, no. 8, pp. 3339–3351, 2014].

Atividade enzimática da citrato sintase: Será adicionado às amostras de extrato celular ou a um padrão da citrato sintase preparado em diluição seriada, em duplicata, a solução contendo Acetil-

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

CoA (30 mM), oxaloacetato (10 mM) e DTNB (10 mM). A absorbância em 412 nm (gerada pelo produto TNB) será analisada em espectrofotômetro de placas por 5 minutos (a cada 21 segundos). O valor da atividade da citrato sintase será obtido com base na cinética da curva padrão, excluindo o valor da atividade basal medida antes do processo.

Pré-adipócitos do tecido humano: Todo material utilizado no procedimento será separado e preparado previamente de maneira estéril. Após a coleta de aproximadamente 1g de tecido adiposo por kg de peso corporal, este será pesado e adicionado a uma placa de petri. O tecido será cortado em pequenos pedaços e após será adicionado de 25 a 30 ml de um tampão de lise (3 ml de collagenase /mg de tecido no tampão HBSS 2% BSA filtrado em 0.22 µm) para cada 10 ml de volume de tecido. O conteúdo será disposto a 37°C por 30-50 min em leve agitação, ou até se tornar uma solução homogênea. O homogenato será filtrado em filtro de 250 µm e coletado em funil separador. Após um período de repouso, a parte contendo pré-adipócitos permanecerá no supernadante, que será separada do supernadante. O pellet de células será coletado após centrifugações e lavagens e serão ressuspensas na etapa final em meio de cultura basal, contendo 10% soro fetal bovino e antibióticos. Estas células serão plaqueadas e passarão pelo processo de diferenciação (como descrito em "Diferenciação de adipócitos") imediatamente ou após algumas passagens. Parte das células serão congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise, validação dos dados com subsequentes experimentos e análise da influência da senescência replicativa sobre a função do adipócito. Dessa forma evitaremos a necessidade de novas coletas no futuro. As células poderão ser tratadas com soros ou fármacos diversos durante ou após o processo de diferenciação para a avaliação do efeito dessas intervenções sobre o metabolismo e a função celular. Dentre os ensaios a serem realizados estão análise de expressão gênica e proteica, e função mitocondrial.

Genotipagem: As amostras serão genotipadas por meio de sequenciamento para detectar a presença de polimorfismos/mutações conhecidos que afetam o perfil metabólico. Em resumo, amostras das biópsias serão usadas para a extração de DNA por kit da QIAGEN. O DNA isolado será enviado para o Centro de Genômica da ESALQ-USP e este será sequenciado de forma parcial utilizando oligos/sondas específicas. **Metodologia de análise estatística:** Os resultados serão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente no software GraphpadPrism 5® pelo teste t Student ou ANOVA com Tukey como pós-teste, neste caso quando mais de dois grupos forem comparados. A avaliação de correlação entre as variáveis será realizada pelo teste de correlação de Spearman ou Pearson. Os resultados serão descritos em média e desvio padrão, adotando-se como limite

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

mínimo de significância $p < 0,05$.

A pesquisa será realizada na FEF (coleta de dados e amostras), no IB (análise de amostras), nos Ambulatórios de Cirurgia e de Cirurgia Bariátrica do HC-UNICAMP (coleta de dados e amostras) e no HEMOCENTRO-UNICAMP (estocagem de amostras).

Objetivo da Pesquisa:

HIPÓTESE: 01) Há moléculas circulantes moduladas pelo exercício físico e pela restrição calórica que regulam do processo da obesidade e do envelhecimento. 02) Há miRNAs do tecido adiposo que regulam PAI-1 de forma autônoma e não-autônoma no contexto da obesidade e do envelhecimento. 03) Restrição calórica e exercício físico previnem o aparecimento de doenças por aumentarem a expressão desses miRNAs reguladores de PAI-1. 04) Há moléculas circulantes moduladas pela restrição calórica que regulam o metabolismo energético no processo da obesidade pela ativação de UCP1.

OBJETIVO PRIMÁRIO:

- 1) Fatores circulantes reguladores de PAI-1: O objetivo geral desta sessão é identificar de um a três miRNAs expressos pelo tecido adiposo, com o potencial de serem secretados na circulação (atdc-miRNAs), que participam da regulação de PAI-1 (de forma autônoma ou não-autônoma) e que são modulados pelo exercício físico e pela restrição dietética.
- 2) Fatores circulantes que afetam a termogênese: O objetivo geral desta sessão é caracterizar os efeitos metabólicos do soro de humanos em diferentes condições (antes e após a submissão à cirurgia bariátrica, jejum e restrição calórica ou em condições de obesidade e diabetes do tipo 2) sobre adipócitos murinos e humanos e rastrear o(s) fator(es) circulante(s) responsável(eis) pelo efeito observado.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

01) Fatores circulantes reguladores de PAI-1:

- 1.1. Verificar se os atdc-miRNAs que têm como alvo putativo PAI-1 são regulados por restrição calórica
- 1.2. Verificar se os atdc-miRNAs que têm como alvo putativo PAI-1 são regulados por exercício
- 1.3. Verificar o efeito do exercício físico sobre os marcadores metabólicos, de qualidade de vida e o perfil de fragilidade em obesos grau I
- 1.4. Verificar o efeito da cirurgia bariátrica sobre os marcadores metabólicos, de qualidade de vida e perfil de fragilidade em obesos grau II e III
- 1.5. Testar correlações entre os níveis de PAI-1 circulantes, adiposos e hepáticos, a expressão de atdc-miRNAs e o perfil metabólico e de fragilidade

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

02) Fatores circulantes que afetam a termogênese:

2.1. Caracterizar os efeitos metabólicos do soro de humanos em diferentes condições (antes e após a submissão à cirurgia bariátrica, jejum e restrição calórica ou em condições de obesidade e diabetes do tipo 2) sobre adipócitos marrons diferenciados de camundongos ou adipócitos diferenciados humanos isolados do tecido adiposo subcutâneo ou omental.

2.2. Realizar o fracionamento do soro de humanos para identificar em qual(is) fração(ões) se encontram as moléculas de interesse.

2.3. Realizar ômicas nas frações responsáveis pelos efeitos observados e selecionar candidatos

2.4. Tratar os adipócitos marrons diferenciados de camundongos ou de humanos com as moléculas candidatas e fármacos para encontrar possíveis miméticos dos efeitos vistos com os soros e reguladores da função de adipócitos.

2.5. Realizar ômicas dos adipócitos murinos e humanos diferenciados e do seu secretoma para avaliar como os soros, as condições e as moléculas candidatas afetam a função dos adipócitos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram QUANTO AOS RISCOS E DESCONFORTOS PREVISTOS que “as cirurgias propostas têm como riscos: tromboembolismo pulmonar (formação de coágulos que entopem os vasos sanguíneos do pulmão) (~1%); fístulas anastomóticas (vazamento de conteúdo alimentar através de emendas entre o estômago e o intestino que não se cicatrizam adequadamente) (~2%); atelectasias (dificuldade de partes do pulmão de aumentarem de tamanho com a entrada de ar) (~5%); eventrações (abertura do corte do abdome) (<1%); infecções de ferida operatória (~8%) e infecção de trato urinário (~2%). A coleta de sangue para o estudo coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros, de forma a não ser prevista punção venosa exclusivamente para fins científicos ou acadêmicos. Estas punções venosas para exames laboratoriais de rotina, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de equimoses. O risco isolado da realização das biópsias é considerado extremamente baixo. Os principais riscos relacionados à biópsia são: sangramento (0,1%); hemobilia (entrada de sangue dentro dos canais que carregam o fel dentro do fígado) (0,1%); e dor abdominal (0,2%). O risco de mortalidade devido à biópsia hepática é 1/10.000 casos, sendo maior em indivíduos com neoplasias malignas, cirrose hepática, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e coagulopatias. Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo dos pesquisadores responsáveis e orientador, que orientará ou providenciará sua devida assistência. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

estudo. Por conta do esforço físico, há possibilidade do voluntário sentir dores musculares e cansaço, além disso ele estará exposto ao risco de lesão. Estes sintomas ocorrem por conta do seu corpo não estar acostumado com esse estímulo, ao longo do treinamento você se sentirá melhor pois seu corpo começará a se adaptar ao exercício físico. Para prevenir esses desconfortos o treinamento será adaptado para cada voluntário, de acordo com sua capacidade física, além disso os profissionais de educação física estarão sempre presentes nos treinos para orientação do exercício”.

Os pesquisadores informaram quanto aos BENEFÍCIOS PREVISTOS em função das etapas cirúrgicas que “a cirurgia tem como benefícios reconhecidos: perda do excesso de peso e controle das doenças decorrentes da obesidade. Além disso em relação a realização das biópsias, caso seja descoberta qualquer alteração em sua biópsia, isto poderá ter impacto positivo sobre seu tratamento neste serviço, uma vez que orientará novos passos em seu tratamento. Você estará contribuindo para que possamos entender um pouco mais sobre como a restrição calórica ou o uso de novos fármacos é capaz de melhorar a saúde dos indivíduos, para que eles não só vivam mais, mas também vivam melhor”.

Os pesquisadores informaram quanto aos BENEFÍCIOS PREVISTOS pela participação nos exercícios aeróbicos que “o exercício físico trará inúmeros benefícios, como por exemplo: melhorará sua capacidade física e funcional, poderá a vir emagrecer, proporcionará uma mudança de hábito para um estilo de vida mais saudável, poderá contribuir para melhora da sua função metabólica, melhorará sua qualidade de vida, proporcionará um ambiente para socialização. Você estará sendo acompanhado por profissionais da área da saúde como professores de educação física e médicos. Receberá o resultado dos seus exames de sangue e também sua avaliação ao final do programa para verificar sua melhora no período em que realizou o exercício físico. Além disso irá contribuir para o avanço da pesquisa na área do envelhecimento, nos auxiliando a entender como o exercício físico pode regular a expressão de algumas proteínas específicas que são encontradas no sangue. Você estará contribuindo para que possamos entender um pouco mais sobre como o exercício é capaz de melhorar a saúde dos indivíduos, para que eles não só vivam mais, mas também vivam melhor”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Resumo da pesquisa: Trata-se de estudo clínico prospectivo, longitudinal, randomizado, controlado e com intervenções cirúrgicas e clínicas, que envolverá 131 indivíduos, divididos em dois grandes grupos; grupo A (intervenção por cirúrgica bariátrica e restrição calórica, oriundos do Ambulatório de Cirurgia Bariátrica do HC-UNICAMP e do Ambulatório de Cirurgia do HC-UNICAMP

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

– Subgrupo controle 1), e grupo B (submetido a exercícios físicos, pessoas da comunidade da UNICAMP e da região metropolitana de Campinas, atingidos por meio de divulgação no rádio e cartazes). O primeiro grupo contém dois subgrupos controle e três fases. O segundo grupo contém dois subgrupos e três fases e participará de programa de treinamento na Faculdade de Educação Física da Unicamp. Os participantes serão acompanhados por cerca de até 18 meses (por 12 meses após intervenções cirúrgicas e por 20 semanas após programa de exercícios físicos), com avaliações e coleta de amostras diversas no momento inicial, em 6 meses e em 12 meses para o grupo A e no momento inicial, após 10 e após 20 semanas para o grupo B.

A lista de pesquisadores citada na capa do protocolo inclui Carolina Mie Kawagosi Onodera (Educadora Física, Doutoranda no PPG em Fisiopatologia Médica da FCM-UNICAMP, orientada, Pesquisadora responsável); Joyce Maria Annichino Bizzacchi (Médica, Docente do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP, orientadora, Pesquisadora participante); Marcelo Alves da Silva Mori (Biomédico, Docente do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do IB-UNICAMP, Pesquisador participante); Elinton Adami Chaim (Médico, Docente do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP, Pesquisador participante); Marco Carlos Uchida (Educador Físico, Docente do Departamento de Estudos da Atividade Física Adaptada da FEF-UNICAMP, Pesquisador participante) e Raissa Guimarães Ludwig (Nutricionista, Mestranda do PPG em Genética e Biologia Molecular do IB-UNICAMP, Pesquisador participante, colaboradora). A lista dos pesquisadores disposta na Plataforma Brasil inclui a lista acima, menos a pesquisadora Raissa e mais o pesquisador Everton Cazzo (Médico, Docente do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP, Pesquisador participante).

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 373.758,00, para aquisição de material de consumo (R\$ 215.358,00) e para duas bolsas de doutorado (R\$ 158.400,00) e terá financiamento próprio dos pesquisadores, conforme descrito na Plataforma Brasil.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 4 (Ciências da Saúde) e 2 (Ciências Biológicas) e tem como título público “Estudo de moléculas circulantes reguladoras do processo da obesidade e do envelhecimento”. A pesquisa foi classificada em duas áreas temáticas especiais; “Genética Humana” (Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;) e “Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro”.

A Instituição proponente da pesquisa é o Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO-UNICAMP e foi citado no registro da Plataforma Brasil que haverá instituições coparticipantes (“A

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

emenda não é exclusiva de seu Centro Coordenador, então quando a emenda for aprovada, esta SERÁ replicada nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes). Entretanto, não foram listadas essas instituições no mesmo registro.

O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa foi iniciada em 01/11/2017 e será concluída em 01/11/2020, em um total de 36 meses.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e blocos de informação utilizados para elaboração do parecer foram:

Registro do protocolo na Plataforma Brasil: Arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1051581_E1.pdf", de 10/12/2017. Há necessidade de ajustes e de esclarecimentos (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Carta de solicitação de emenda, sumarizando as modificações realizadas no protocolo: Arquivo "CartaResposta.pdf" de 10/12/2017. Há necessidade de esclarecimentos (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Projeto de pesquisa detalhado com alterações referentes à solicitação de emenda: Arquivo "Projeto.pdf" de 10/12/2017. Há necessidade de ajustes e de esclarecimentos (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Modelo de TCLE ajustado para a solicitação de emenda: Arquivo "TCLEsCorrigidos.pdf" de 10/12/2017. Há necessidade de ajustes (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Regulamento de Biorrepositório para a pesquisa, após solicitação de emenda: Arquivo "Regulamentodebiorrepositoriomodelo.pdf" de 02/10/2017. Há necessidade de ajustes (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

MTA com regulamento de Biorrepositório entre os pesquisadores no Brasil e a empresa AstraZeneca na Suécia: Arquivo "DecdeAcordo.pdf" de 10/12/2017. Há necessidade de ajustes e de esclarecimentos (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Folha de Rosto do protocolo: Arquivo "Folha_de_rosto.pdf" de 06/09/2017. Há necessidade de ajustes (Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

Comprovante de vínculo institucional da pesquisadora responsável: Arquivo "HistoricoEscolarDoutorado.pdf" de 02/10/2017. Adequado.

Declaração de compromisso da Empresa AstraZeneca da Suécia: Arquivo "CartadeCompromisso.pdf" de 10/12/2017, comprometendo-se a respeitar as regulamentações éticas e legais do Brasil para o uso de materiais biológicos de origem humana, inclusive de não patentear ou comercializar os mesmos, permitindo acesso dos pesquisadores brasileiros aos materiais. Assinada pelo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

pesquisador principal da empresa, Jeremie Boucher. Adequada.

Registro do protocolo na Plataforma Brasil, versão aprovada: Arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_992486.pdf" de 20/11/2017. Projeto de pesquisa detalhado, versão aprovada: Arquivo "Projeto_CEP_Estudo_de_moleculas_circulantes.pdf" de 06/09/2017. Último parecer, de aprovação, do protocolo, anterior à solicitação de emenda: Arquivo "PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2392288.pdf" de 22/11/2017.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA AO PROTOCOLO aprovado em 22/11/2017 para:

ALTERAÇÃO 1- Inclusão dos pesquisadores/colaboradores Jeremie Boucher (Empresa AstraZeneca, Molndal, Suécia, pesquisador principal da empresa, pesquisador participante neste protocolo) e Kelen Fabíola Arroteia (Bióloga, pesquisadora sênior na Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda, na Diretoria de Pesquisa Avançada da Empresa Natura, Cajamar, Brasil, pesquisadora participante neste protocolo).

ALTERAÇÃO 2- Inclusão de três novas análises que serão realizadas com o material coletado dos pacientes, sendo estas a expressão gênica, a genotipagem de SNPs e a histopatologia dos tecidos e/ou plasma/soro.

ALTERAÇÃO 3- Esclarecimentos quanto à análise do soro dos pacientes para buscar moduladores termogênicos.

ALTERAÇÃO 4- Inclusão de nova análise (análise de triglicérides) que será realizada no soro e nos tecidos coletados.

ALTERAÇÃO 5- Informação de que os pré-adipócitos do tecido humano, coletados na pesquisa, poderão ser tratados com fármacos não especificados, durante ou após o processo de diferenciação in vitro, e após este processo serão analisadas segundo sua função celular e metabolismo. Para tal, poderão ser realizadas análises de expressão gênica, proteica e função mitocondrial, assim como já estava detalhado na metodologia do projeto.

ALTERAÇÃO 6- Inclusão de metodologia (Genotipagem). O material coletado de cada indivíduo poderá ser genotipado de forma parcial utilizando oligos/sondas específicas para a detecção de polimorfismos e mutações após a extração do material genético.

ALTERAÇÃO 7- Ajustes nas metodologias empregadas no processamento e no destino do material coletado, com inclusão de análise histopatológica das amostras e coleta de adipócitos, além de pré-adipócitos.

ALTERAÇÃO 8- Envio de parte das amostras coletadas na pesquisa para a empresa AstraZeneca na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Suécia, para análises não especificadas.

ALTERAÇÃO 9- Mudanças consequenciais no texto do modelo de TCLE, refletindo algumas das mudanças acima citadas: "Foi esclarecido no termo de todos os pacientes do projeto que existe possibilidade/intenção do grupo de pesquisa identificar novos fármacos para tratamento de doenças. Além disso, para as amostras dos grupos que passarão por cirurgia, foi especificado com maior detalhamento todos os procedimentos que poderão ser realizados com as amostras coletadas, inclusive especificando que as amostras, as informações contidas no prontuário médico e os resultados do estudo poderão ser enviadas para a empresa AstraZeneca, colaboradora, de forma anônima, para a realização de análises estritamente relacionadas com o projeto em questão, descritas no termo de consentimento".

PENDÊNCIAS QUANTO AO PROJETO DE PESQUISA E REGISTRO DO PROTOCOLO NA PB:

Pendência 01– Os pesquisadores devem confirmar o delineamento da pesquisa, incluindo na resposta todos os grupos e subgrupos da pesquisa, com suas respectivas origens, local de abordagem e local de realização das intervenções e procedimentos, número esperado de indivíduos envolvidos, critérios de inclusão e exclusão, local onde serão acompanhados, responsáveis pelo atendimento/acompanhamento e materiais/amostras que serão coletados.

Comentário 1- A descrição dos procedimentos, em especial quanto aos materiais e amostras que serão coletados não está harmonizada ao longo do projeto de pesquisa. Mesmo considerando o texto inserido na Plataforma Brasil, que é muito mais sintético, não é possível determinar com segurança, mesmo após várias leituras, qual é efetivamente a sequência de eventos, quais amostras serão coletadas em cada momento e o destino e uso das mesmas. Dado que, aparentemente, numerosos laboratórios, pesquisadores e instituições serão envolvidos, é mister trabalhar este aspecto do protocolo de modo a tornar facilmente compreensível a logística das amostras e exames que fazem parte do protocolo. Não há necessidade de responder a este comentário.

Pendência 02– O grupo B aparentemente será dividido em dois subgrupos; um que passará pelo programa de exercícios aeróbicos (n=21), cujas 3 fases do estudo foram descritas no projeto, e outro, de controle (n=21) que aparentemente não passará pelo programa de exercícios aeróbicos, mas que não foi descrito no projeto de pesquisa nem na Plataforma Brasil e não é possível saber a quais intervenções ou coletas será submetido. É possível inferir este grupo pela lista de grupos e métodos no quadro sintético do registro do protocolo na Plataforma Brasil. A presença deste grupo no planejamento deve ser confirmada, explicitada e detalhada.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Pendência 03– Considerando que os objetivos da pesquisa citam claramente a diabetes como fator relevante de análise na pesquisa, os critérios de inclusão/exclusão dão relativamente pouca importância à doença. Como essa questão será resolvida pelos pesquisadores? Será formado um subgrupo adicional na pesquisa? O percentual de diabéticos nos subgrupos relevantes será predefinido ou casual?

Pendência 04- A lista de locais onde será realizada a pesquisa, em suas etapas clínicas e laboratoriais, não está completa e deve ser revisada. Por exemplo, nada é citado sobre o que será feito na empresa AstraZeneca na Suécia (o que pode ser visto apenas no MTA), nem na Empresa Natura. Adicionalmente, as coletas de amostras biológicas no grupo B serão realizadas na própria FEF ou em outro local? Os pesquisadores devem listar de modo claro e direto os métodos e procedimentos que serão realizados na pesquisa. O texto do projeto ajustado para a emenda deixa vários pontos em aberto e não segue ordem objetiva quanto ao que será feito.

Pendência 05– É citado no projeto (3.2. Análise das amostras para a compreensão dos miRNAs moduladores de senescência e obesidade) que serão analisadas biópsias de fígado, como parte dos múltiplos objetivos propostos. Este procedimento não aparece novamente ao longo das descrições metodológicas ou em outras partes do projeto (exceto na revisão da literatura). Amostras de fígado serão ou não coletadas nesta pesquisa? Se sim, os protocolos e descrições pertinentes devem ser inserido no protocolo.

Pendência 06– O projeto apresentado mostra inconsistências no alinhamento dos métodos e proposições e diversos pontos “vazios” nas descrições do delineamento e na metodologia. É prudente, considerando que este protocolo será adicionalmente avaliado na CONEP, que o projeto em particular e o protocolo em geral passem por criteriosa revisão no sentido de ajustar e alinhar suas diversas partes, reduzindo essas ausências, que dificultam sobremaneira a análise por parte de quem não está diretamente envolvido na pesquisa.

Pendência 07– os pesquisadores devem confirmar se o procedimento descrito para a coleta de tecido gorduroso subcutâneo corresponde à técnica denominada “core biopsy” / “biópsia por agulha grossa” ou se se trata de outra técnica. Adicionalmente, devem informar se a extensão de 5mm de incisão por bisturi é a padronizada para a técnica em geral ou se se trata de uma opção específica da pesquisa.

Pendência 08- Os pesquisadores devem informar quais dados/informações serão incluídos no relatório que será apresentado aos participantes ao final do experimento.

Pendência 09– Os pesquisadores devem disponibilizar os modelos digitais dos cartazes e dos textos que serão utilizados na divulgação da pesquisa pelo rádio.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Pendência 10– Os pesquisadores informaram em “aspectos éticos da pesquisa”, no arquivo projeto e relativamente ao grupo que realizará restrição calórica, que não haverá coleta de exame ou procedimento invasivo que serão realizados exclusivamente para o desenvolvimento de investigação. Tal afirmativa não parece ser sustentada pela descrição dos métodos e, aparentemente, alguns dos métodos que serão empregados na pesquisa não seriam aqueles esperados para pacientes previamente às cirurgias bariátricas ou colecistectomias, tais como a biópsia de tecido gorduroso subcutâneo (e eventualmente a biópsia de fígado) e aplicação de questionários. A descrição dos desconfortos e riscos a que serão submetidos os participantes deve ser equilibrada e justa com o participante e informativa para o sistema CEP-CONEP, não uma forma de convencimento do potencial participante e/ou do CEP. A descrição deve ser repensada e reapresentada.

Pendência 11– Os pesquisadores informaram, em “aspectos éticos da pesquisa”, no arquivo projeto e relativamente ao grupo que realizará treinamento aeróbico, que “os exames de sangue serão solicitados para o acompanhamento dos índices de saúde de cada voluntário”, justificando deste modo que “não há desconfortos ou riscos previsíveis ou evitáveis”. Por definição e descrição do próprio projeto de pesquisa, essas pessoas não estarão na FEF de modo espontâneo e natural e sim pelo convite específico para participar de uma pesquisa, essa pesquisa. Desta forma, não é razoável imputar os desconfortos, riscos e gastos desses participantes a outra situação que não à participação na pesquisa. Desta forma, desconfortos, riscos e gastos causados pela participação na pesquisa devem ser assumidos pela pesquisa. O texto deve ser revisto e reapresentado de modo mais justo e equânime com os participantes.

Pendência 12- Ainda no mesmo item, e de modo totalmente diverso, os pesquisadores assumem de modo talvez irrefletido todas as despesas de qualquer natureza decorrentes do estudo (“os investigadores serão responsáveis por custos de qualquer natureza decorrentes do estudo que afetem os participantes”). Parece mais prudente identificar claramente os gastos previsíveis e os riscos previsíveis, e citá-los de modo a não gerar confusão para o participante, que tem o direito de saber o que efetivamente está previsto no protocolo. Uma frase como esta pode gerar expectativas irreais e eventuais frustrações diante da não materialização das mesmas. Adicionalmente, o orçamento do protocolo não prevê qualquer valor para ressarcimento ou para indenização, o que coloca em dúvida a possibilidade dos mesmos ocorrerem de fato. Quais gastos serão efetivamente ressarcidos? O texto deve ser revisto e ajustado.

Pendência 13– Os pesquisadores citam o armazenamento de amostras de sangue desta pesquisa no “biorrepositório do Laboratório de Hemostasia do HEMOCENTRO” que, aparentemente, será (é)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

o biorrepositório deste protocolo, o que deve ser confirmado pelos pesquisadores, ou explicado, se não for este o caso. Sugere-se ainda denominar o Biorrepositório com o título da pesquisa para evitar confusões entre os possíveis diversos Biorrepositórios existentes em uma Instituição do porte do Hemocentro da UNICAMP, entendendo-se o papel desses depósitos de material biológico, que diferem dos Biobancos; esses corretamente com natureza abrangente e institucional.

Pendência 14– O texto cita que amostras serão depositadas em nitrogênio líquido no Instituto de Biologia da UNICAMP. Esse material será parte do mesmo biorrepositório anteriormente citado? Se sim, essa etapa deve ser incluída no regimento do Biorrepositório. Se não, deve ser explicado em que circunstâncias esse material será armazenado no IB.

Pendência 15– Os pesquisadores citam que “parte das amostras poderá ser enviada à AstraZeneca”, pretensamente no exterior, um dos motivos do atual pedido de emenda. O texto deve ser mais afirmativo sobre o que vai acontecer e deve detalhar qual tipo de material, qual o número de amostras será enviado e o que será realizado com as mesmas no exterior. Lembra-se aos pesquisadores que o estabelecimento de biorrepositórios no exterior demanda informações e garantias adicionais ao mesmo procedimento no Brasil. Recomenda-se a leitura das resoluções específicas sobre o estabelecimento de biorrepositórios e biobancos (Resolução CNS 144/2011 e Portaria MS 2201 de 14-09-2011) e sobre o envio de material biológico ao exterior (Lei nº 9.279 de 14/05/96 que regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, Decreto nº 2.553/98 que a regulamenta e Lei nº 9.610/98 sobre direito autoral).

Pendência 16- Em algumas partes do protocolo cita-se a coleta de amostras de fígado, por meio de biópsias hepáticas, o que não é citado na descrição do armazenamento das amostras do estudo clínico, o que deve ser ajustado ou esclarecido.

Pendência 17– A pesquisa é citada como de “Financiamento Próprio” dos pesquisadores, sem patrocinador principal, mas com um custo de R\$ 373.758,00, incluindo duas bolsas de doutorado de 36 meses (R\$ 158.400,00) e material de consumo (R\$ 215.358,00), o que não parece coerente. Considerando a participação de uma empresa estrangeira de grande porte com óbvios interesses no desenvolvimento de produtos medicamentosos (um dos objetivos deste protocolo), produtos que, se desenvolvidos, teriam imenso potencial financeiro, não parece ser adequado imaginar que a empresa não esteja investindo no protocolo e que os pesquisadores estejam efetivamente custeando do bolso os valores descritos. Inclusive o valor para aquisição de material de consumo é modesto perante os métodos propostos e não há previsão de valores para ressarcimento dos participantes, nem para o pagamento de terceiros (como, por exemplo, o sequenciamento a ser feito em laboratório externo à UNICAMP) ou dos próprios pesquisadores. A revisão dos valores e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

alíneas descritas no orçamento com um olhar mais realista seria muito bem vinda e reforçaria a sensação de que não há informações relevantes, mas menosprezadas, em relação aos aspectos financeiros do protocolo. Pendência 18- A participação de uma grande empresa nacional (Natura) no protocolo deve ser detalhada, não apenas na questão operacional e metodológica, mas também financeira. Quase nada é dito sobre a interação da empresa no protocolo.

Pendência 19– O protocolo cita para alguns métodos onde os mesmos serão realizados, mas não o faz para todos os métodos. Os pesquisadores devem apresentar de modo sintético a lista de métodos associados a seus locais de realização.

Pendência 20- As citadas células imortalizadas (pré-adipócitos oriundos do tecido adiposo marrom) foram, aparentemente, produzidas em outro estudo (de 2012) e podem ser referentes a seres humanos ou a animais, o que deve ser esclarecido pelos pesquisadores. Este estudo, também aparentemente, foi inteiramente realizado no exterior e com amostras de tecido humano obtidas no exterior, o que também deve ser esclarecido.

Pendência 21– Os pesquisadores citam na metodologia do projeto (“pré-adipócitos do tecido humano”) que “parte das células serão congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise, validação dos dados com subseqüentes experimentos e análise da influência da senescência replicativa sobre a função do adipócito”. Assim como citam que “as células poderão ser tratadas com soros ou fármacos diversos durante ou após o processo de diferenciação para a avaliação do efeito dessas intervenções sobre o metabolismo e a função celular”. Essas etapas serão propostas em futuros protocolos de pesquisa (que serão apresentados a um CEP) ou se referem a este protocolo? Se sim, os métodos devem ser descritos e incluídos no presente protocolo.

Pendência 22– Os pesquisadores devem ajustar/harmonizar a lista de pesquisadores na capa do projeto e na Plataforma Brasil. Há pesquisador que é citado na capa do projeto, mas não na Plataforma Brasil e há pesquisador que é citado na Plataforma Brasil, mas não na capa do projeto. Adicionalmente, os dois pesquisadores que são citados na solicitação de emenda (Jeremie Boucher e Kelen Fabíola Arroiteia) não aparecem na capa do projeto nem na Plataforma Brasil, o que deve ser ajustado ou explicado.

Pendência 23– Os pesquisadores devem informar quais são as instituições coparticipantes e assinalar as mesmas no registro do protocolo na Plataforma Brasil.

PENDÊNCIAS QUANTO AOS RISCOS E DESCONFORTOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS

Pendência 24– A descrição de riscos e desconfortos é rica em detalhes, inclusive com percentuais

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

de probabilidade, mas não identifica a que grupos ou subgrupos se referem especificamente os parágrafos. A natureza dos riscos e sua probabilidade depende dos métodos utilizados e dos grupos/subgrupos o que demanda análise especificada para estes dois aspectos.

Pendência 25– A descrição dos riscos/desconfortos não traz todos os métodos que afetam os participantes e lista detalhadamente procedimento (biópsia de fígado) que não foi descrito nos procedimentos em metodologia, o que deve ser esclarecido/ajustado.

Pendência 26- Os pesquisadores devem diferenciar os riscos/desconfortos de métodos que são exclusivos da pesquisa (não ocorreriam nos protocolos padrões para o tratamento dos pacientes) daqueles que são parte destes protocolos e ocorreriam mesmo se o participante/paciente não fizesse parte da pesquisa. A citação de que todos os métodos descritos para a pesquisa são pertinentes ao atendimento clínico dos participantes não parece razoável, ainda mais se tomarmos as grandes diferenças entre os grupos e subgrupos da pesquisa.

Pendência 27– Caso se confirme a proposta de grupo controle sem exercício aeróbico (para o grupo exercício aeróbico), os pesquisadores devem explicar e justificar de modo compatível com os padrões éticos em pesquisa atuais a manutenção de um grupo de indivíduos sem prática de exercício físico, conscientemente, intencionalmente, aparentemente por 20 semanas, no âmbito da pesquisa e sob cuidado dos pesquisadores.

Pendência 28– Os pesquisadores devem atentar para a diferenciação entre benefícios de procedimentos que são exclusivos da pesquisa (não fazem parte dos protocolos de tratamento das condições dos pacientes/participantes) e aqueles que são próprios dos protocolos de tratamento e que, portanto, ocorreriam de qualquer modo. Os pesquisadores não devem clamar os benefícios resultantes desse último grupo de procedimentos, pois eles ocorreriam (ocorrem) independentemente da participação na pesquisa. Esta afirmativa é válida tanto para as etapas cirúrgicas quanto para a etapa dos exercícios aeróbicos.

Pendência 29– A descrição dos benefícios presente na Plataforma Brasil adota um tom pessoal, voltado para o participante. Na verdade o texto disponível na Plataforma não será possivelmente lido pelo participante e será (como foi) lido pelos membros do sistema CEP-CONEP e deve ser revisado em conformidade com este pressuposto.

Pendência 30– Adicionalmente, tanto a descrição de benefícios quanto de desconfortos e riscos devem ser elaboradas a partir da lista de metodologias que serão aplicadas aos participantes e/ou que afetarão os participantes. O texto atual deixa algumas lacunas importantes em ambos os aspectos.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

PENDÊNCIAS QUANTO AOS MODELOS DE TCLE:

Pendência 31- Foram apresentados três modelos de TCLE ajustado para a emenda (Cirurgia Bariátrica, Exercícios aeróbicos e Colecistectomia), mas há necessidade de ajustes. As sugestões a seguir podem não ser aplicáveis a todos os modelos, o modelo com maior número de alterações necessárias foi o de Cirurgia Bariátrica: A) Os modelos de TCLE devem refletir as respostas aos questionamentos acima, vários dos quais, ainda que não todos, têm repercussão sobre o conteúdo obrigatório do TCLE. Os pesquisadores devem considerar as respostas às pendências anteriores e incorporar as mudanças aos modelos de TCLE. B) O texto do TCLE deve ser simplificado para permitir a compreensão plena e facilitada do protocolo e a decisão informada do participante. O texto atual é complexo e em parte é cópia do texto do projeto, sem a devida simplificação. C) A descrição dos procedimentos não é de fácil compreensão, junta os subgrupos e seus procedimentos, o que torna quase impossível a alguém que não teve acesso ao projeto (e possivelmente mesmo com acesso ao projeto) a compreensão do que efetivamente acontecerá com o participante de um dado subgrupo. Adicionalmente, há itens citados nos "procedimentos" do TCLE que não estão refletidos no projeto, por exemplo a duração de 24 meses (participação individual descrita no projeto é de 12 meses ou de 20 semanas), a aplicação de 4 questionários (foram descritos, aparentemente, 2 no projeto), etc. O texto cita que as questões avaliadas serão de ordem puramente médica, o que induz o participante a entender que os procedimentos são todos parte da rotina do tratamento, o que não é verídico, no mínimo para os grupos controle e exercício aeróbico, provavelmente para todos os participantes. A biópsia de fígado é citada com destaque, mas não é descrita no projeto, como já destacado anteriormente. Há descrição de alguns procedimentos que não estão citados/descritos no projeto. Em resumo, o texto que descreve os procedimentos deve ser harmonizado com o projeto, deve ser mais completo, deve ser de leitura muito mais simples, deve ser passível de separação pelos participantes de cada subgrupo da pesquisa, ou ser específico para cada um deles. D- A descrição dos desconfortos, riscos e benefícios do TCLE deve ser adequada conforme as respostas às pendências descritas anteriormente. E- A descrição do acompanhamento e assistência aos participantes deve ser compatível com os procedimentos propostos e separar claramente o que será de responsabilidade da equipe médica que fará procedimentos independentemente da pesquisa (por indicação clínica) das responsabilidades (e acompanhamento respectivo) associadas aos procedimentos exclusivos da pesquisa. A forma de contato com os pesquisadores deve refletir esse item. F- Na garantia de sigilo há frases que citam possibilidade ("Os resultados deste estudo poderão fazer parte do prontuário médico"). Os pesquisadores devem fazer afirmativas e esclarecer quais são estas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

informações que farão parte ou esclarecer em que condições esses resultados serão incorporados ao prontuário. G- A previsão de ressarcimento no TCLE está misturada com a previsão de indenização e padece dos problemas já apontados anteriormente e que devem ser revistos e ajustados. Reforça-se a observação anterior quanto à inclusão de procedimentos obviamente nativos da pesquisa, que não fazem parte da rotina do participante, nem dos protocolos de tratamento, para justificar o não ressarcimento. Igualmente, deixar o texto na possibilidade, sem afirmar ou negar o ressarcimento, não é adequado. O texto deve ser claro e direto quanto ao que se prevê em termos de ressarcimento ou não ressarcimento. A previsão de ressarcimento deve ser explicitada quanto ao que é despesa previsível e de como a mesma será ressarcida, incluindo os valores/critérios previstos. Apenas como exemplo, como um programa que demanda a presença 5 dias por semana para exercícios físicos intensos se encaixaria em um programa de “rotina”? A FEF tem algum programa proposto para a população em geral (não envolvida neste estudo) que inclui essa mesma rotina? H- O mesmo é válido para o texto sobre indenização, que deve ser individualizado. No texto atual a descrição do ressarcimento confunde-se com a possibilidade de indenização/reparação de danos, o que é pouco prudente em uma pesquisa desse grau de complexidade operacional. I- As opções relativas à constituição do Biorrepositório no TCLE não estão adequadas. Falta informação sobre o tipo, sobre o local e sobre quem será o responsável pela guarda do material arquivado. O texto já afirma que as amostras serão guardadas em um banco de material e que serão utilizadas para pesquisas científicas, sem comentar sobre a motivação para tanto, nem contextualizar, nem dar a oportunidade de concordar com o arquivamento. As condições de descarte não são descritas e se misturam com a frase sobre a transferência dos direitos sobre o material. J- A forma de contato com os pesquisadores não inclui forma de contato em situações de emergência/urgência, o que parece ser adequado neste protocolo. A forma de contato com os pesquisadores está misturada à forma de contato com o CEP-UNICAMP e isto pode causar confusões, pois cada instância cuida de assuntos distintos. As formas de contato devem ser separadas. K) Deve ser incluída de modo claro no texto a caracterização da desistência da participação ou do abandono da participação e as ações/registros serão tomadas pelos pesquisadores para registrar esses eventos. L) Deve ficar clara a intenção dos pesquisadores em colaborar com instituição estrangeira e explicitar a mesma e a localização das amostras naquela instituição, bem como nas instituições nacionais que hospedarão as amostras. M) Deve ficar claro que acontecerá com as amostras no estrangeiro ao final dos experimentos ou em caso de dissolução da parceria. N) Há itens obrigatórios que estão ausentes do Termo, como por exemplo presença de grupo controle/placebo, métodos alternativos, aconselhamento

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

genético, garantia de esclarecimentos, garantia de entrega de via assinada e rubricada pelo pesquisador. Os modelos ajustados de TCLE devem ser apresentados.

PENDÊNCIAS QUANTO AO REGIMENTO DO BIORREPOSITÓRIO, MTA E FR:

Pendência 32- Foi apresentado o modelo ajustado de Regimento de Biorrepositório da pesquisa, mas o mesmo necessita ajustes: A) a justificativa de necessidade e oportunidade para utilização futura das amostras biológicas humanas deve ser ampliada. B) Devem ser citadas as responsabilidades envolvidas (Instituição e pesquisador); C) deve ser ampliado o detalhamento técnico e logístico referente ao armazenamento das amostras no Biorrepositório (onde e como, especificamente, será arquivado o material); D) deve ser incluída a descrição as condições ou situações para a autorização do descarte do material armazenado e sua logística; E) deve ser incluída a descrição das as condições ou situações para a autorização do descarte do material armazenado e sua logística; F) O prazo de vigência do Biorrepositório, como proposto no regimento, não é compatível com o cronograma de realização da pesquisa, como descrito na Plataforma Brasil. Os pesquisadores devem atentar para a resolução CNS 441/2011 e para a Portaria MS 2201/2011. O regimento ajustado deve ser apresentado.

Pendência 33- O MTA assinado com a Instituição Estrangeria foi apresentado em versão bilíngue e assinado pelos interessados. Há necessidade de ajustes: A) Destaca-se que o texto do mesmo é mais completo que o texto do Regimento do Biorrepositório, mesmo sendo este documento intitulado pelos pesquisadores como “Regulamento de Biorrepositório e acordo entre as partes para envio de material biológico”. Destaca-se que vários detalhes adicionais no MTA são pertinentes ao Regimento do Biorrepositório e deveriam estar contidos naquele documento. B) Há detalhes do MTA que contradizem o texto do Regimento do Biorrepositório, como por exemplo a determinação de destruição do material ao final da pesquisa e o prazo de arquivamento do material. Essas discrepâncias devem ser revistas e ajustadas. C) Há métodos citados no MTA que não podem não ter sido descritos no projeto (e vice-versa). Os pesquisadores devem conferir cuidadosamente esses dados. D) Os pesquisadores devem harmonizar os textos tornando os documentos coerentes entre si e com os demais documentos do protocolo de pesquisa. O texto ajustado do documento deve ser apresentado.

Pendência 34- A Folha de Rosto foi apresentada preenchida (131 participantes e sem patrocinador principal) e assinada pelo pesquisador responsável (Carolina Onodera) e pela Coordenadora do HEMOCENTRO-UNICAMP (Margareth Catro Ozelo). A folha de rosto apresentada antecede a solicitação de emenda e não considera a participação de patrocinadores (vide pendência sobre a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

questão do patrocínio) e nem assinala que a pesquisa agora está classificada em duas áreas temáticas especiais. A Folha de Rosto com os ajustes relativos à solicitação de emenda e resposta às pendências deve ser impressa, assinada e apresentada.

Obs.: O protocolo está classificado em duas áreas temáticas especiais e deve seguir para análise da CONEP após a aprovação pelo CEP-UNICAMP. A pesquisa emendada só pode ser iniciada após a aprovação pela CONEP.

Obs.2: Dada a complexidade do desenho e dos procedimentos propostos no protocolo, bem como pela eventual falta de sincronia entre os diversos documentos componentes do protocolo, pode ter ocorrido a descrição errônea de alguma etapa/método/proposta do protocolo. Os pesquisadores devem sentir-se absolutamente livres para apontar eventuais correções no texto do parecer.

As adequações e recomendações citadas acima devem ser respondidas, em carta resposta (com resposta pontual a cada um dos questionamentos) anexada a Plataforma Brasil, com concomitantes correções nos respectivos documentos, apresentadas em destaque (tarja amarela).

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos ao pesquisador que o estudo só pode ser iniciado após a aprovação pelo CEP, conforme compromisso assumido pelo mesmo com o cumprimento da resolução 466/2012, item XI.2 letra a. Quando for submeter respostas às pendências, verificar se o cronograma de realização da pesquisa, descrito na plataforma Brasil e no projeto anexado, está contemplando o início da coleta de dados APÓS a liberação do projeto pelo CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_105158_1_E1.pdf	10/12/2017 23:13:44		Aceito
Outros	CartadeCompromisso.pdf	10/12/2017 23:10:45	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	10/12/2017 23:08:46	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/12/2017 23:08:18	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DecdeAcordo.pdf	10/12/2017 23:05:39	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLEsCorrigidos.pdf	10/12/2017 22:57:06	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.459.658

Justificativa de Ausência	TCLEsCorrigidos.pdf	10/12/2017 22:57:06	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamentodebiorrepositoriomodelo.pdf	02/10/2017 15:47:24	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Pesquisadores	HistoricoEscolarDoutorado.pdf	02/10/2017 14:55:12	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	06/09/2017 13:37:52	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

CAMPINAS, 03 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

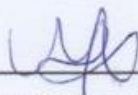
ANNEX 4 – Authorship claim

A quem possa interessar,

Informo que as cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, referentes à minha Tese de Doutorado, intitulada “Characterization of Sera From Animals Subjected to Dietary Restriction and Their Effects on Ucp1 Expression in Brown Adipocytes”, de tradução “Caracterização De Soros De Animais Submetidos À Restrição Dietética E Dos Seus Efeitos Sobre a Expressão De Ucp1 Em Adipócitos Marrons”, não infringem os dispositivos da lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de Fevereiro de 2023

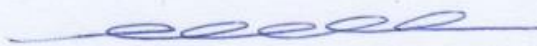
Assinatura: _____



Nome da aluna: Raissa Guimarães Ludwig

RG:36.636.731-6

Assinatura: _____



Nome do orientador: Marcelo Alves da Silva Mori

RG: 32.684.904-X