



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA CERQUEIRA BARROSO OLIVEIRA

EFEITO DO SISTEMA INCRETÍNICO SOBRE O RECRUTAMENTO DE
ADIPÓCITOS BEGE

BRASÍLIA

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA CERQUEIRA BARROSO OLIVEIRA

**EFEITO DO SISTEMA INCRETÍNICO SOBRE O RECRUTAMENTO DE
ADIPÓCITOS BEGE**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Angélica Amorim Amato
Co-Orientadora: Michella Soares Coêlho Araujo

BRASÍLIA

2018

Dedico esse aos meus pais, Antônio e Rosário, ao meu irmão, Eduardo, ao meu esposo, Ruytemberg e ao meu pequeno príncipe, Heitor, que estavam sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem sua luz e proteção nada na minha vida seria possível. Ele é o Senhor e provedor de tudo, minha fortaleza e refúgio.

Aos meus pais que sempre se esforçaram para me proporcionar uma educação de qualidade, ao meu irmão pelo carinho e cumplicidade, à minha madrinha Ducarmo pela dedicação de mãe a mim atribuída, ao meu avô Chico pelas orações.

Ao meu esposo, Ruytemberg, pela compreensão, amor e incentivo sempre a mim dedicados. Ao meu pequeno Heitor que está no meu ventre me enchendo de forças para realizar esse sonho e que com certeza veio para trazer ainda mais amor e união para a nossa família.

À minha família brasiliense, tia Anaires, seu Jalmir, Ana Beatriz e Jorge, que me acolheram em Brasília com todo amor e carinho. À minha amiga Annalu que sempre me deu força e apoio e me incluiu nessa família tão querida. Muito bom poder contar com vocês!

À minha orientadora, Profa Angélica, além de orientadora, minha mãe científica, vc é minha inspiração. Com toda sua paciência e compreensão, você me mostrou que todos somos capazes, basta nos dedicarmos com disciplina. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora, Profa Michella, obrigada por todos os ensinamentos a mim transmitidos. Todo o seu amor e dedicação à pesquisa me inspirou a melhorar como pesquisadora.

Aos professores, Francisco Neves, Adriana Lofrano, Djane Duarte, Carine Royer, Maria de Fátima Borin, Guilherme Santos, Marie Togashi pelos ensinamentos e dedicação ao laboratório.

Aos meus amigos do Farmol:

Carolina Martins, minha querida amiga e companheira de bancada, minha irmã mineirinha. Obrigada por todo o apoio e força a mim transmitidos sempre!

Angelicas queridas, Bruna, Nadyellem e Louise, obrigada por sempre estarem dispostas a me ajudar e a me acolher em todos os momentos. Vocês foram essenciais nessa conquista.

Camila Christ, minha companheira de experimentos, obrigada por toda a dedicação e apoio nos trabalhos envolvendo o modelo animal. Sempre com sua tranquilidade e disposição pronta para ajudar.

Sidney, meu amigo irmão, obrigada por todos os ensinamentos, pela ajuda nos experimentos, por ser meu psicólogo em momentos tão difíceis. Você é uma pessoa maravilhosa que enche de luz todos os lugares por onde passa!

Cinthia e Henrique, meus companheiros de laboratório e de viagem no ônibus, no metrô, nas caronas. Obrigada pela amizade e companheirismo de sempre!

Aos alunos de Pibic e estagiários, Eduarda, Aninha, Paulo, Júlio, Juliana, Malu, Pedro, Adriel, Carol, Hanna, Maria Isadora, Yasmin, Nero, Vinícius, Mariana e Paloma agradeço a contribuição nos meus experimentos e pela ajuda fundamental no laboratório.

A todos os farmolíticos, Mariella, Simone, Kaian, Camyla, Martin, Pedro, Flora, Dileesh, Gleice, Bel, Dani, Laíza, Natália, Michelly, Kim, Janice, Érica, Carol Lourenço, Rafa, Anna Paula, Sarah, Raiza, Kenzo, que fazem desse laboratório uma verdadeira família científica, muito obrigada!

À Rilva, Glorinha, Cristina e Luciano por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos veterinários, Rafael e Ana Luiza e aos técnicos do biotério, Derison, Wilson e Emiraldo pelos cuidados com os animais.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF agradeço o financiamento desse trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse sonho, muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

- Cora Coralina

RESUMO

Introdução: A liraglutida é um análogo do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) de ação prolongada utilizado como agente anti-hiperglicemiante no tratamento do diabetes tipo 2. Recentemente, foi aprovado para o tratamento da obesidade, e a redução de peso é atribuída principalmente à indução de saciedade. Entretanto, dados de estudos pré-clínicos recentes indicam que a liraglutida também pode aumentar o gasto energético por ativação dos adipócitos termogênicos marrons e bege. Para explorar este efeito, foram realizados ensaios em cultura de células e estudo *in vivo* com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (DHL). **Métodos:** Camundongos C57BL/6 machos com obesidade induzida por DHL foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos e tratados com solução salina (veículo), agonista β 3-adrenérgico CL316,243, liraglutida ou liraglutida em combinação com CL316,243. A liraglutida foi administrada por via intraperitoneal durante 21 dias (200 μ g/kg, duas vezes ao dia) e o CL316,243 foi administrado por via intraperitoneal, do dia 17 ao dia 21 (1 mg/kg/d, durante 5 dias). Foram avaliados ganho de peso, ingestão de energia e eficiência calórica. Dois depósitos diferentes de TAB (inguinal e epididimal, TABsc e TABvis) e o depósito de tecido adiposo marrom interscapular (TAMi) foram utilizados para determinação da adiposidade, análise histológica, taxa de consumo de oxigênio e expressão relativa de *Ucp-1*, *Dio2*, *Sc16a2* (MCT8), *Sc16a10* (MCT10), *Thra* e *Thrb*, por RT-qPCR. Foi avaliado também o efeito da liraglutida em células mesenquimais C3H10T1/2 induzidas a se diferenciar em adipócitos com meio completo (contendo isometilbutilxantina, dexametasona e insulina), e em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar com meio completo ou em presença de insulina. **Resultados:** O tratamento com liraglutida reduziu o ganho de peso corporal, o consumo de energia, a eficiência calórica e a adiposidade visceral e subcutânea, quando comparado com o tratamento com salina. No TAMi, a liraglutida não alterou os níveis de RNAm de *Ucp1*, mas induziu a expressão da proteína UCP1 e a taxa de consumo de oxigênio em comparação com a solução salina, e os últimos efeitos foram aditivos aos do tratamento com CL316,243. Além disso, a liraglutida induziu significativamente a expressão de *Dio2* e *Sc16a2* no TAMi. No TABsc e TABvis, o cotratamento com liraglutida e CL316,243 induziu significativamente a expressão do RNAm da *Ucp1* e da proteína UCP1, quando comparada com solução salina. Foi observado, também, aumento da taxa de consumo de oxigênio induzido por CL316,243 nos animais tratados com liraglutida, no TABsc. Não houve mudanças significativas nos níveis de RNAm de *Dio2* em resposta ao tratamento com a liraglutida em ambos os depósitos de TAB, mas uma indução significativa de *Sc16A2*. Não houve modificação significativa da expressão de *Sc16a10*, *Thra* e *Thrb* em nenhum dos depósitos. Em cultura de células, foi observado efeito adipogênico fraco da liraglutida em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar com insulina. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que o tratamento com a liraglutida induz o amarronzamento do TAB e aumenta a capacidade termogênica do TAB e do TAM, através de um mecanismo que pode envolver o aumento da ativação hormônio tireoidiano no TAM. Além disso, os efeitos da liraglutida sobre a expressão de *Ucp1* e consumo de oxigênio foram aditivos aos da sinalização β 3-adrenérgica, uma via clássica de ativação da termogênese adaptativa. Isso sugere que os agonistas dos receptores de GLP-1 podem aumentar o gasto de energia ativando adipócitos termogênicos e abre novos horizontes para tratar a obesidade. **Palavras chave:** obesidade, termogênese, incretinas, GLP1, Liraglutida, proteína desacopladora 1

ABSTRACT

Background: Liraglutide is a long-acting glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonist used as an anti-hyperglycemic agent in type 2 diabetes and recently approved as an anti-obesity agent. Weight loss is mainly attributed to induction of satiety, but data from recent studies indicate it may also increase energy expenditure by activating both brown and beige adipocytes. **Objective:** To investigate the effects of liraglutide on thermogenic adipocytes in obese mice and in cell culture. **Methods:** Male C57Bl/6 mice with high fat diet-induced obesity were randomly assigned into 4 groups and treated with saline (vehicle), the β 3-adrenergic agonist CL316,243, liraglutide or liraglutide and CL316,243. Liraglutide was administered intraperitoneally for 21 days (200 μ g/kg, twice daily) and CL316,243 was administered intraperitoneally from day 17 to day 21 (1 mg/kg/d, once daily, for 5 days). Weight gain, energy intake and metabolic efficiency were determined. Two different WAT (inguinal and epididymal, scWAT and visWAT) and the interscapular brown adipose tissue (iBAT) depots were excised for determination of adiposity, histological analysis, oxygen consumption rates, and relative expression of *Ucp-1*, *Dio2*, *Scl16a2* (MCT8), *Scl16a10* (MCT10), *Thra* and *Thrb*, by RT-qPCR. The effect of liraglutide in cell culture was investigated in mesenchymal C3H10T1/2 cells and 3T3-L1 pre-adipocytes. **Results:** Liraglutide treatment reduced body weight gain, energy intake, metabolic efficiency, visceral and subcutaneous adiposity, when compared with saline treatment. In iBAT, liraglutide did not change *Ucp1* mRNA levels but induced UCP1 protein expression and oxygen consumption rate when compared with saline, and the latter effects were additive to those of treatment with CL316,243. Moreover, liraglutide significantly induced D2 mRNA expression, in addition to significantly increasing *Scl16a2* levels. In scWAT and visWAT, liraglutide and CL316,243 cotreatment induced an indication of *Ucp1* mRNA and UCP1 protein when compared to saline. In addition, liraglutide enhanced CL316,243-induced increase in oxygen consumption rate. There were no significant changes in *Dio2* levels in response to liraglutide treatment in both WAT depots, but a significant induction of *Scl16A2*. Moreover, liraglutide showed a weak adipogenic effect in 3T3-L1 pre-adipocytes induced to differentiate in the presence of insulin. **Conclusion:** Our findings suggest that liraglutide treatment induces browning of WAT and increases the thermogenic capacity of both WAT and BAT, through a mechanism that may involve increased thyroid hormone activation in BAT. In addition, the effects of liraglutide on *Ucp1* expression and oxygen consumption were additive to those of β 3-adrenergic signalling, a classical pathway of adaptive thermogenesis activation. This suggests that GLP-1 receptor agonists may increase energy expenditure by activating thermogenic adipocytes, and opens new horizons to treat obesity.

Keywords: obesity, thermogenesis, incretins, GLP1, Liraglutide, uncoupling protein-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis complicações da obesidade. Adaptado de (26).	26
Figura 2: Origens dos diferentes tipos de adipócito.	29
Figura 3: Modulação fenotípica do tecido adiposo.	32
Figura 4. Representação esquemática do receptor de GLP-1, mostrando o domínio N-terminal, as sete hélices transmembranares ligadas por loops intra e extracelulares e o domínio C-terminal.	38
Figura 5. Vias de sinalização do GLP-1R nas células beta pancreáticas.....	39
Figura 6. Efeitos pleiotrópicos do GLP-1 ou de agonistas do receptor do GLP-1, em condições experimentais.....	40
Figura 7. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica.	61
Figura 8. Energia ingerida pelos animais que receberam dieta controle ou dieta hiperlipídica da 5ª à 16ª semana de vida.	61
Figura 9. Hiperglicemia induzida pela dieta.....	62
Figura 10. Efeito da liraglutida sobre o ganho ponderal induzido por DHL.....	63
Figura 11 . Glicemia em jejum, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média ± EPM.	63
Figura 12. Efeito da liraglutida sobre adiposidade visceral e subcutânea.	64
Figura 13. Efeito da liraglutida sobre a massa do tecido adiposo marrom interescapular.....	65
Figura 14. Efeito da liraglutida sobre a energia ingerida (A) e a eficiência calórica (B), após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média ± EPM.....	67
Figura 15. Efeito da liraglutida sobre a ingestão hídrica, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL.	67

Figura 16. Efeito da liraglutida sobre características morfológicas do fígado após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL.....	68
Figura 17. Efeito da liraglutida sobre características morfológicas do tecido adiposo marrom após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL.....	69
Figura 18. Efeito da liraglutida sobre características histológicas do tecido adiposo epididimal após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL.....	70
Figura 19. Efeito da liraglutida sobre características histológicas do tecido adiposo inguinal após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL.....	70
Figura 20. Expressão relativa de Ucp1 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida após 21 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. (A) Expressão relativa de Ucp1 no tecido adiposo branco epididimal, (B) no tecido adiposo branco inguinal e (C) no tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média ± EPM.....	71
Figura 21. Ganho de peso em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica.....	73
Figura 22. Glicemia de jejum em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica.....	73
Figura 23. Massa de tecido adiposo branco visceral e subcutâneo em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica...75	75
Figura 24. Massa de tecido adiposo marrom interescapular em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica...75	75
Figura 25. Massa do coração e rins em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica.....	76

Figura 26. Energia ingerida e eficiência calórica em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica.....	77
Figura 27. Expressão relativa de Ucp1 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica...	79
Figura 28 . Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo branco epididimal em resposta ao tratamento com liraglutida (400 μ g/kg/d, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica (CL316,243, 1 mg/kg/dia, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida).....	81
Figura 29 . Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo branco inguinal em resposta ao tratamento com liraglutida (400 μ g/kg/d, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica (CL316,243, 1 mg/kg/dia, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida).....	82
Figura 30. Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo marrom em resposta ao tratamento com liraglutida (400 μ g/kg/d, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica (CL316,243, 1 mg/kg/dia, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida).....	84
Figura 31. Consumo de oxigênio nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica.....	86
Figura 32. Expressão relativa de Dio2 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica...	88
Figura 33. Expressão relativa de Scl16a2 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica...	90
Figura 34. Expressão relativa de Scl16a10 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica...	92
Figura 35 . Expressão relativa de Thra nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.....	94
Figura 36. Expressão relativa de Thrb nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica...	96
Figura 37 . Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos com meio completo.	97

Figura 38. Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos com meio incompleto.	98
Figura 39. Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em células mesenquimais C3H10T1/2.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do peso segundo o IMC.....	23
Tabela 2: Descrição da massa molecular e do fabricante dos reagentes utilizados nesse estudo.....	45
Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.	52
Tabela 4: Número de animais por grupo na 5 ^a semana de vida, na eutanásia e ocasião das perdas.....	60
Tabela 5: Massa absoluta e relativa de tecidos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, rosiglitazona (4 mg/Kg/d) ou liraglutida (200 µg/kg/d e 400 µg/kg/d).....	66
Tabela 6: Massa absoluta e relativa de tecidos em camundongos tratados com veículo ou liraglutida na presença ou ausência de ativação β3-adrenérgica.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ¹⁸F-FDG – ¹⁸F-fluorodesoxiglicose
- Akt – Proteína cinase B
- AMPc – Adenosina monofostao cíclico
- AMPK – Proteína cinase ativada por AMP
- ANGPTL2 – Proteína 2 semelhante à angiopoietina
- AP1 – Ativador de proteína 1
- ATP – Adenosina trifosfato
- AVC – Acidente vascular cerebral
- C/EBP – Proteína de ligação ao acentuador CCAAT
- CCL2 – Ligante de quimiocina CC 2
- CD137 – Proteína do agrupamento de diferenciação 137
- CD4 – Grupamento de diferenciação 4
- CD40 – Proteína do agrupamento de diferenciação 40
- CD8 – Grupamento de diferenciação 8
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação
- CREB – Elemento de ligação a proteína responsivo ao AMPc
- CT-PET – Tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons
- CXCL5 – Ligante de quimiocina CXC5
- DC – Dieta controle
- DHL – Dieta hiperlipídica
- DM1 – *Diabetes mellitus* tipo 1
- DM2 – *Diabetes mellitus* tipo 2
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DPP-IV – Dipeptidil peptidase 4
- EN1 – Engrailed-1
- ERK – Cinases reguladoras de sinais extracelulares
- FoxC2 – Forkhead box C2
- GIP – Polipeptídeo inibitório gástrico
- GIPR – Receptor de GIP
- GLP-1 – Peptídeo 1 semelhante ao glucagon

GLP-1R – Receptor de GLP-1
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HT- Hormônio Tireoidiano
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBMX – Isobutilmetilxantina
IKK β – Inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade beta
IL-18 – Interleucina 18
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de massa corpórea
IRS-1 – Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2 – Substrato 2 do receptor de insulina
JNK– Cinase c-Jun N-terminal
Lira – Liraglutida
MAPK – Cinases 1 e 2 que regulam sinais ERK $\frac{1}{2}$
MCT8 (Slc16a2) – Transportador de Monocarboxilato 8
MCT10 (Slc16a10) – Transportador de Monocarboxilato 10
Myf5 – Fator miogênico 5
MyoD – Proteína miogênica de diferenciação
NAMPT – Fosforibosiltransferase nicotinamida
NEFA – Ácidos graxos não esterificados
NFK β – Fator nuclear kappa subunidade beta
PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PGC-1 α – Coativador 1 alfa do PPAR γ
PI3K – Fosfatidilinositol 3 cinase
PPAR γ – Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PRDM16 – Homólogos PRD1-BF1-RIZ1 contendo o domínio 16
RBP4 – Proteína de ligação ao retinol 4
RSG – Rosiglitazona
SFRP5 – Proteína secretada relacionada ao receptor *frizzled 5*(*secreted frizzled-related protein 5*)
Slc27a1 – Transportador de ácidos graxos da família 27 membro 1
T3 – Triiodotirorina

T4 – Pró-hormônio tiroxina

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

TBX1 – Proteína 1 T-box

THRa – Receptor de hormônio tireoidiano alfa

THRb- Receptor de hormônio tireoidiano beta

TMEM26 – Gene que codifica a proteína transmembrana 26

TNF – Fator de necrose tumoral

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TORC2 – Fator de translocação nuclear citoplasmático 2

UCP1 – Proteína desacopladora 1

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. OBESIDADE	23
2.1.1. Definição	23
2.1.2. Epidemiologia	23
2.1.3. Fisiopatologia e complicações	24
2.2. TECIDO ADIPOSEO	27
2.3. SISTEMA INCRETÍNICO	36
2.3.1 Fisiologia.....	36
2.3.2 Papel do sistema incretínico no tratamento do diabetes.....	40
2.3.3 Papel do sistema incretínico no tratamento da obesidade.....	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MÉTODOS	45
4.1 REAGENTES	45
4.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	45
4.2.1 Considerações éticas.....	45
4.2.2 Delineamento experimental	46
4.3 ENSAIO DE CONSUMO DE OXIGÊNIO TECIDUAL.....	49
4.4 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL TECIDUAL	49
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	51
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	53
4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	56
4.8 CULTURA DE CÉLULAS.....	58
4.8.1 Ensaio de adipogênese em cultura de células.....	58
4.8.1.1 Coloração com óleo vermelho O.....	59
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5 RESULTADOS	60
5.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	60

5.2.1 Delineamento Experimental 1	60
5.2.1.1 Ganho de peso e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica	60
5.2.1.2 Efeito da liraglutida sobre o ganho de peso e a glicemia	62
5.2.1.3 Efeito da liraglutida sobre a adiposidade, massa do coração e dos rins.	64
5.2.1.5 Efeito liraglutida sobre características histológicas do fígado e tecido adiposo	67
5.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2	71
5.2.2.1 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre o ganho de peso e a glicemia	72
5.2.2.2 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a adiposidade, massa do coração, do fígado e dos rins	74
5.2.2.3 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a ingestão de energia e sobre a eficiência calórica	77
5.2.2.4 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a expressão relativa de Ucp1	78
.....	79
5.2.2.5 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo de camundongos	80
.....	80
5.2.2.6 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre o consumo de oxigênio no tecido adiposo	85
5.2.2.5 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a expressão relativa de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano	87
.....	87
5.3 CULTURA DE CÉLULAS	97
5.3.1 Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em cultura	97
6 DISCUSSÃO	100
7 CONCLUSÃO	110
8 REFERÊNCIAS.....	112
ANEXO I.....	121

1 INTRODUÇÃO

Em 2015, um total de 107,7 milhões de crianças e 603,7 milhões de adultos eram obesos. Desde 1980, a prevalência da obesidade duplicou em mais de 70 países e aumentou continuamente na maioria dos outros. Embora a prevalência de obesidade entre crianças seja menor do que a dos adultos, a taxa de aumento da obesidade infantil em muitos países tem sido maior do que a aumento da obesidade adulta. Além disso, o índice de massa corpórea (IMC) elevado associou-se a 4,0 milhões de mortes em todo o mundo (1).

O sobrepeso e a obesidade estão associados a maior frequência de desenvolvimento de comorbidades que podem levar a uma maior morbidade e mortalidade (2). Entre as doenças associadas ao sobrepeso e à obesidade, estão diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia, doença coronariana, acidente vascular cerebral isquêmico e vários tipos de câncer (3). As estratégias de tratamento da obesidade são ainda limitadas e tem havido um grande esforço, nas últimas décadas, no sentido de se compreenderem melhor os mecanismos envolvidos na associação entre o excesso de peso e estas condições como forma de identificar potenciais alvos terapêuticos para a doença, mais específicos e efetivos. Um dos inúmeros focos de pesquisa com esse objetivo é o tecido adiposo.

Existem dois tipos principais de tecido adiposo em mamíferos, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM), e ambos compartilham a capacidade de sintetizar lipídeos e armazená-los na forma de triglicerídeos. O TAB caracteriza-se pela presença de adipócitos com grandes vesículas lipídicas uniloculares e está presente, entre outras localizações, em depósitos intra-abdominais e na região subcutânea (entre a fáscia e o músculo). O aumento de TAB intra-abdominal (TAB visceral) está correlacionado com risco elevado para disfunções metabólicas e doenças cardiovasculares.

Os adipócitos marrons encontrados no TAM apresentam característica multilocular (várias vesículas lipídicas) e numerosas mitocôndrias ricas em cristas que possuem a proteína desacopladora 1 (UCP1). Além destas diferenças morfológicas em relação ao TAB, seu papel fisiológico é distinto, particularmente em termos do metabolismo energético. O TAM oxida energia química para produzir calor como uma defesa contra a hipotermia e a obesidade (4, 5).

Aglomerados de adipócitos que expressam UCP1 e apresentam capacidade termogênica podem se desenvolver no tecido adiposo branco (TAB). Este processo é denominado amarronzamento do tecido adiposo branco e estes adipócitos são chamados de bege. Semelhantes aos adipócitos do tecido adiposo marrom, as células bege de camundongos são definidas pela sua morfologia multilocular de gotículas de gordura, alto teor mitocondrial e a expressão de um conjunto básico de genes de gordura marrom (por exemplo, *Ucp1*, *Cidea* e *Pgc1alfa*). Apesar de uma capacidade comum de executar a termogênese, adipócitos bege e marrons têm muitas características distintivas e devem ser considerados como tipos de células distintos (6).

Os adipócitos marrons e bege têm-se mostrado como alvos de estudos visto que o aumento da atividade desses adipócitos têm sido associado a resistência a obesidade em muitos modelos murinos (4). Nos seres humanos, há alguns anos, os estudos de imagem funcional, revelaram a presença de depósitos substanciais de adipócitos que expressam UCP1 em indivíduos adultos. Nestes mesmos estudos, a massa, a atividade ou ambas as características, nestes depósitos, foram menores em indivíduos obesos e idosos (7, 8). Além disso, foi observado que estes depósitos em humanos, caracterizados como tecido adiposo marrom, representam de fato adipócitos bege (9). Tendo como base os estudos apresentados, acredita-se que a pesquisa de novas ferramentas que resultem no aumento da atividade termogênica pelo recrutamento dos adipócitos bege, por exemplo, seja importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da síndrome metabólica. Candidatos plausíveis para induzir o recrutamento dos adipócitos bege são vias fisiológicas cuja ativação resulta em aumento do gasto energético por termogênese adaptativa não relacionada ao tremor (contração muscular).

A resposta incretínica refere-se a um aumento na quantidade de insulina secretada pelas células β pancreáticas após ingestão de nutrientes. Esta resposta é em grande parte devida à liberação de peptídeos intestinais insulinoatrópicos [por exemplo, peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP)], após a entrada de nutrientes no trato gastrointestinal, a partir de células enteroendócrinas localizadas na parede intestinal (10).

O GLP-1 é um hormônio incretínico que facilita a liberação de insulina em resposta à presença de nutrientes no intestino proximal. Isso resulta em maior

liberação de insulina após a administração oral de glicose em comparação com outras rotas e, portanto, aumento da captação de glicose durante um teste de tolerância oral à glicose. Por esta razão, a ativação do receptor de GLP1 (GLP-1R) para promover o aumento da liberação endógena de insulina é hoje considerada uma importante estratégia para o tratamento da hiperglicemia em pacientes com *DM 2*. Numerosos estudos demonstram que a ativação central do GLP-1R resulta em diminuição da ingestão alimentar e perda de peso (11). A ação central do GLP-1 não só suprime a ingestão de alimento mas também regula a homeostase da glicose, as respostas comportamentais ao estresse e a obesidade visceral. Além disso, a ação central do GLP-1 modula o metabolismo lipídico no tecido adiposo branco e termogênese no tecido adiposo marrom por meio da ativação do sistema nervoso simpático (12).

A liraglutida, um análogo do GLP-1 humano, é um derivado do GLP-1 de ação prolongada por ser mais resistente à ação da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-IV) que o GLP-1 nativo. Esta característica resulta da substituição da lisina pela arginina na posição 34 e da adição de um ácido glutâmico e uma cadeia de ácidos graxos de 16 carbonos ao resíduo de lisina na posição 26 do GLP-1 (13). A estimulação central do receptor GLP-1R pelo agonista liraglutida através da administração intracerebroventricular, leva a perda de peso corporal, independente da redução da ingestão de alimentos. Esta perda de peso é atribuída, entre outros aspectos, à ativação do programa termogênico no tecido adiposo marrom (12), sugerindo que a ativação do sistema incretínico estimula a termogênese no tecido adiposo marrom. Entretanto, não se sabe ainda se a estimulação desse sistema induz a aquisição de um fenótipo semelhante ao marrom no tecido adiposo branco, o que caracteriza o tecido adiposo bege. Para nosso conhecimento, não há estudos que avaliaram o papel da ativação deste receptor sobre aquisição de fenótipo de tecido adiposo bege pelo TAB.

Um estudo recente mostrou que um inibidor de DPP-IV (enzima que degrada o GLP-1) associado a um agonista de PPAR γ resultou em perda da massa corpórea e também no aumento da expressão de genes seletivos do adipócito bege no TAB (14). Entretanto, os dados deste estudo não permitiram definir se o aparecimento de adipócitos bege no TAB foi resultado da ação direta do GLP-1 (cuja concentração circulante aumenta com o uso de um inibidor de sua degradação), ou se isto seria resultado da ativação do PPAR γ pelo agonista. Desta forma, é necessário, ainda,

esclarecer o papel da ação direta do GLP-1 no recrutamento do adipócito bege. Pretende-se, assim, investigar o efeito do sistema incretínico, por meio do uso de um análogo do GLP-1, sobre o recrutamento de adipócitos bege no TAB. Os dados gerados pelo projeto proposto poderão contribuir para caracterizar de forma mais detalhada os efeitos deste sistema sobre o tecido adiposo e, talvez, fundamentar estratégias de modulação de sua atividade como forma de tratamento ou prevenção da obesidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. OBESIDADE

2.1.1. Definição

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*)(15), obesidade e sobrepeso são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. Uma medida bruta da obesidade na população é feita pelo índice de massa corpórea (IMC), que corresponde ao peso (em quilogramas) dividido pela altura (em metros) ao quadrado. IMC igual ou superior a 30 kg/m² é considerado obesidade e igual ou maior que 25 kg/m², sobrepeso (15). A partir do valor do IMC pode-se classificar o peso e determinar o risco para comorbidades, como apresentado na tabela 1(16).

Tabela 1: Classificação do peso segundo o IMC.

Classificação	IMC (kg/m ²)	Risco de Comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5 – 24,9	Médio
Sobrepeso	≥ 25	-
Pré-obeso	25 – 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 – 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 – 39,9	Grave
Obeso III	≥ 40	Muito grave

Fonte: Adaptado da OMS (2000)

2.1.2. Epidemiologia

A prevalência da obesidade praticamente triplicou em todo o mundo desde 1975. Embora os países subdesenvolvidos continuem a lidar com os problemas de doenças infecciosas e desnutrição, eles também estão experimentando um aumento de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis, tais como obesidade e excesso de peso, particularmente em ambientes urbanos. Não é incomum encontrar desnutrição e obesidade coexistentes dentro do mesmo país, na

mesma comunidade e no mesmo domicílio. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos apresentavam excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos. Cerca de 40% dos adultos com idade igual ou superior a 18 anos (39% dos homens e 40% das mulheres) tinham excesso de peso. No geral, cerca de 13% da população adulta mundial (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos em 2016. A maioria da população do mundo vive em países onde o sobrepeso e a obesidade estão associados a maior mortalidade que o baixo peso (17).

De acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel Brasil 2016), no Brasil, em 2016, a frequência de excesso de peso (sobrepeso e obesidade) na população masculina chegava a 57,7%, contra 50,5% na feminina. O excesso de peso cresceu 26,3 % em dez anos, passando de 42,6 % em 2006 para 53,8 % em 2016. A obesidade, por sua vez, cresceu 60% em dez anos, passando de 11,8 % em 2006 para 18,9 % em 2016. Observou-se que a obesidade duplica a partir dos 25 anos (passa de 8,5% dos 18 aos 24 anos para 17,1 % dos 25 aos 34 anos) (18).

2.1.3. Fisiopatologia e complicações

A obesidade pode ser vista como uma desordem do balanço energético sistêmico e defeitos moleculares que contribuem para a fisiopatologia do estado obeso e podem existir em qualquer um dos sistemas responsáveis pela regulação da ingestão de alimentos e gasto de energia. Um tipo de célula em que anomalias potenciais podem existir é o adipócito (19).

Acredita-se que a obesidade é causada pelo aumento da disponibilidade de alimentos altamente energéticos, mudanças no ambiente e menor prática de atividade física, criando um ambiente “obesogênico”. Embora o consumo de energia deva exceder o gasto de energia para resultar em ganho de peso e que ambientes “obesogênicos” sejam permissivos para que isso ocorra, estes nem sempre são necessários ou suficientes para causar a obesidade. Existem fatores adicionais que podem contribuir para a obesidade, entre eles fatores reprodutivos, micro-organismos, redução da variabilidade da temperatura ambiente, desreguladores endócrinos, menor tempo de sono e fármacos (20).

A obesidade é caracterizada pela ativação de um processo inflamatório em locais metabolicamente ativos tais como o tecido adiposo, fígado e células do sistema imunológico (21). Os adipócitos produzem citocinas, quimiocinas e adipocinas que podem iniciar a inflamação. Uma característica marcante da obesidade é a hipertrofia dos adipócitos, o que altera o seu perfil secretor para um perfil pró-inflamatório (22).

A capacidade de hipertrofia ou expansão do tecido adiposo, em resposta ao excesso de ingestão calórica, é uma resposta sistêmica importante para evitar o efeito lipotóxico exercido pelo excesso de lipídios e deposição de ácidos graxos em outras células, que não os adipócitos (23). Eventualmente, a hipertrofia também pode levar à morte de adipócitos e à liberação dos seus conteúdos celulares para o espaço extracelular, que também contribui para a resposta inflamatória. A associação entre a morte do adipócito e a resposta inflamatória é evidenciada, morfológicamente, pela presença de macrófagos que circundam os adipócitos mortos para formar estruturas semelhantes a coroas, ou *crown-like* (22).

O aumento da quantidade de gordura corporal é acompanhado por profundas alterações fisiológicas. Estas alterações são de certa forma dependentes da distribuição regional do tecido adiposo. A obesidade generalizada resulta em alteração do volume total de sangue e da função cardíaca, ao passo que a distribuição de gordura ao redor da caixa torácica e abdome restringe excursão respiratória e altera a função respiratória. A deposição visceral intra-abdominal de tecido adiposo, por sua vez, é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de hipertensão, concentrações elevadas de insulina no plasma, resistência à insulina, DM2 e dislipidemia (24).

A adiposidade e a distribuição de gordura corporal influenciam o metabolismo da glicose por mecanismos independentes. O aumento da obesidade na parte superior do corpo é acompanhado por progressivo aumento da glicemia e da resposta da insulina à glicose, resultando em correlação positiva entre o aumento da obesidade na parte superior do corpo e a resistência à insulina (24).

O sobrepeso e a obesidade estão associados com diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia, asma, artrose, entre outras comorbidades (25), como representado na figura 1. Muitas delas são decorrentes da relação entre a obesidade visceral ou intra-abdominal e a resistência insulínica.

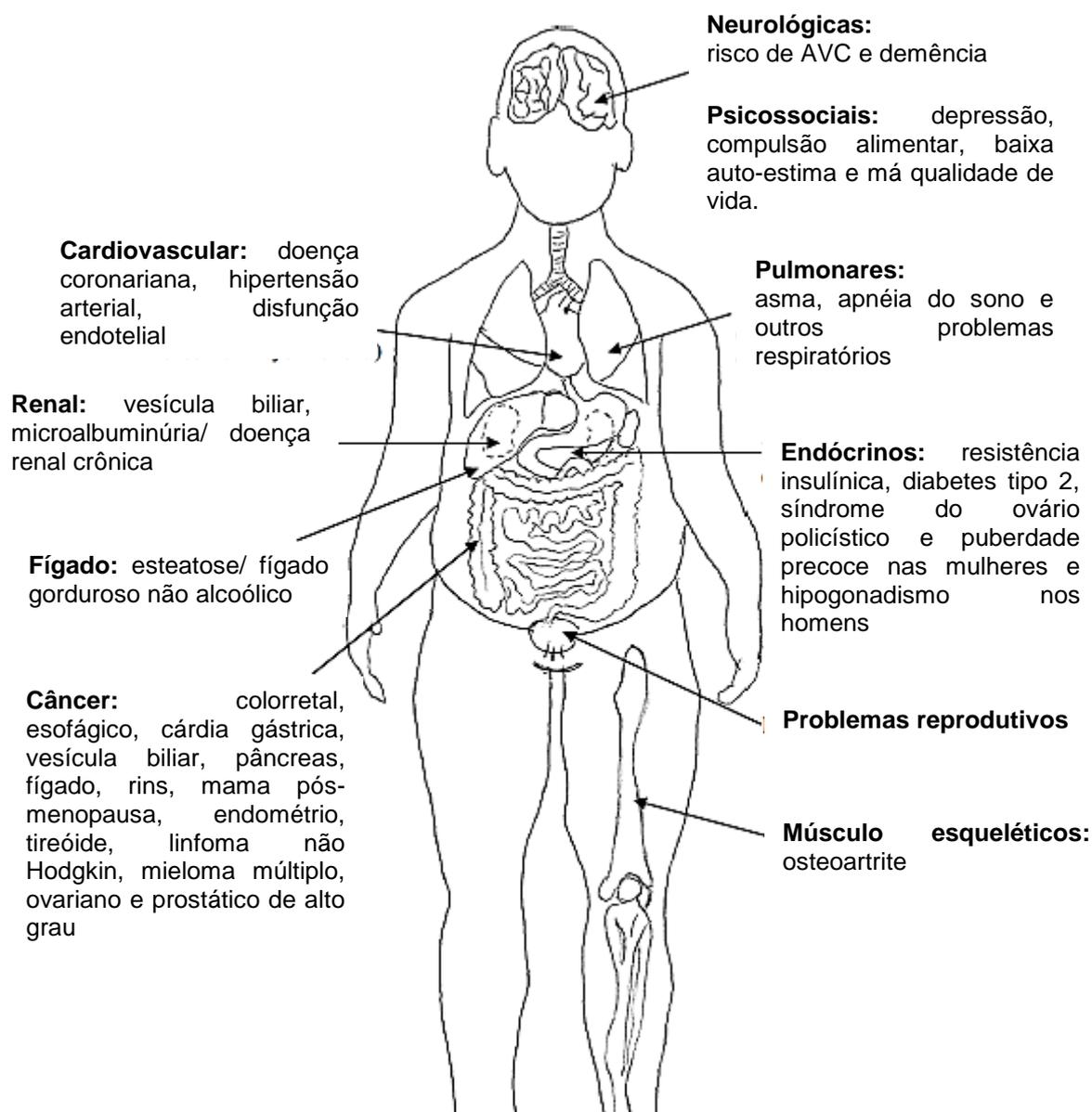


Figura 1. Possíveis complicações da obesidade. Adaptado de (26).

A obesidade é um dos componentes da síndrome metabólica e contribui para a hipertensão, elevação dos triglicerídeos e diminuição do HDL (lipoproteína de alta densidade) séricos e hiperglicemia, e está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. A obesidade abdominal, especialmente, correlaciona-se com

fatores de risco metabólico. O excesso de tecido adiposo libera vários produtos que, aparentemente, agravam esses fatores de risco. Eles incluem ácidos graxos não esterificados (NEFA), citocinas pró-inflamatórias e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1). Altas concentrações de NEFA no plasma sobrecarregam o músculo e fígado com lipídios, o que resulta em deposição ectópica de triglicerídeo nestes tecidos e, mecanismo de lipotoxicidade, aumenta a resistência insulínica local. Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias resultam em estado pró-inflamatório que também compromete a sinalização insulínica nestes tecidos. Elevação da concentração circulante de PAI-1, por sua vez, contribui para estado trombótico, enquanto que baixas concentrações de adiponectina associadas à obesidade se correlacionam ao agravamento da resistência insulínica e dos fatores de risco metabólico (27).

2.2 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é um órgão extremamente complexo, com muitos efeitos sobre a fisiologia e a fisiopatologia de doenças metabólicas, mas nem sempre foi visto dessa forma. Até o final da década de 1940, o tecido adiposo foi caracterizado como um tipo de tecido conjuntivo que apresentava gotículas lipídicas, sem que apresentasse relevância para o metabolismo. A caracterização de sua importância para a regulação do metabolismo energético começou com a descoberta de que o tecido adiposo desempenha importante papel na homeostase de nutrientes, representa sítio de armazenamento de calorías após a alimentação e fonte de ácidos graxos livres circulantes no período de jejum (28).

Do final dos anos 1980 a meados da década de 1990, veio a descoberta de fatores séricos derivados do tecido adiposo, como adiposina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e leptina. Logo, o tecido adiposo passou a ser considerado órgão endócrino com papel central na homeostase energética. Desde então, os estudos sobre os aspectos de desenvolvimento, funcionais e fisiopatológicos do tecido adiposo têm expandido significativamente (29).

2.2.1 Tipos de adipócito

Existem dois tipos de adipócitos clássicos em mamíferos, o branco e o marrom. Os adipócitos brancos são os mais numerosos nos depósitos de tecido adiposo. Eles

têm uma grande vesícula lipídica unilocular, são pobres em mitocôndrias e sua principal função é regular o armazenamento e a liberação dos estoques de energia. Adipócitos marrons têm uma distribuição mais limitada, contêm várias gotículas lipídicas menores (aparência multilocular), são ricos em mitocôndrias, desacoplam a respiração celular da síntese de adenosina trifosfato (ATP) por ação da proteína desacopladora 1 (UCP1), dissipando energia química na forma de calor (30, 31).

Há também adipócitos que são semelhantes ao adipócito marrom, na medida em que apresentam morfologia multilocular e expressam UCP1, e encontram-se no tecido adiposo branco de roedores e de humanos. Estes foram chamados de adipócitos marrons adaptativos ou recrutáveis, adipócitos marrons em brancos (*brown from white*, brite) ou adipócitos bege. O desenvolvimento dos adipócitos bege no tecido adiposo branco é mais evidente durante a adaptação ao frio ou em resposta ao tratamento com agonistas adrenérgicos β 3 seletivos (4).

Os adipócitos marrons clássicos originam-se de células do dermomiótomo que expressam o gene *EN1* (*engrailed-1*) e de precursores que expressam o fator miogênico 5 (*Myf5*), assim como os miócitos. Em contraste, os adipócitos branco e bege originam-se de precursores *Myf5*-negativos (32-34). O destino celular final destes precursores é determinado por uma variedade de fatores celulares intrínsecos e extrínsecos. Por exemplo, a expressão da proteína miogênica de diferenciação (*MyoD*) e da miogenina por precursores *Myf5*-positivos leva ao desenvolvimento de miócitos, enquanto que a expressão de PRDM16 (homólogos PRD1-BF1-RIZ1 contendo o domínio 16) por precursores *Myf5*-positivos leva ao desenvolvimento de adipócitos marrons (34, 35), como apresentado esquematicamente na figura 2.

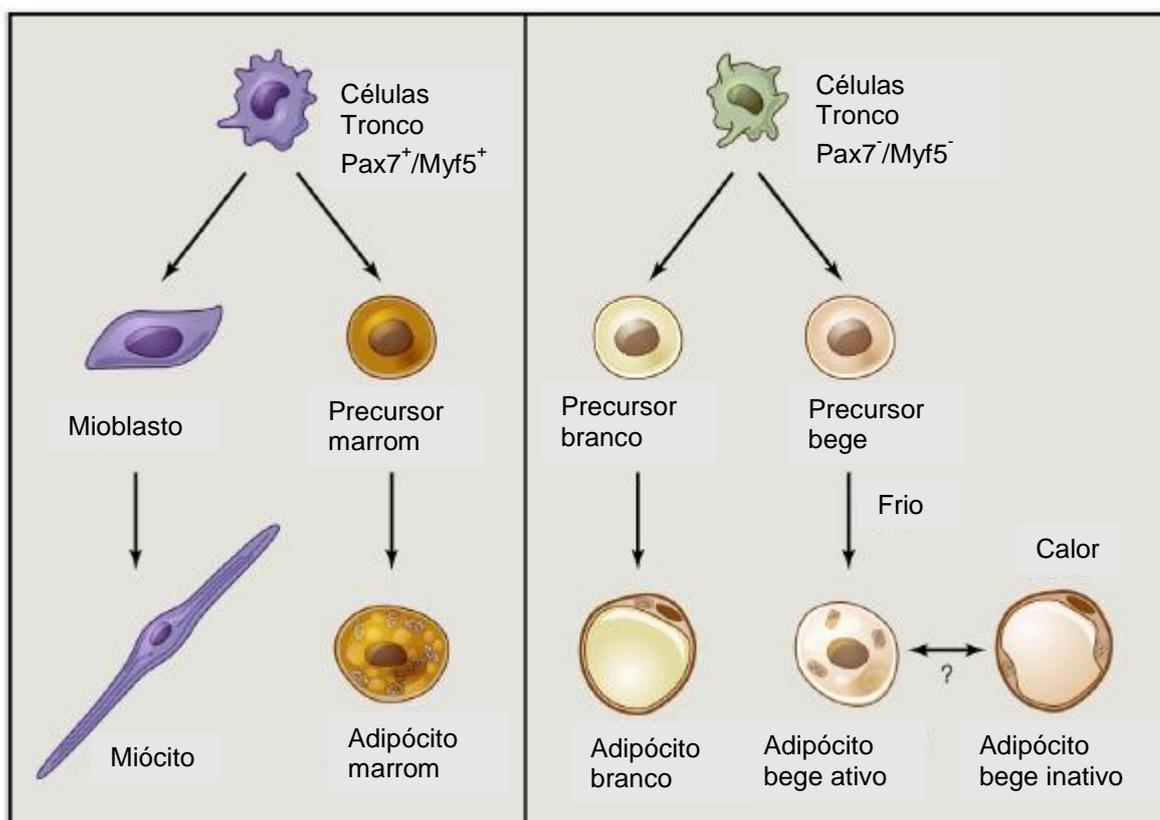


Figura 2: Origens dos diferentes tipos de adipócito. Adipócitos branco e bege derivam de células Pax7-/Myf5- via precursores celulares distintos. Os adipócitos bege diferenciam-se em resposta ao frio ou outros indutores. Quando o estímulo do frio é removido essas células tornam-se inativas e adquirem a morfologia de um adipócito branco. O adipócito marrom clássico deriva da linhagem Pax7+/Myf5+ assim como o músculo esquelético. Adaptado de (28).

Apesar das diferenças nas origens de desenvolvimento e funções fisiológicas dos adipócitos marrom e branco, ambos os tipos de células partilham uma cascata de transcrição muito semelhante que controla o processo de diferenciação de adipócitos. Estudos detalhados da diferenciação de adipócitos brancos tinham anteriormente identificado o PPAR γ (receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais) e a C/EBP (proteína de ligação ao acentuador CCAAT) como fatores transcricionais chave (36).

O PPAR γ é absolutamente necessário para o desenvolvimento de ambos os adipócitos, branco e marrom. O C/EBP funciona cooperativamente com o PPAR γ e estimula uma cascata de transcrição que promove e mantém o estado diferenciado estável dos adipócitos. Entretanto, diferentemente do PPAR γ , que participa do desenvolvimento do adipócito branco e do marrom, é possível que diferentes subtipos de C/EBPs estejam implicados no desenvolvimento e função de cada um destes tipos

de adipócito. O C/EBP α , por exemplo, é necessário apenas para a formação do adipócito branco, mas não do adipócito marrom, sugerindo possível papel para outros membros da família C/EBP no desenvolvimento do adipócito marrom (37). C/EBP- β e δ , assim como outros fatores de transcrição, também participam da cascata transcricional da adipogênese pela regulação da expressão do PPAR γ . A diferenciação de adipócitos marrons requer PPAR γ , mas este fator por si só não é suficiente para conduzir células mesenquimais a adipócitos marrons. Isso resultou na procura de componentes tradicionais que promovem especificamente um programa genético de adipócitos marrons, incluindo a expressão da UCP1 (38). Vários fatores de transcrição e co-fatores que afetam a expressão da UCP1 e a de outros genes chave seletivos de adipócitos marrons tem sido identificados. Entre eles estão FoxC2 (*forkhead box C2*), PGC-1 α (coativador 1 alfa do PPAR γ) e PRDM16 (35, 39, 40).

A PRDM16 é um co-regulador transcricional que controla o desenvolvimento de adipócitos marrons em depósitos de tecido adiposo marrom clássico (41). Seale *et al* (2011)(4) observaram que a PRDM16 é altamente expressa no tecido adiposo branco subcutâneo quando comparado ao tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal, e que camundongos transgênicos que hiperexpressam PRDM16 no tecido adiposo apresentam adipócitos com fenótipo semelhante ao do marrom no tecido adiposo subcutâneo. Os autores observaram ainda, nestes animais, aumento do gasto energético e proteção contra obesidade e intolerância à glicose induzidas por dieta hiperlipídica. Estes resultados indicam que a PRDM16 é um regulador chave do desenvolvimento de adipócitos bege e termogênese no tecido adiposo subcutâneo.

2.2.2 Papel do adipócito na obesidade

Os adipócitos constituem o principal componente celular do tecido adiposo e são os principais depósitos para armazenamento de energia na forma de gotículas de triglicerídeos. Adipócitos pequenos, recém-formados agem como depósitos ou armazenadores, que avidamente internalizam ácidos graxos livres no período pós-prandial e os armazenam na forma de triglicerídeos. Quando os adipócitos crescem muito tornam-se disfuncionais, na medida em que passam a ser resistentes à insulina e, assim, a apresentar lipólise em excesso e por resistência aos efeitos anti-lipolíticos da insulina (42, 43).

2.2.2.1 Adipócito branco

A obesidade é caracterizada pela expansão da massa do tecido adiposo branco devido a aumento tanto do número (hiperplasia) como no tamanho (hipertrofia) dos adipócitos, e está estreitamente relacionada com a resistência à insulina nos tecidos periféricos, tais como fígado e músculo esquelético. Isso ocorre porque no contexto de excesso crônico de ingestão calórica o TAB atinge o seu limiar para armazenamento de lipídios, a partir do qual se torna disfuncional (44).

Adipócitos hiperplásicos e hipertróficos excedem seu limite de difusão de oxigênio, e disso resulta hipóxia, estresse do retículo endoplasmático e morte celular, o que contribui para redução da eficiência do tecido adiposo como sítio para armazenamento de lipídeos. Com isso, aumentam os ácidos graxos livres circulantes, que passam a depositar-se, na forma de triglicerídeos, em sítios ectópicos. A combinação de hipóxia e sobrecarga lipídica nos adipócitos hiperplásicos e hipertróficos desencadeia recrutamento de células imunes, tais como macrófagos e seus ativadores, para o tecido adiposo. Estes adipócitos, infiltrados por célula imunológicas, secretam grande quantidade de mediadores inflamatórios que promovem estado pró-inflamatório por ativação de $IKK\beta$ - $NFK\beta$ (inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade beta – fator nuclear kappa subunidade beta) e das vias de sinalização JNK-AP1 (cinase c-Jun N-terminal – ativador de proteína 1). A ativação da JNK leva à fosforilação de resíduos de serina no IRS-1 e 2 (substrato 1 e 2 do receptor de insulina), moléculas cruciais na sinalização da insulina e, conseqüentemente, inibe a ação da insulina. Estes eventos causam resistência à insulina nos adipócitos, exacerbam o estado inflamatório e a resistência sistêmica à insulina (45), como apresentado esquematicamente na figura 3.

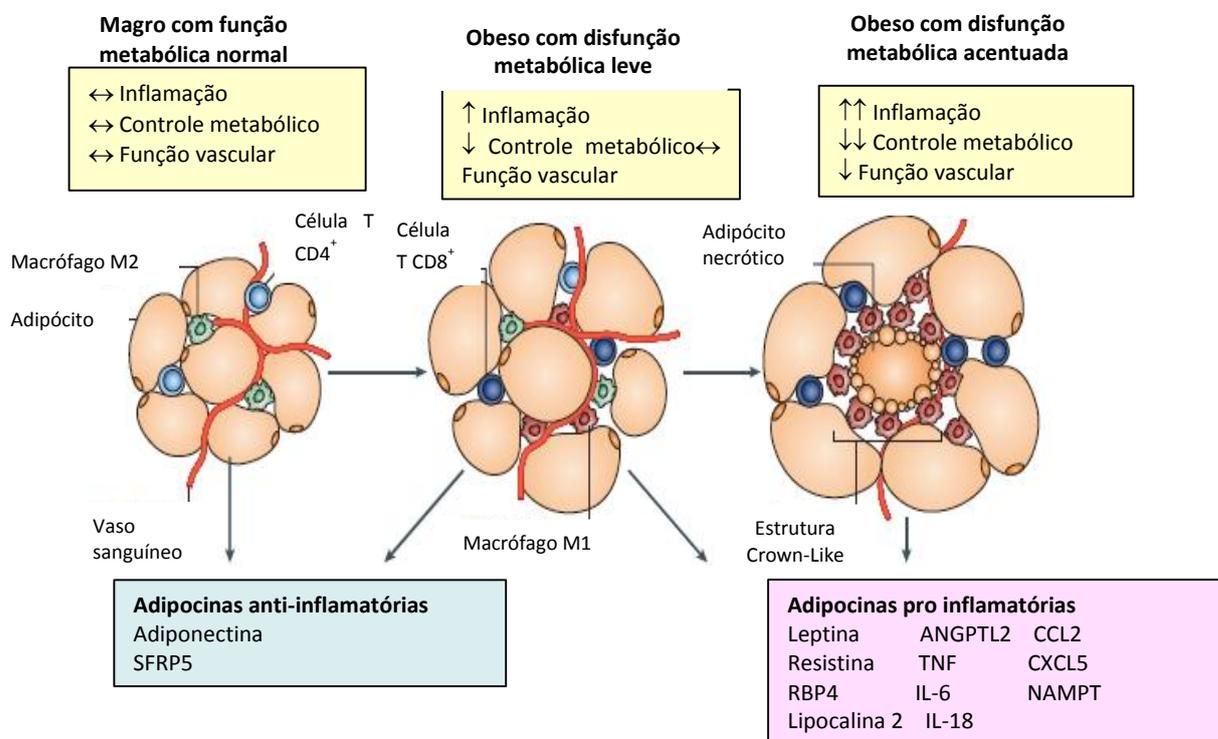


Figura 3: Modulação fenotípica do tecido adiposo. O tecido adiposo pode ser descrito por, pelo menos, três classificações estruturais e funcionais: magro com função metabólica normal, obeso com disfunção metabólica leve e obeso com disfunção metabólica acentuada. RBP4, proteína de ligação ao retinol 4; ANGPTL2, proteína 2 semelhante à angiopoietina; TNF, fator de necrose tumoral; IL-6, interleucina 6; IL-18, interleucina 18; ligante de quimiocina CC 2 (CCL2); ligante de quimiocina CXC 5 (CXCL5); fosforibosiltransferase nicotinamida (NAMPT). Adaptado de (46).

2.2.2.2 Adipócitos bege e marrom

O tecido adiposo marrom está presente em roedores durante toda a vida. Em humanos, é encontrado principalmente em lactentes e crianças pequenas, e é considerado como sendo essencialmente inexistente e sem relevância fisiológica em adultos (47). Um estudo recente em humanos adultos, combinando tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada (CT-PET) identificou depósitos de tecido adiposo hipermetabólico, caracterizado por elevada taxa de captação de ¹⁸F-fluorodesoxiglicose (¹⁸F-FDG), na região cervical anterior e no tórax, considerado como depósitos de tecido adiposo marrom. Estes depósitos foram observados com maior frequência em mulheres do que em homens e se correlacionaram inversamente com IMC (8). A partir da identificação de tecido adiposo hipermetabólico e,

potencialmente termogênico, em humanos adultos, houve aumento do interesse por estudar estes depósitos como alvos para o tratamento da obesidade.

O tecido adiposo marrom representa um alvo natural para a modulação do gasto de energia. Quando ativado, capta substratos a partir da circulação, principalmente ácidos graxos livres, mas também glicose. O principal papel fisiológico do tecido adiposo marrom em mamíferos pequenos (e recém-nascidos humanos) é a manutenção da temperatura corpórea. Para isso, mitocôndrias no adipócito marrom liberam energia química na forma de calor pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, tornando o processo de respiração extremamente ineficiente. Este fenômeno é mediado pela UCP1, que diminui o gradiente elétrico transmembrana da membrana interna das mitocôndrias e, portanto, libera energia na forma de calor, em vez de armazená-la como ATP (47). Entre os fatores que regulam a expressão e atividade da UCP1, destacam-se o hormônio tireoidiano (triiodotironina, T3) e a sinalização β 3-adrenérgica. A expressão da UCP1 é regulada diretamente pelo T3, gerado no interior do adipócito marrom pela 5' desiodinação do pró-hormônio tiroxina (T4), do que resulta um estado hipertireoideo tecido-específico na ausência de alterações nas concentrações circulante de hormônio tireoidiano (48). A sinalização β 3-adrenérgica também modula este processo e evidências recentes indicam que o consumo alimentar resulta em uma ativação semelhante da UCP1, sugerindo que o tecido adiposo marrom poderia desempenhar um papel importante na homeostase energética em curto prazo (49).

Tanto os adipócitos bege como os marrons expressam UCP1. A identificação de células que expressam UCP1 em humanos adultos, quer sejam adipócitos bege ou marrons, e dos mecanismos que regulam seu desenvolvimento, é tarefa importante pois aí residem informações relevantes a respeito do potencial terapêutico desses adipócitos (50).

Apesar da semelhança entre esses adipócitos (marrons e bege), eles possuem assinaturas genéticas distintas. A expressão de determinados genes, denominados “seletivos do adipócito bege”, pode distingui-los dos marrons e dos adipócitos brancos. Genes expressos seletivamente no adipócito bege incluem um fator transcricional de desenvolvimento (TBX1), um componente de vias do metabolismo de lipídios (Slc27a1), moléculas conhecidas por serem importante nas vias de respostas imune e inflamatórias (CD40, CD137) e o TMEM26 (que codifica a proteína transmembrana

26). Essa diferença na assinatura genética leva a diferenças funcionais entre os adipócitos bege e os marrons. Os adipócitos bege expressam baixos níveis de genes do programa termogênico, incluindo UCP1, no estado basal (não estimulado), assemelhando-se aos adipócitos brancos. Por outro lado, uma vez estimulados por agonistas beta adrenérgicos ou pelo frio por exemplo, os adipócitos bege ativam a expressão da UCP1 para níveis semelhantes aos dos adipócitos marrons clássicos. Assim, os adipócitos bege têm a capacidade de alternar entre os fenótipos de armazenamento ou dissipação de energia o que o diferencia dos demais tipos de adipócito (31).

A maioria das variáveis indicadoras de saúde metabólica, tais como concentração circulante de glicose e lipídeos, é influenciada pela atividade dos adipócitos marrons (e, possivelmente, também pelos adipócitos bege). Por isso, uma profunda compreensão dos mecanismos subjacentes à formação e destruição dos adipócitos marrons e bege em humanos oferece a possibilidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas para a perda de peso, resistência à insulina e dislipidemia. Neste contexto, a indução do recrutamento de adipócitos bege no tecido adiposo branco, ou amarronzamento do tecido adiposo branco, representa abordagem potencialmente importante para converter adipócitos brancos prejudicialmente sobrecarregados de lipídios, em adipócitos bege metabolicamente ativos e saudáveis (50).

2.2.3 Termogênese no tecido adiposo

A liberação de calor no tecido adiposo marrom é resultado do sinergismo entre a sinalização da norepinefrina e do T_3 . O significado do sistema nervoso central na ativação do hormônio tireoidiano do tecido adiposo marrom (TAM) foi demonstrado em ratos em que a administração central de T_3 , via inibição da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) hipotalâmica, induziu a expressão de genes termogênicos no TAM através da estimulação da atividade do sistema nervoso simpático (SNS). Além disso, a estimulação do SNS resulta em ativação de receptores β -adrenérgicos, o que induz tanto a atividade termogênica melhorada dos adipócitos marrons existentes como o recrutamento de novas células para o TAM. A liberação de energia é realizada pela atividade da UCP1. Com relação ao tecido adiposo branco, uma população distinta de adipócitos UCP1-positivos ocorrem dentro de depósitos

subcutâneos e viscerais de camundongos em resposta à exposição a frio e ao tratamento com agonista dos receptores β_3 adrenérgicos (51).

As proteínas do receptor de hormônio tireoidiano (THR) humanas são transcritas a partir de dois genes separados, THRA e THRB, cada um dos quais possui um homólogo em camundongos, conhecido como *Thra* e *Thrb*, respectivamente. A ligação de T3 aos THRs pode resultar em uma diminuição ou um aumento das taxas de transcrição dos genes alvo. THRs podem se unir constitutivamente aos elementos responsivos do hormônio tireoidiano dos genes alvo do T3. Além disso, esses receptores podem atuar de maneira independente do ligando, de modo que a taxa de transcrição dos genes alvo pode mudar dependendo se o THR está ou não ligado a T3 (52).

Após a complexa integração de vários sinais metabólicos aferentes ao hipotálamo, o hormônio de liberação do hormônio tireoidiano (HT) leva a glândula pituitária a secretar o hormônio estimulador da tireóide, que por sua vez, ativa a glândula tireóide para produzir e secretar o hormônio tireoidiano. Nos seres humanos, está principalmente na forma de tetraiodotironina (também referida como tiroxina, T4), e até certo ponto, triiodotironina (T3). T4 é então convertido em T3 por enzimas deiodinase, que permitem a modulação pré-receptora específica do tempo e do tecido do sinal hormonal. A maioria dos T4 e T3 está ligada à globulina de ligação à tiroxina (TBG) e a outras na circulação, e somente os livres exercem efeitos biológicos. O HT apresenta efeitos diretos e indiretos sobre o gasto energético. Os efeitos diretos referem-se a ações TH que inerentemente causam um aumento na utilização de ATP. Embora os efeitos diretos tenham demonstrado ser importantes nos gastos de energia induzidos pelo HT, a termogênese induzida pelo HT pode ser atribuída a efeitos indiretos. Os efeitos indiretos resultam em uma maior capacidade de gasto energético através de caminhos não genômicos e biogênese mitocondrial, e também uma redução na eficiência metabólica no estágio de produção de ATP, ativando mecanismos de desacoplamento (53).

2.3 SISTEMA INCRETÍNICO

Hormônios incretínicos são peptídeos secretados por células neuroendócrinas no trato gastrointestinal e que medeiam o efeito incretínico. Este é descrito como aumento da secreção de insulina observada após a ingestão oral de glicose quando comparada à secreção de insulina após administração intravenosa de glicose. Esse aumento é de três a quatro vezes maior em condições fisiológicas (54). Embora seja possível que existam muitos hormônios liberados após a alimentação com efeitos sobre a secreção de insulina, dados experimentais sugerem que os dois mais importantes são o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) (55).

2.3.1 Fisiologia

O GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos sintetizado e secretado a partir de células enteroendócrinas K localizadas principalmente no duodeno e jejuno proximal, sendo descrita também produção do GIP no sistema nervoso central (56). O GLP-1 é um peptídeo de 30 aminoácidos sintetizado e secretado a partir das células enteroendócrinas L encontradas no intestino delgado distal e cólon, após o processamento pós-traducional do pró-glucagon pela pró-hormônio convertase 1/3 (57-59). O pró-glucagon é processado a glicentina, oxintomodulina, GLP-1 e GLP-2 nas células L. As formas biologicamente ativas do GLP-1, geradas a partir do GLP-1-(1-37), são o GLP-1-(7-37) e GLP-1-amida-(7-36). Estas duas formas são equipotentes e a segunda é a mais encontrada no plasma humano (57).

O GIP contém uma alanina na posição 2, o que o torna um excelente substrato para a DPP-4, uma enzima essencial na regulação da degradação do GIP e do GLP-1. O GIP ativo (1-42) é convertido na sua forma inativa (3-42) dentro de poucos minutos após a secreção pelas células K do trato gastrointestinal (TGI). Ambas as formas ativas do GLP-1 também contêm alanina na posição 2 e são rapidamente degradadas pela DPP-4 às formas inativas GLP-1-amida-(9-36) e GLP-1-(9-37), depois da liberação pelas células L do TGI. A degradação do GLP-1 é extremamente rápida de modo que uma proporção substancial de GLP-1 imunorreativo no sistema

porta e na circulação sistêmica representa formas que já foram clivadas pela DDP-4 (57).

O GIP exerce a sua ação pelo receptor de GIP (GIPR), uma proteína heterotrimérica que apresenta duas isoformas, com 466 e com 493 aminoácidos, possui 7 domínios transmembrana e é membro da superfamília do receptor de glucagon acoplado à proteína G. GIPR é altamente expresso no pâncreas, estômago, intestino delgado, tecido adiposo, córtex da adrenal, pulmão, hipófise, coração, testículo, endotélio vascular, osso e cérebro. A ativação do GIPR está acoplada à ativação da adenilato ciclase, aumento do cálcio intracelular e efluxo de ácido araquidônico. O GIP estimula vias de sinalização de fatores de crescimento, incluindo MAPK (cinases 1 e 2 que regulam sinais [ERK 1/2], fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e proteína cinase B (Akt) (57, 60).

O receptor de GLP-1 (GLP-1R) pertence à mesma família dos receptores do glucagon e do GIP. É um receptor heptahelicoidal com 463 aminoácidos (figura 4) e acoplado à proteína G, altamente expresso nas ilhotas pancreáticas, rins, pulmão, coração, cérebro, trato gastrointestinal, tecido adiposo, músculo e fígado. A ativação do GLP-1R estimula a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e ativa vias de sinalização acopladas à proteína cinase A e a fatores de troca de nucleotídeos guanina regulados por AMPc (59, 61). Os agonistas do GLP-1R promovem a fosforilação do elemento de ligação a proteína responsivo ao AMPc (CREB) e também a regulação da atividade do CREB por estimulação da glicose dependente do fator de translocação nuclear citoplasmático TORC2, um coativador do CREB. A ativação do GLP-1R está acoplada também ao aumento intracelular de cálcio, à inibição das correntes de potássio voltagem-dependentes e à ativação imediata da expressão de genes por efeitos sobre a Erk 1/2, proteína cinase C e PI3K (Drucker, 2006) como apresentado na figura 5.

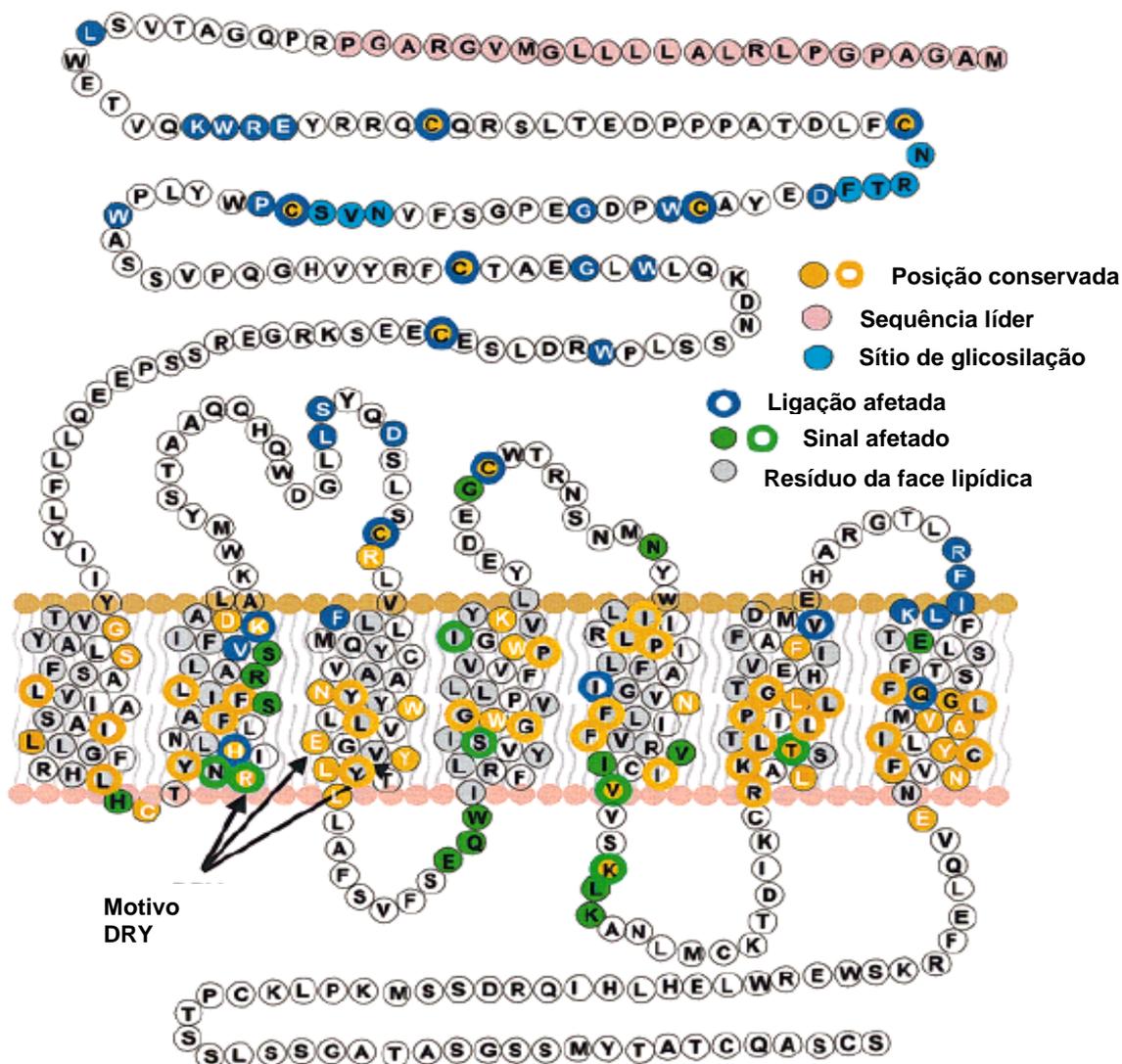


Figura 4. Representação esquemática do receptor de GLP-1, mostrando o domínio N-terminal, as sete hélices transmembranares ligadas por loops intra e extracelulares e o domínio C-terminal. O domínio N-terminal contém 6 cisteínas que formam ligações dissulfeto. Os resíduos cercados por um anel azul ou verde são determinados experimentalmente a serem ligação e sinal afetados respectivamente. Os resíduos na cor cinza têm afinidade pela face lipídica da membrana. As posições conservadas estão em laranja. Adaptado de (62).

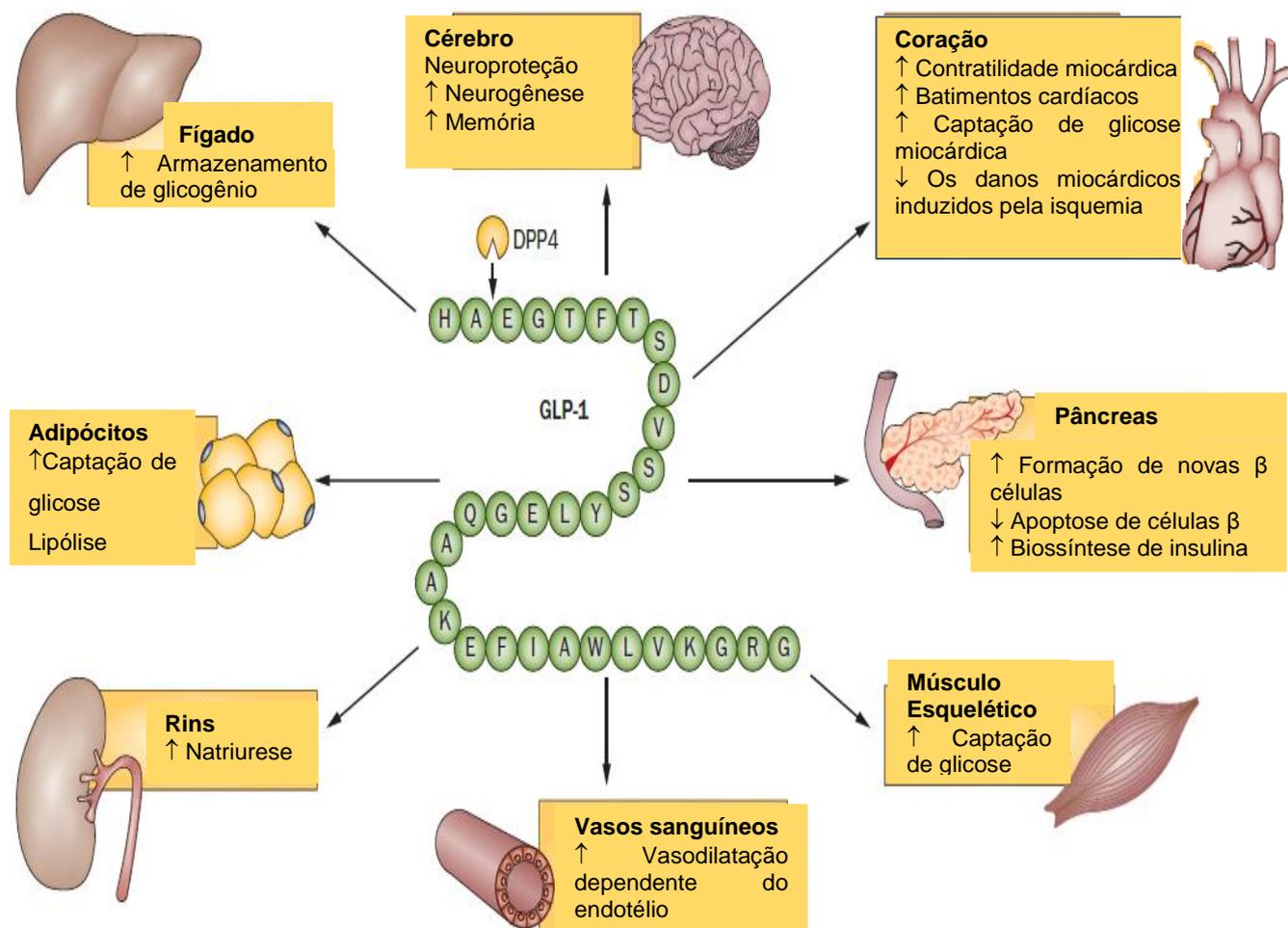


Figura 6. Efeitos pleiotrópicos do GLP-1 ou de agonistas do receptor do GLP-1, em condições experimentais. Estes efeitos não representam necessariamente ações fisiológicas da hormônio incretínico nativo, mas têm sido observados em modelos animais, estudos in vitro ou em estudos com seres humanos, utilizando quantidades suprafisiológicas do peptídeo. Adaptado de (63).

2.3.2 Papel do sistema incretínico no tratamento do diabetes

Diabetes é uma doença metabólica crônica caracterizada por concentrações plasmáticas elevadas de glicose, o que leva cronicamente a graves danos ao coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos. A forma mais comum da doença é o DM2, observada mais frequentemente em adultos, e que tem como componentes fisiopatológicos a resistência à ação da insulina e a disfunção secretória da célula beta pancreática produtora de insulina. Nas últimas três décadas, a prevalência do DM2 tem aumentado dramaticamente nos países de todos os níveis de renda. O *diabetes*

mellitus tipo 1 (DM1), a segunda forma mais comum do DM e anteriormente conhecido como diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, é caracterizada por destruição das células beta pancreática, em geral de natureza autoimune, e, assim, em deficiência absoluta de insulina (64).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência global de diabetes entre os adultos com mais de 18 anos aumentou de 4,7% em 1980 para 8,5% em 2014. Em 2015, cerca de 1,6 milhão de óbitos foram causados diretamente pelo diabetes. Outros 2,2 milhões de óbitos foram atribuídos à alta glicemia em 2012. A prevalência de diabetes tem aumentado mais rapidamente em países de baixa e média renda. Para as pessoas que vivem com diabetes, o acesso ao tratamento a custos acessíveis, incluindo a insulina, é fundamental para sua sobrevivência (65).

Para o controle metabólico do DM2, são essenciais alterações no estilo de vida e também a administração de um agente farmacológico. Estes agentes incluem biguanidas, sulfonilureias, tiazolidinadionas, meglitinidas, inibidores da alfa-glicosidase, análogo da amilina, inibidores da reabsorção renal de glicose, inibidores da DPP-IV, análogos do GLP-1 e insulina (66). As diretrizes atuais recomendam a biguanida metformina como tratamento de primeira linha, com a subsequente adição de outros agentes, quando em monoterapia a metformina não promover controle glicêmico satisfatório (67). As terapias atuais são frequentemente associadas a efeitos adversos como ganho de peso e hipoglicemia (68). Outros efeitos adversos incluem desconforto gastrointestinal com o uso de biguanidas, e possível edema, insuficiência cardíaca ou fraturas devido à utilização de tiazolidinadionas (69).

Em pacientes com DM2, além da resistência à insulina e disfunção secretória das células beta pancreáticas, observa-se secreção reduzida de hormônios incretínicos. Este aspecto fundamenta terapias baseadas em incretinomiméticos neste tipo de diabetes (69). Essa terapia é bem atrativa para o DM2, devido à sua efetividade como anti-hiperglicemiante e risco mínimo de hipoglicemia (70).

Duas estratégias de tratamento utilizadas para melhorar o efeito incretínico de pacientes com DM2, incluindo a ativação do receptor de GLP-1 por análogos do GLP-1 e o aumento da meia-vida do GLP1 endógeno por inibidores da DPP-4 (69). Entre agonistas do GLP-1R estão a exenatida, liraglutida, albiglutida e lixisenatida. A exenatida compartilha 53% de homologia com o GLP-1 nativo e é resistente à degradação pela DPP-4. Este último aspecto, em conjunto com sua menor excreção

renal, estende sua meia-vida circulante. A liraglutida é um análogo do GLP-1 humano com 97% de homologia com o GLP-1 nativo e sua meia-vida no plasma é de 13 horas, devido à ligação com a albumina (71). A lixisenatida é um análogo sintético da exendina-4 (peptídeo encontrado na saliva do monstro Gila e com propriedades biológicas semelhantes à do GLP-1) e com ação prolongada. A albiglutida corresponde a uma proteína de fusão do GLP-1 e a albumina humana e, assim, meia-vida longa (72).

Os inibidores da DPP-4, designados também de "gliptinas", têm como primeiro representante a sitagliptina, disponível para o tratamento do DM a partir de 2006. Ela eleva em duas a três vezes as concentrações plasmáticas de GLP-1 e GIP (73). Inibidores de DPP-4 que se tornaram disponíveis subsequentemente incluem a saxagliptina, vildagliptina, alogliptina, e linagliptina, que têm pouco ou nenhum efeito sobre o peso corporal (74).

2.3.3 Papel do sistema incretínico no tratamento da obesidade

O DM2 está fortemente associado com a obesidade e tanto a alteração da tolerância à glicose e quanto excesso de peso atenuam, de forma independente, o efeito incretínico (75). O tratamento com agonistas de GLP-1R, por sua vez, melhoram o controle da glicemia e induz perda de peso (76). Estudos em animais mostraram que a ativação do GLP-1R no SNC por agonistas está envolvida na redução do peso. Foi observado que a exendina-4 ou liraglutida inibe a ingestão de alimentos pela ativação de GLP-1R em aferentes vagais subdiafragmáticos e algumas regiões cerebrais. Por meio de diferentes métodos, estes estudos produziram dados consistentes com a hipótese de que a ação de aferentes vagais contribui para a inibição de curto e longo prazo da ingestão de alimentos pela ativação do GLP-1R (77) e, assim, para a perda de peso.

Um estudo duplo-cego realizado em 2015 envolvendo 3731 pacientes não diabéticos e com (i) IMC de 30 kg/m² ou (ii) IMC de pelo menos 27 kg/m² com dislipidemia ou hipertensão tratadas ou não foram divididos randomicamente na proporção de 2:1 e receberam liraglutida (3,0 mg/d) ou placebo. Foi observado que a liraglutida associada a dieta e exercícios físicos relacionou-se com perda de peso e

melhora do controle metabólico, em comparação com o grupo que recebeu placebo (78).

Há ainda dados sugestivos de que a ativação do GLP-1 possa regular o gasto energético. Segundo Beiroa et al (2014), o GLP-1 no SNC ativa diretamente a termogênese no tecido adiposo marrom e o amarronzamento do tecido adiposo branco. Essas ações são mediadas pela AMPK (proteína cinase ativada por AMP) hipotalâmica, especificamente no núcleo hipotalâmico ventromedial, o que fornece informações sobre o local no cérebro e os mecanismos pelos quais a massa de gordura diminui em resposta a uma estimulação do SNC pelo GLP-1, atividade independente das ações anorexígenas. Observou-se também que os pacientes obesos com DM2 tratados com metformina em combinação com exenatida ou liraglutida mostraram uma redução do IMC e da massa gorda e tiveram um aumento do gasto energético (12).

Os tecidos adiposos branco e marrom expressam receptores de GLP-1 (59). Entretanto, os efeitos diretos dos agonistas do GLP-1R não foram explorados nesses tecidos. Faltam, assim, estudos sobre os efeitos diretos da ativação tecidual do GLP-1R sobre a atividade do tecido adiposo marrom e o recrutamento do adipócito bege no tecido adiposo branco.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do sistema incretínico sobre o recrutamento do adipócito bege em modelo *in vivo* e em cultura de células.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da liraglutida em camundongos machos C57Bl/6 com obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica, sobre os seguintes desfechos:

- Peso corporal, consumo de energia, eficiência calórica e glicemia de jejum;
- Massa adiposa marrom e branca epididimal e inguinal;
- Expressão de genes relacionados à termogênese e genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano no tecido adiposo marrom e no tecido adiposo branco epididimal e inguinal;
- Características histológicas do tecido adiposo marrom e branco epididimal, branco subcutâneo inguinal e fígado;
- Consumo de Oxigênio dos tecidos adiposos marrom e branco inguinal;
- Expressão da proteína UCP1 através da Imunohistoquímica nos tecidos adiposos marrom e branco epididimal e inguinal.

Investigar o efeito da liraglutida sobre a diferenciação de células mesenquimais C3H10T1/2 e de pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos em cultura.

4 MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição da massa molecular e do fabricante dos reagentes utilizados nesse estudo.

Reagente	Massa molecular (g/mol)	Empresa fabricante
CL 316,243	465,79	Sigma-Aldrich®
Liraglutida	3750,93	Nordisk A/S
Rosiglitazona	357,43	Sigma-Aldrich®
Insulina	5807,57	Sigma-Aldrich®
Dexametasona	392,46	Sigma-Aldrich®
Isobutilmetilxantina	222,24	Sigma-Aldrich®
Óleo Vermelho O	408,49	Sigma-Aldrich®

4.2 ESTUDO *IN VIVO*

Nesse estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 machos isogênicos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo. Durante o estudo os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas, em grupos de 5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada (25°C) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 19h00 e 7h00).

4.2.1 Considerações éticas

Os procedimentos realizados durante o estudo estão de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) (79). O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, com Unb-Doc número 112635/2014 (Anexo I).

Ao final do estudo, a eutanásia dos animais seguiu a Diretriz do CONCEA (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA) (80) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Guia Brasileiro para Boas Prática para Eutanásia em Animais) (81). Após a eutanásia as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo, Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010.

4.2.2 Delineamento experimental

O estudo *in vivo* foi conduzido seguindo dois delineamentos experimentais. No primeiro, os camundongos alimentados com dieta controle (10% do total de quilocalorias representados por lipídeos) ou hiperlipídica (DHL, 60% do total de quilocalorias representados por lipídeos) e foram tratados com veículo, rosiglitazona ou duas diferentes doses de liraglutida. No segundo, camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica e foram tratados com veículo ou liraglutida e co-tratados ou não com o agonista β 3-adrenérgico CL 316,243.

4.2.2.1 Delineamento experimental 1

Um grupo de animais foi alimentado com dieta controle (10% do total de quilocalorias representados por lipídeos) e os demais grupos, com dieta hiperlipídica (DHL, 60% do total de quilocalorias representados por lipídeos), da 5^a a 20^a semana de vida. A DHL foi usada com o objetivo de induzir obesidade e hiperglicemia. A dieta controle e a DHL foram fornecidas na forma de *pellet* e o acesso a elas e a água (filtrada) foi *ad libitum*. As dietas foram obtidas da empresa Research Diets (New Brunswick, EUA).

Após o desenvolvimento da obesidade e hiperglicemia (16^a semana de vida), os camundongos alimentados com DHL foram subdivididos aleatoriamente (por sorteio) em 4 grupos contendo 5 camundongos cada. Estes grupos foram tratados diariamente, durante 21 dias (entre a 17^a e a 20^a semanas de vida), com diferentes doses de liraglutida (200 μ g/kg/dia ou 400 μ g/kg/dia), rosiglitazona (4 mg/kg/dia, controle positivo de efeito anti-hiperglicemiante) ou veículo (solução de Tween 20 a 0,25% em solução fisiológica, controle negativo) via injeção intraperitoneal. Desta forma, foram compostos os seguintes grupos de tratamento:

Grupo 1: dieta controle, tratamento com veículo

Grupo 2: DHL, tratamento com veículo

Grupo 3: DHL, tratamento com rosiglitazona (4 mg/kg/d)

Grupo 4: DHL, tratamento com liraglutida (200 µg/kg/dia)

Grupo 5: DHL, tratamento com liraglutida (400 µg/kg/dia)

O Tween-20 diluído em solução salina (0,25%, v/v; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi usado como veículo. A rosiglitazona foi adquirida da empresa Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA) diluída em veículo. A liraglutida foi adquirida da empresa Novo Nordisk A/S e foi também diluída em veículo.

4.2.2.2 Delineamento experimental 2

Os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica (DHL, 60% do total de kilocalorias representados por lipídeos), da 5^a a 20^a semana de vida. A DHL foi usada com o objetivo de induzir obesidade e hiperglicemia. A dieta obtida da empresa Research Diets (New Brunswick, EUA) foi fornecida na forma de *pellet* e o acesso a elas e a água (filtrada) foi *ad libitum*.

Após o desenvolvimento da obesidade e hiperglicemia (16^a semana de vida), os camundongos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos contendo 6 camundongos cada. Estes grupos foram tratados diariamente, durante 21 dias (entre a 17^a e a 20^a semanas de vida), com liraglutida (400 µg/kg/dia, divididos em duas vezes, 12 animais) ou com veículo (solução fisiológica a 0,9%, 12 animais) via injeção intraperitoneal. Nos últimos cinco dias de tratamento, 6 animais tratados com veículo e 6 animais tratados com liraglutida receberam o agonista β3 adrenérgico CL316,243 diluído em solução fisiológica a 0,9%, via intraperitoneal uma vez ao dia, na dose de 1 mg/kg/dia. Desta forma, foram compostos os seguintes grupos de tratamento:

Grupo 1: veículo durante 21 dias, duas vezes ao dia.

Grupo 2: veículo durante 21 dias, duas vezes ao dia, e CL 316,243 (1mg/kg/dia), nos últimos 5 dias.

Grupo 3: liraglutida, 200 µg/kg, duas vezes ao dia, durante 21 dias.

Grupo 4: liraglutida, 200 µg/kg, duas vezes ao dia, durante 21 dias e CL 316,243 (1mg/kg/dia), nos últimos 5 dias.

A liraglutida foi adquirida da empresa Novo Nordisk A/S e foi diluída em solução fisiológica a 0,9%. O CL316,243 foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) e também foi diluído em solução fisiológica a 0,9%.

4.2.3 Procedimentos experimentais

Nos dois experimentos, entre a 5^a e a 16^a semanas de vida, o peso corporal e a ingestão de dieta foram avaliados duas vezes por semana, no período matutino. Durante o período do tratamento estas variáveis foram avaliadas diariamente. A partir desses dados, as seguintes variáveis foram calculadas:

- Ganho de peso corporal durante o tratamento (peso ao final do tratamento – peso no dia de início do tratamento).
- Energia ingerida durante o tratamento (energia ingerida durante os 21 dias do tratamento, considerando a quantidade de energia, em kJ, por g de dieta).
- Eficiência calórica (ganho de peso dividido pela energia ingerida).
- Massa dos tecidos adiposos branco visceral (epididimal e retroperitoneal), branco subcutâneo (inguinal), tecido adiposo marrom (interscapular), coração, fígado e rins.

A glicemia foi aferida no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas em animais na 16^a e 20^a semanas de vida, com a utilização de tiras reativas (Accucheck Performa, Roche, USA) e glicosímetro (Accucheck Performa, Roche, USA), com limite de detecção entre 10 e 600 mg/dL.

Ao final do estudo, todos os animais foram eutanasiados por decapitação, no período matutino e o sangue do tronco foi coletado, centrifugado (4000 g durante 15 minutos a 4° C) e o soro armazenado a -80° C, para posterior análise bioquímica.

Foram também dissecados os depósitos de tecido adiposo branco visceral (epididimal), tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e tecido adiposo marrom (interescapular), além de amostras do fígado. Depois desse procedimento, suas massas foram aferidas. Parte dos tecidos foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para posterior avaliação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse, outra parte foi destinada, no dia da eutanásia, à avaliação do consumo de oxigênio com a utilização do eletrodo de Clarck, e parte dos tecidos foi fixada em paraformaldeído a 4% e embebida em parafina para posterior análise histológica, com coloração com hematoxilina e eosina, e imunohistoquímica.

4.3 ENSAIO DE CONSUMO DE OXIGÊNIO TECIDUAL

Para avaliação do consumo tecidual de oxigênio foi utilizado o aparelho Mitocell MT200 respirometer (Strathkelvin instruments limited, North Lanarkshire, Scotland). Um fragmento de 20 a 30 mg do tecido adiposo marrom (interescapular) e um fragmento de 40 a 60 mg do tecido adiposo branco visceral (epididimal) e do tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) foram picotados com auxílio de um bisturi e transferidos para o interior da câmara de respiração, já contendo 500 microlitros de tampão de respiração pré-aquecido a 37°C . A câmara foi fechada e o consumo do oxigênio mensurado durante 30 segundos.

Antes de sua utilização, o tampão de respiração foi mantido pré-aquecido em banho-maria a 37°C , para estabilização da temperatura. Este tampão consiste em DPBS 1x (*Dulbecco's phosphate-buffer saline*), albumina sérica bovina a 2%, glicose a 25 mM e piruvato a 1 mM. Os valores do consumo de O_2 foram expressos em $\mu\text{mol/L/mg}$ de tecido.

4.4 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL TECIDUAL

Foi extraído RNA total das amostras de tecido adiposo branco (epididimal e inguinal) e tecido adiposo marrom (interescapular). Para isso, as amostras de tecido foram descongeladas e imediatamente homogeneizadas em tubos cônicos de 15 mL, em Trizol (Invitrogen, Life Technologies), na proporção de 0,1g de tecido por mL de Trizol, com a utilização de um homogeneizador de tecidos. Depois disso, as amostras

foram incubadas a temperatura ambiente, durante 5 minutos, e em seguida centrifugadas a 14 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL e, a estes, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos e em seguida centrifugados a 14 000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. A fase superior (aquosa) foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 14 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de água MilliQ tratada com dietilpirocarbonato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As amostras foram mantidas a -80°C até sua utilização.

4.4.1 Tratamento do RNA com DNase

Para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico e consequente influência sobre a avaliação da expressão gênica, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 10 minutos, a temperatura ambiente, seguindo as sugestões do fabricante.

4.4.2 Quantificação do RNA total e determinação de sua pureza

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada no espectrofotômetro de microvolume Nanovue (GE Health Sciences®, Life Sciences, Buckinghamshire, UK), utilizando-se 1 µL da amostra. A concentração de RNA, fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, é determinada pelo seguinte cálculo: $(DO\ 260\ \text{nm} \times 40) / 1000$, em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento 260.

O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, é calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras em que essa razão estivesse entre 1,7 e 2,0, na medida em que estes valores representam baixa contaminação da amostra com proteínas.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A transcrição reversa (RT) e a amplificação do cDNA foram realizadas a partir do RNA total extraído das amostras, em único passo, por PCR quantitativa em tempo real utilizando o kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo fluoróforo SYBR® Green. Os fluoróforos se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência cuja intensidade é proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência detectada é representada por meio do Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que representa o ciclo na reação de amplificação a partir do qual a amplificação se torna exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems), em triplicatas, para volume final de 10 µL, de acordo com instruções do fabricante. Uma reação controle negativo, ou seja, sem amostra de RNA total, foi realizada para cada par de *primers* a fim de se verificarem possíveis contaminações.

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Primer¹	Proteína correspondente	Sequência
<i>Ucp1</i>	Proteína desacopladora tipo 1 (UCP1)	F: 5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3' R: 5'-CTTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'
<i>Dio2</i>	Deiodinase 2 (Dio2)	F: 5'-CAGCTTCCTCCTAGATGCCTA-3' R: 5'-CTGATTGAGGATTGGAGACGTG-3'
<i>Slc16a2</i> (<i>MCT8</i>)	Transportador de Monocarboxilato 8	F: 5'-CGGCTGGATAGTGGTGTGTTG-3' R: 5'-CAGAGTTATGGATGCCGAAGATG-3'
<i>Slc16a10</i> (<i>MCT10</i>)	Transportador de Monocarboxilato 10	F: 5'-AGGTGCTCTTCATGTGCATTG-3' R: 5'-TGGAGGTAGACCTTCTTCACAC-3' F: 5'-CTGACCTCCGCATGATCGG-3'
<i>Thra</i>	Receptor de hormônio tireoidiano alfa	R: 5'-GGTGGGGCACTCGACTTTC-3' F: 5'-ACACCAGCAATTACCAGAGTG-3'
<i>Thrb</i>	Receptor de hormônio tireoidiano beta	R: 5'-GCAGCTCGAAGGGACATGA-3'

¹ Identificação do primer pelo gene correspondente

F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

As condições de termociclagem durante a PCR foram:

- Programa de transcrição reversa: 48°C durante 30 minutos;
- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos) e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);
- Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): etapa realizada após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e/ou de produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação T_m (*melting temperature*) e determina

o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado.

A expressão relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta C_t$, com normalização para o gene de referência que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para isso, os valores de C_t obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do C_t obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o ΔC_t .

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

A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de C_t ou $\Delta\Delta C_t$. Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{intervenção}} - \Delta C_t_{\text{calibrador}} \quad (82)$$

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.6.1 Preparo das lâminas histológicas

4.6.1.1 Fixação de tecidos

Fragmentos de tecido adiposo branco visceral (epididimal), tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e tecido adiposo marrom (interscapular) coletados foram imediatamente armazenados em tubos contendo solução fixadora (paraformaldeído 10% v/v em PBS, recém-preparada) até o seu processamento.

Fragmentos de fígado foram mantidos no paraformaldeído 10% por 24 horas e então foram transferidos para outra solução fixadora, Bouin (75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético) por 4 h, lavados várias vezes em solução de

álcool etílico 50% (v/v) e depois conservados em álcool etílico 70% (v/v) até o seu processamento.

4.6.1.2 Desidratação e inclusão em parafina

A inclusão do tecido na parafina foi realizada manualmente, como descrito a seguir. Para sua realização, fragmentos de fígado mantidos no álcool etílico 70% foram transferidos para cassetes tradicionais de histologia. Inicialmente os cortes de tecidos conservados foram submetidos a desidratação em álcoois em concentrações progressivas 1 hora em cada álcool (álcool 70% - v/v, álcool 80%-v/v, álcool 90% -v/v e álcool absoluto [2 banhos]). Os fragmentos de tecido adiposo foram transferidos para cassetes tradicionais de histologia e antes do banho no álcool 70% (v/v) passaram por banhos de 1 hora em álcoois de 30% (v/v) e 50% (v/v) respectivamente.

Após a desidratação, os tecidos passam pela diafanização por imersão em solução de álcool absoluto e tolueno (v/v) por 1 hora, seguido por dois banhos de 1 hora em tolueno absoluto, um banho de 30 minutos em tolueno e parafina a 60°C (v/v) e por último, foram feitos 3 banhos por uma hora em parafina (Paraplast, Leica Biosystems, Alemanha) fundida na estufa (60 °C). Após os 3 banhos de parafina, os cortes de tecidos foram fixados na parafina em posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida.

O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente até a realização de cortes de tecido no micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha).

4.6.1.3 Corte no micrótomo

Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram durante 30 minutos a -20°C antes da microtomia, para evitar enrugamento do tecido durante o corte.

Os blocos com os fragmentos de fígado e tecido adiposo foram cortados em micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha) em espessura de 5 µm e 7 µm respectivamente. Os fragmentos obtidos foram transferidos para banho-maria (40°C), distendidos com o auxílio de uma pinça e aderidos em

lâminas. As lâminas foram transferidas para estufa a 60°C por aproximadamente 2 horas e depois armazenadas em temperatura ambiente.

4.6.1.4 Coloração com hematoxilina-eosina

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Para a realização desta etapa, elas foram imersas em xilol (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico absoluto (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico 95% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 80% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 70% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 50% (1 banho por 2 minutos), lavadas em água corrente por 3 minutos, lavadas em água destilada e imersas em solução de hematoxilina de Harris por 2 minutos as amostras de fígado e 5 minutos as de tecido adiposo (5 mg hematoxilina, 50 mL de álcool absoluto, 100 mg de alúmen de potássio, 2, 5 g de óxido vermelho de mercúrio, 1000 mL de água destilada). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso de hematoxilina, mergulhadas em água destilada, imersas rapidamente em álcool ácido (ácido clorídrico 1% em álcool 70%) e novamente lavadas em água destilada.

Para imersão em eosina, as lâminas foram inicialmente imersas em solução Scott, lavadas em água corrente, lavadas em água destilada, retirou-se o excesso de água destilada e então as lâminas foram imersas em eosina alcoólica 1% por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram imersas em álcool etílico 95%-v/v (3 banhos sendo 1 minuto cada), álcool etílico absoluto (6 banhos de 1 minuto cada). Para finalização do processo de coloração, as lâminas foram imersas em xilol (3 banhos de 1 minuto cada). No tecido adiposo, a eosina utilizada é a eosina aquosa 1% com 0,05 mg de ácido fosfotúngstico (banho de 5 minutos), lava as lâminas com água destilada, coloca-as para secar em temperatura ambiente e já é feita a montagem das lâminas.

Para a montagem das lâminas, após estarem secas, usou-se meio sintético Entellan (Entellan new, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e lamínula para finalização da mesma e posterior análise microscópica.

As imagens dos cortes de tecidos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Axio imager A1, Zeiss Inc., Jena, Alemanha) com aumento de 10 vezes.

4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.7.1 Fixação do tecidos

Fragmentos de tecido adiposo branco visceral (epididimal), tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e tecido adiposo marrom (interscapular) coletados foram imediatamente armazenados em tubos contendo solução fixadora (paraformaldeído 10% v/v em PBS, recém-preparada) até o seu processamento.

4.7.2 Desidratação e inclusão em parafina

Este processo de inclusão do tecido na parafina foi realizado manualmente, como descrito a seguir. Inicialmente os cortes de tecido adiposo branco inguinal, branco epididimal e marrom conservados foram submetidos a desidratação em álcoois em concentrações progressivas 1 hora em cada álcool (álcool 30% -v/v, álcool 50% -v/v, álcool 70% -v/v, álcool 80%-v/v, álcool 90% -v/v e álcool absoluto [2 banhos]).

Após a desidratação os tecidos passam pela diafanização por imersão em solução de álcool absoluto e tolueno (v/v) por 1 hora, seguido por dois banhos de 1 hora em tolueno absoluto, um banho de 30 minutos em tolueno e parafina a 60°C (v/v) e por último, foram feitos 3 banhos por uma hora em parafina (Paraplast, Leica Biosystems, Alemanha) fundida na estufa (60 °C). Após os 3 banhos de parafina, os cortes de tecidos foram fixados na parafina em posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida.

O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente até a realização de cortes de tecido no micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha).

4.7.3 Corte no micrótomo

Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C antes da microtomia, para evitar enrugamento do tecido durante o corte. Em seguida os blocos com os tecidos foram cortados em micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha) em espessura de 7 µm. Os fragmentos obtidos foram transferidos para banho-maria (50 °C), distendidos com o auxílio de uma pinça e aderidos em lâminas immunoslides (Easypath, EUA).

4.7.4 Imunolocalização da proteína UCP1

As lâminas confeccionadas foram desparafinadas em xilol absoluto (2 vezes por 5 minutos cada), hidratadas em etanol 100% (2 vezes por 5 minutos cada), etanol 70% e água destilada (por 5 minutos cada) antes da recuperação antigênica (10 mM de tampão de citrato de sódio, pH 6,0, por 20 minutos a 97°C) e bloqueio da peroxidase endógena (Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) 10 Volumes (3%), por 20 minutos a temperatura ambiente).

Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS 1x e os cortes de tecidos foram delimitados com caneta hidrofóbica (PAP PEN, Labosphera, Portugal) e a técnica de imunohistoquímica foi realizada usando o kit universal *R.T.U. Vectastain Quick* (PK-7800, Vector Laboratories, Inc., CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em suma, as lâminas contendo os tecidos foram bloqueadas com soro de cavalo normal 2,5 % (Vector, S-2012), durante a noite, a 4°C, seguida de incubação em anticorpo primário policlonal, a 4°C por uma hora. Posteriormente a lâminas foram incubadas em solução pré-diluída de anticorpo pan-secundário biotilado, durante 10 minutos (Vector) seguido de incubação com o complexo macromolecular estreptavidina-biotina/peroxidase biotilada por 5 minutos e foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos. Antes da troca para a próxima etapa as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS 1x por 5 minutos cada.

O anticorpo primário utilizado foi IgG anti-UCP1 (Abcam, 1-100) reativo a espécie camundongo. A análise da coloração/marcação para as proteínas de interesse foi realizada por imagens de cortes dos tecidos capturadas em scanner Aperio Scan Scope slide scanner (Aperio, Vista, CA, EUA), com aumento de 20 vezes.

4.8 CULTURA DE CÉLULAS

Neste estudo, foram utilizados pré-adipócitos 3T3-L1 e células mesenquimais C3H10T1/2 para o ensaio de adipogênese em cultura. Essas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 2 nM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro neonatal bovino, em placas de 150 mm para cultura de células (Corning®), e mantidas a 37°C e com 5% de CO₂.

4.8.1 Ensaio de adipogênese em cultura de células

A adipogênese corresponde à diferenciação de células mantidas em cultura em adipócitos. Existem linhagens de células que são comprometidas com o processo de diferenciação em adipócitos, entre elas estão os pré-adipócitos 3T3-L1, uma subcepa da linhagem 3T3 do camundongo swiss (83). As células 3T3-L1 apresentam morfologia de fibroblasto, mas quando tratadas com isobutilmetilxantina (um inibidor da fosfodiesterase de AMPc), dexametasona (um agonista sintético glicocorticoide) e altas concentrações de insulina na presença de soro fetal bovino são diferenciadas em adipócitos (84).

As células C3H10T1/2 são pertencentes à linhagem de células mesenquimais, isoladas de embriões de camundongos C3H e assim como as 3T3-L1 também apresentam morfologia de fibroblastos. Funcionalmente, as células C3H10T1/2 são semelhantes a células tronco mesenquimais, no entanto, se induzidas podem diferenciar-se em adipócitos maduros, acumulando gotículas lipídicas (85).

Os experimentos foram realizados com ambas as linhagens celulares, pré-adipócitos 3T3-L1 e células mesenquimais C3H10T1/2, que foram cultivadas em placas de 150 mm para cultura de células (Corning®), em meio DMEM contendo soro neonatal bovino a 10%, até sua subconfluência. Depois disso, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços até sua confluência. Dois dias depois de observada a confluência, foram induzidas a se diferenciar em adipócitos.

As células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina (10 µg/mL), durante 2 dias, ou de maneira semelhante à indução das células C3H10T1/2 com 0,5 mM de IBMX, 1 µg/mL de insulina e 1 µM de dexametasona

também durante 2 dias. Em seguida, foram mantidas com 1 µg/mL de insulina por 12 dias. Durante o período de indução e manutenção, foram cultivadas em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e submetidas a tratamentos com veículo (DMSO, controle negativo), rosiglitazona 10⁻⁵ M (controle positivo) ou liraglutida nas concentrações de 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M. As concentrações da liraglutida foram baseadas nas concentrações utilizadas por Challa et al (2011) (86). Ao final do ensaio de diferenciação de adipócitos (décimo quarto dia), foi analisado o acúmulo lipídico intracelular por meio da coloração com o óleo vermelho O.

4.8.1.1 Coloração com óleo vermelho O

Após os quatorze dias da diferenciação de adipócitos, o meio de cultura das células foi descartado e essas foram lavadas com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) por duas vezes. Posteriormente, foram fixadas com formaldeído a 4% em PBS por 40 minutos. Logo em seguida, foram feitas 2 lavagens com água destilada e 2 lavagens com PBS. Adicionou-se isopropanol 60% por 5 min, retirou-se o isopropanol e então as células foram incubadas com o corante para lipídios óleo vermelho O (*Oil Red O*) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), previamente solubilizado e filtrado, durante uma hora. Ao término do processo as células foram lavadas com água destilada para a retirada do excesso do corante e as imagens foram fotodocumentadas no microscópio *Regular Inverted BF & Fluorescent Microscope* nos aumentos de 20 e 40 vezes.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0*. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). O teste t de Student não pareado foi usado para comparar a média entre dois grupos, a análise de variância Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunns foi usada para comparar as médias entre múltiplos grupos, e a análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni foi utilizada para comparar as médias entre múltiplos grupos quando se tinha tratamento em relação ao tempo. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.2 ESTUDO *IN VIVO*

5.2.1 Delineamento Experimental 1

Os camundongos na 5ª semana de vida, no início do estudo, foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, cada um contendo 5 animais. Após o desenvolvimento da obesidade e hiperglicemia (16ª semana de vida), os camundongos alimentados com DHL foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos contendo 5 camundongos cada, de acordo com o tratamento a ser recebido (liraglutida, rosiglitazona ou veículo). Os camundongos alimentados com dieta controle (DC) contendo 5 animais foram tratados com veículo. Ao longo do estudo houve perda de alguns animais, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Número de animais por grupo na 5ª semana de vida, na eutanásia e ocasião das perdas.

Grupos	No de animais - 5ª semana	No de animais – eutanásia	Ocasão das perdas
DC + Veículo	5	5	-
DHL + Veículo	5	4	Aferição da glicemia 16 sem
DHL + RSG	5	4	Aferição da glicemia 16 sem
DHL + Lira 200	5	5	-
DHL + Lira 400	5	3	16º e 21º dias de tratamento

RSG, rosiglitazona (4 mg/kg/d); Lira 200: liraglutida (200 µg/kg/d); Lira 400: liraglutida (400 µg/kg/d), to: tratamento.

5.2.1.1 Ganho de peso e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica

Na 5ª semana de vida não foi observada diferença entre os grupos com relação ao peso corporal (Figura 7A). A partir da 5ª semana de vida, um grupo foi alimentado com dieta controle (n = 5) e os outros 4 grupos, com DHL (n = 16). A partir da 16ª semana de vida, após 11 semanas recebendo a DHL, observou-se aumento significativo do peso corporal nos grupos alimentados com DHL em relação ao grupo

alimentado com dieta controle (Figura 7A). Ao final da 16ª semana de vida, antes do início do tratamento com liraglutida, rosiglitazona ou veículo, os animais alimentados com DHL apresentaram ganho cumulativo de peso corporal maior do que o grupo em dieta controle (Figura 7B), variável calculada em relação à 5ª semana de vida.

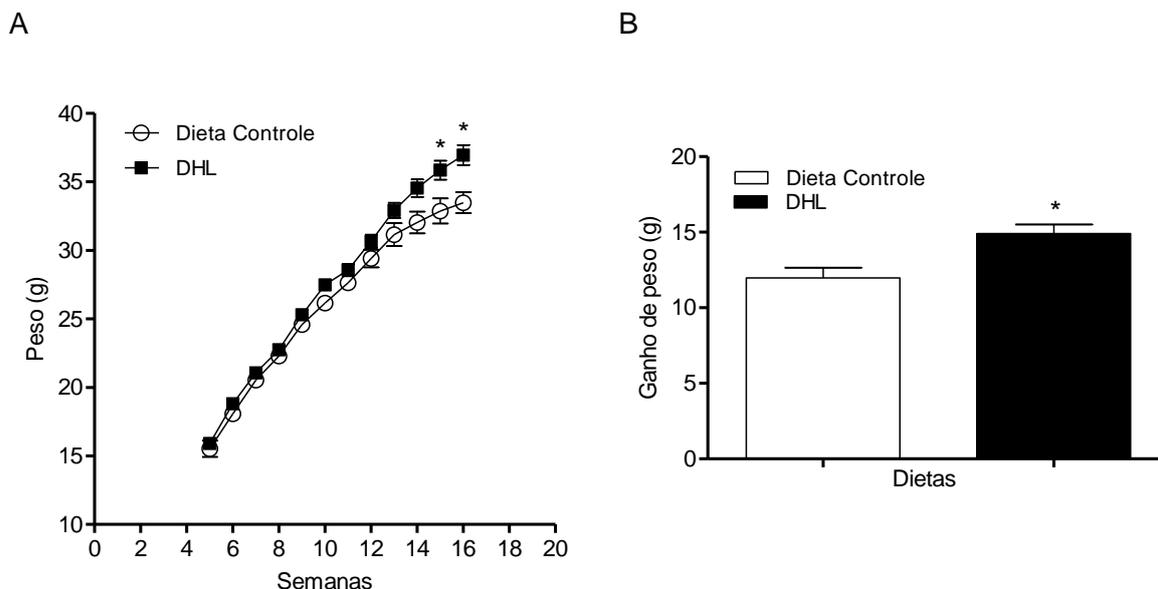


Figura 7. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica. (A) Peso corporal desde a 5ª até a 16ª semana de vida e (B) ganho de peso corporal da 5ª à 16ª semana de vida em camundongos alimentados com dieta controle (n = 5) ou DHL (n = 16), a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (análise de variância de dois fatores seguida do teste de Bonferroni e teste t de Student não pareado).

Da 5ª à 16ª semana de vida, foi observada maior ingestão de energia nos animais alimentados com DHL em relação aos alimentados com dieta controle (Figura 8).

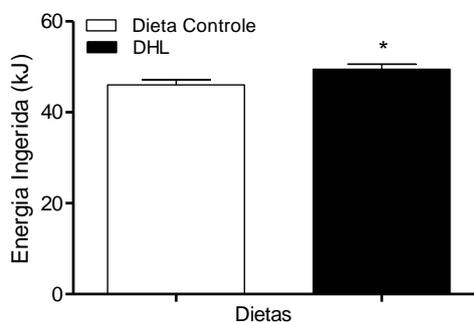


Figura 8. Energia ingerida pelos animais que receberam dieta controle ou dieta hiperlipídica da 5ª à 16ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (teste t de Student não pareado).

Na 16^a semana de vida, antes do início do tratamento com diferentes doses de liraglutida, rosiglitazona ou veículo, os camundongos alimentados com DHL apresentaram aumento da glicemia de jejum em relação aos camundongos que receberam dieta controle ($146,25 \pm 8,73$ versus $114,25 \pm 10,41$ mg/dL, respectivamente). Os camundongos alimentados DHL apresentaram glicemia média de jejum superior a 140,0 mg/dL, como mostrado na Figura 9.

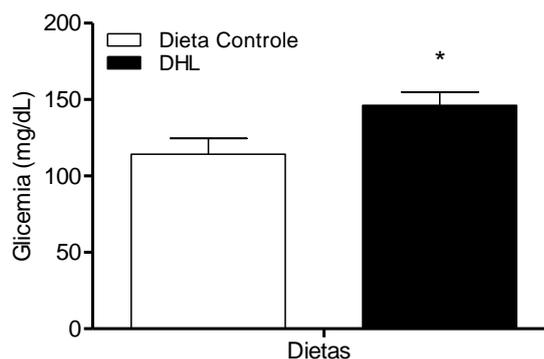


Figura 9. Hiperglicemia induzida pela dieta. Glicemia em jejum na 16a semana de vida em camundongos alimentados com dieta controle (n = 5) ou DHL (n = 16), a partir da 5a semana de vida. Dados apresentado como média \pm EPM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (Teste t de Student não pareado).

5.2.1.2 Efeito da liraglutida sobre o ganho de peso e a glicemia

Para avaliar o efeito da liraglutida sobre o ganho de peso e a glicemia em jejum, a partir da 17^a semana de vida, os camundongos que receberam dieta controle foram tratados com veículo e os que receberam DHL foram divididos em 4 grupos, e cada um recebeu um dos seguintes tratamentos durante 21 dias: veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou liraglutida (200 ou 400 μ g/kg/d). Após 21 dias de tratamento, houve redução do ganho de peso induzido pela DHL nos animais tratados com liraglutida nas duas diferentes doses (200 e 400 μ g/kg/d), em comparação com os demais grupos (Figura 10).

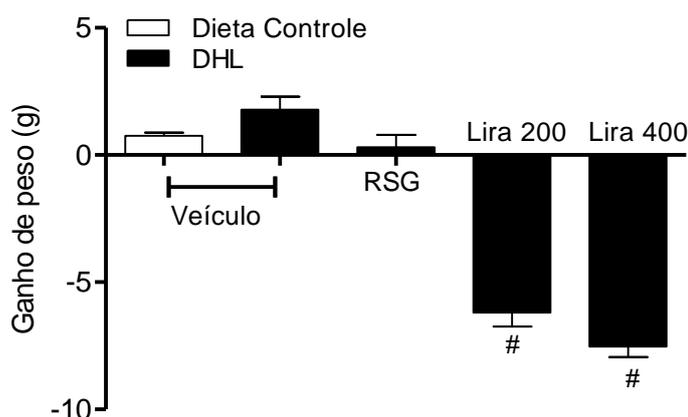


Figura 10. Efeito da liraglutida sobre o ganho ponderal induzido por DHL. Ganho de peso após 21 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou liraglutida (200 ou 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média ± EPM. # $p < 0.05$ vs. todos os grupos (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

Não foi observada redução significativa da glicemia de jejum nos grupos tratados com rosiglitazona (4 mg/kg/d; glicemia de $130 \pm 15,9$ mg/dL) e liraglutida (200 ou 400 µg/kg/d; glicemia de $120,3 \pm 20,6$ e $132,3 \pm 28,4$ mg/dL, respectivamente), em relação ao grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (glicemia de $169,3 \pm 14,5$ mg/dL). Entretanto, a glicemia de jejum dos animais alimentados com DHL e tratados com rosiglitazona ou liraglutida foi semelhante à observada naqueles alimentados com dieta controle e tratados com veículo ($138,8 \pm 21,6$ mg/dL), conforme apresentado na Figura 11.

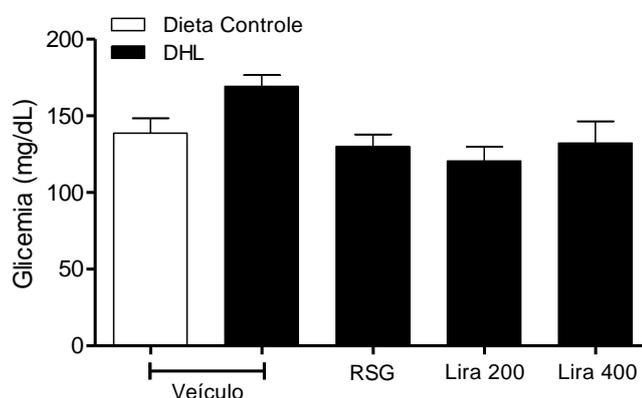


Figura 11 . Glicemia em jejum, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média ± EPM. (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG,

rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 $\mu\text{g/kg/d}$; Lira 400, liraglutida na dose de 400 $\mu\text{g/kg/d}$.

5.2.1.3 Efeito da liraglutida sobre a adiposidade, massa do coração e dos rins

Nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo ou rosiglitazona, foi observada tendência de aumento da massa adiposa epididimal (visceral) e inguinal (subcutânea), em relação aos alimentados com dieta controle (Figuras 12A e 12B). Nos grupos tratados com a liraglutida (200 ou 400 $\mu\text{g/kg/d}$), foi observada tendência de redução da massa adiposa inguinal (depósito subcutâneo) (Figura 12B).

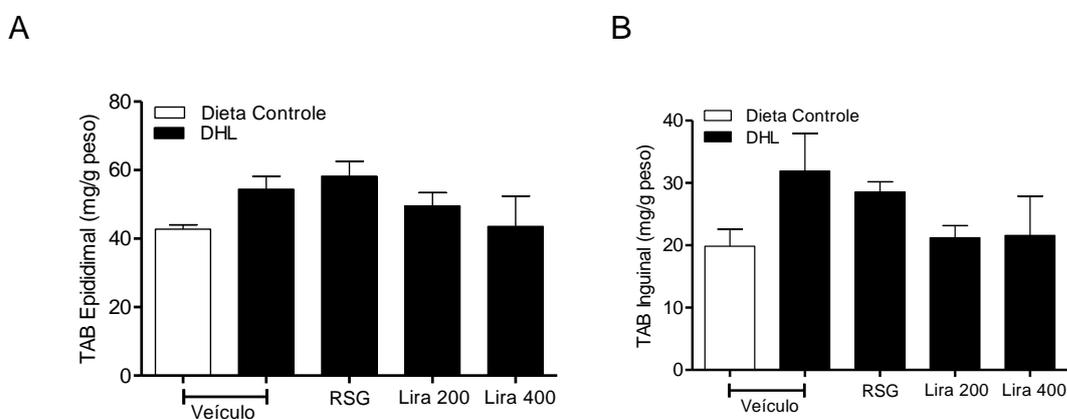


Figura 12. Efeito da liraglutida sobre adiposidade visceral e subcutânea. **(A)** Massa de tecido adiposo branco epididimal (visceral) e **(B)** massa de tecido adiposo branco inguinal (subcutâneo), corrigida para a massa corporal total, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 $\mu\text{g/kg/d}$), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média \pm EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 $\mu\text{g/kg/d}$; Lira 400, liraglutida na dose de 400 $\mu\text{g/kg/d}$.

A massa do tecido adiposo marrom interescapular não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 13). Entretanto, foi observada tendência de diminuição da massa deste depósito em resposta ao tratamento com liraglutida na dose de 200 $\mu\text{g/kg/d}$, em comparação com o tratamento com a rosiglitazona.

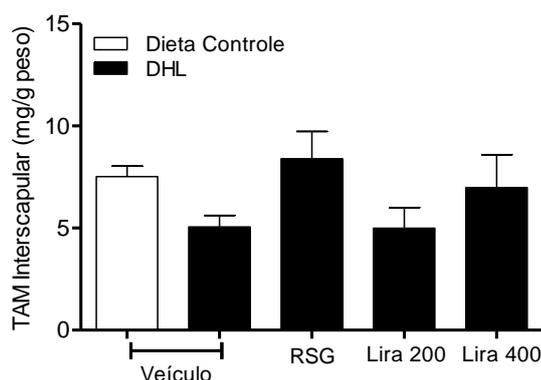


Figura 13. Efeito da liraglutida sobre a massa do tecido adiposo marrom interscapular. Massa de tecido adiposo marrom interscapular, corrigida para a massa corporal total, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 μ g/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média \pm EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); n = 3 - 5 camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 μ g/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/d.

As massas do coração e dos rins também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, como apresentado na Tabela 5. Entretanto, foi observada uma tendência de aumento da massa dos rins do grupo que recebeu liraglutida na maior dose quando comparada à dos animais tratados com veículo e alimentados com DHL (Tabela 5).

Tabela 5: Massa absoluta e relativa de tecidos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, rosiglitazona (4 mg/Kg/d) ou liraglutida (200 µg/kg/d e 400 µg/kg/d).

Depósito	DHL + Veículo		DHL + RSG		DHL + Lira 200		DHL + Lira 400	
	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)
TAB epididimal	2056 ± 234,6	54,4 ± 3,8	2162 ± 246,1	58,2 ± 4,3	1562 ± 166,4	49,6 ± 3,8	1343 ± 345,4	43,5 ± 8,9
TAB inguinal	1270 ± 282,7	31,91 ± 6,06	1059 ± 103,9	28,5 ± 1,6	662,5 ± ± 67,4	21,2 ± 1,9	675,9 ± 230,8	21,6 ± 6,3
TAM interescapular	199,9 ± 31,2	5,06 ± 0,6	304,1 ± 38,05	8,4 ± 1,3	151,3 ± ± 23,6	5,0 ± 1,0	202 ± 30,7	7,0 ± 1,6
Coração	152,2 ± 4,9	3,9 ± 0,3	137,7 ± 6,6	3,7 ± 0,08	134,7 ± ± 10,1	4,3 ± 0,3	118,7 ± ± 3,8	4,0 ± 0,3
Rins	354,5 ± 11,2	9,2 ± 0,6	324,3 ± 14,5	8,8 ± 0,2	325,1 ± ± 15,8	10,5 ± 0,7	381,8 ± 17,4	13,03 ± 1,8

Dados apresentados como média ± EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); n = 3 - 5 camundongos por grupo. A: massa absoluta (g), R: massa relativa (mg/g de peso corporal); DHL, dieta hiperlipídica; RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

5.2.1.4 Efeito da liraglutida sobre a ingestão de energia e de água e sobre a eficiência calórica

Observou-se aumento da ingestão de energia nos animais alimentados com DHL e tratados com veículo em comparação ao grupo alimentado com dieta controle (Figura 14 A). A quantidade absoluta de energia ingerida pelos animais dos grupos que receberam liraglutida (200 ou 400 µg/kg/d) foi menor do que a dos animais dos demais grupos (Figura 14 A).

Foi verificada redução da eficiência calórica nos animais dos grupos que receberam liraglutida (200 ou 400 µg/kg/d), quando comparados aos animais que receberam veículo e foram alimentados com dieta hiperlipídica, como apresentado da Figura 14 B. Não foi observada modificação da ingestão hídrica entre os diferentes grupos de tratamento (Figura 15).

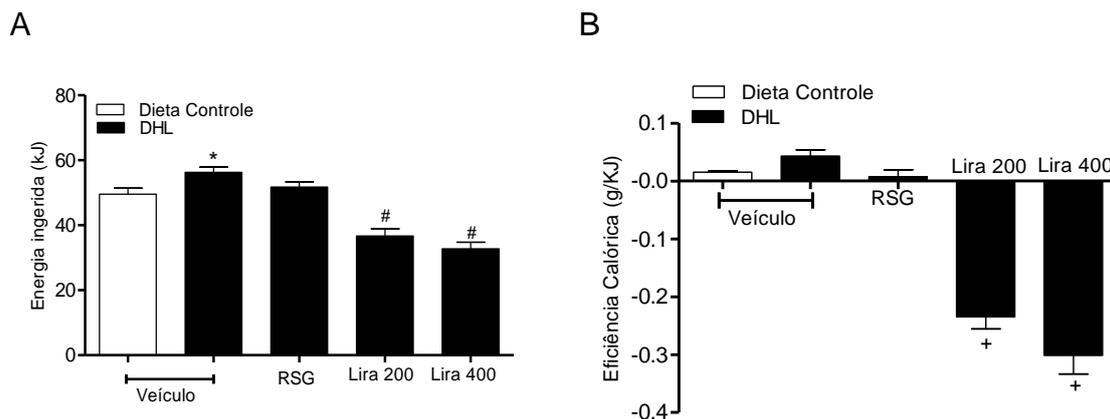


Figura 14. Efeito da liraglutida sobre a energia ingerida (A) e a eficiência calórica (B), após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, + $p < 0,05$ vs. veículo- dieta hiperlipídica e # $p < 0,05$ vs. todos os grupos (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

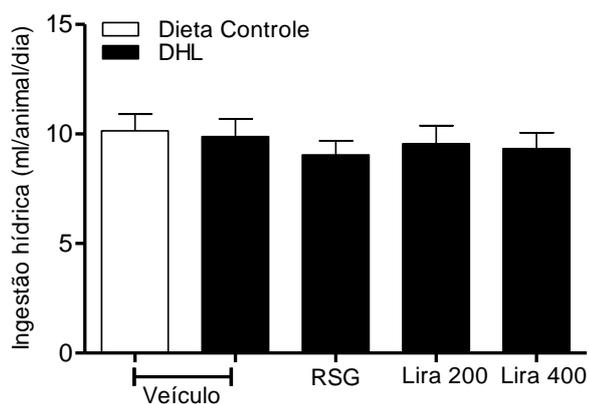


Figura 15. Efeito da liraglutida sobre a ingestão hídrica, após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle, e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Dados apresentados como média ± EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

5.2.1.5 Efeito liraglutida sobre características histológicas do fígado e tecido adiposo

Nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo ou rosiglitazona, foi observado um aumento do acúmulo de lipídeos no fígado, caracterizado pela presença de gotículas lipídicas no tecido, quando comparado aos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (Figura 16). Por outro lado, o

tratamento com liraglutida, independentemente da dose estudada, reduziu este acúmulo no fígado (Figura 16).

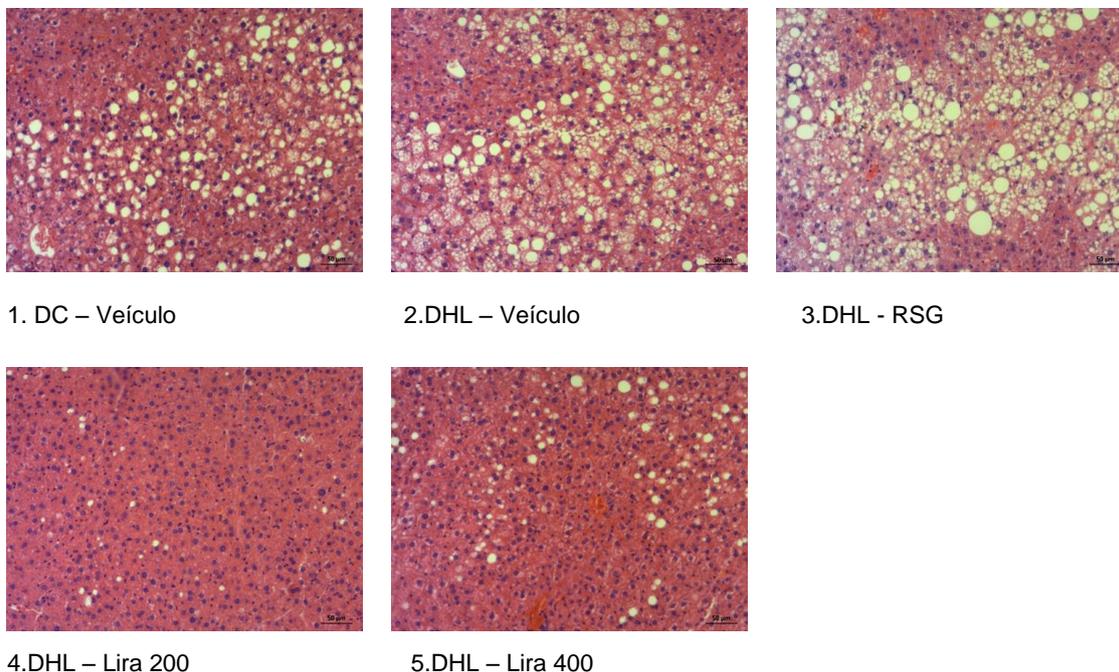


Figura 16. Efeito da liraglutida sobre características morfológicas do fígado após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Amostras de fígado coradas com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo. Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 µm. n = 3-5 camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

A análise da morfologia do tecido adiposo marrom demonstrou maior acúmulo de lipídeos em resposta à DHL, indicado pelo aumento de tamanho das gotículas lipídicas intracelulares neste tecido. Os animais alimentados com DHL e tratados com rosiglitazona também apresentaram um aumento de tamanho das gotículas lipídicas, porém menos acentuado. O tratamento com liraglutida, nas duas doses estudadas, reduziu o tamanho destas gotículas (Figura 17).

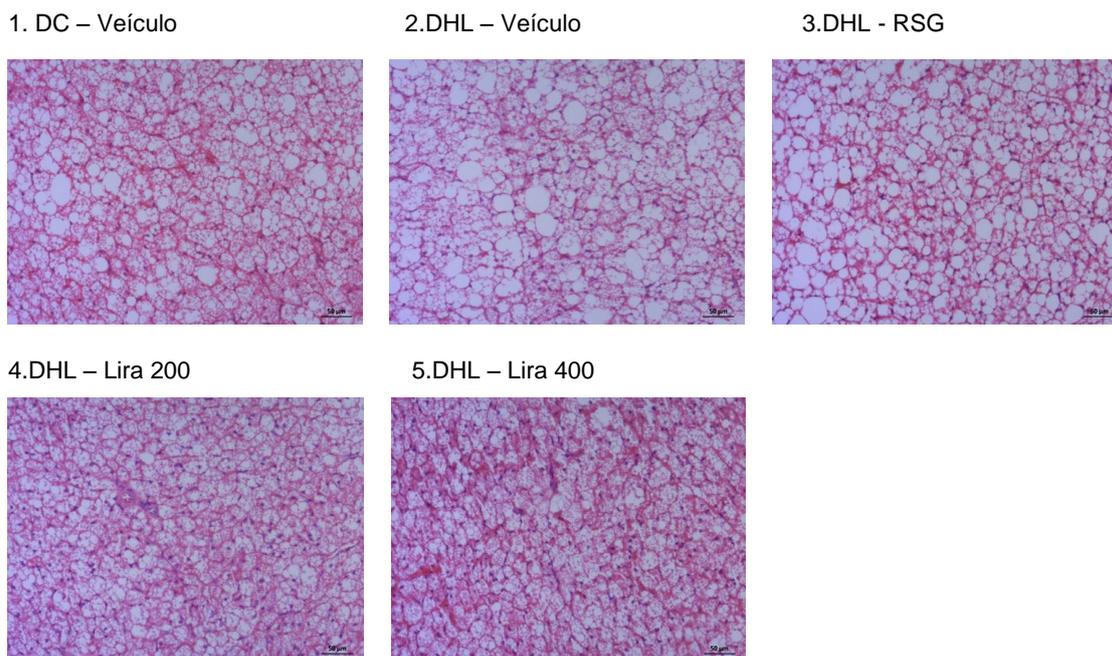


Figura 17. Efeito da liraglutida sobre características morfológicas do tecido adiposo marrom após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Amostras de tecido adiposo marrom coradas com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo. Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 µm. n = 3-5 camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

No tecido adiposo branco epididimal (depósito visceral) e inguinal (subcutâneo), observou-se aumento do tamanho dos adipócitos nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo ou RSG, quando comparados aos alimentados com dieta controle (Figuras 18 e 19). No depósito visceral (Figura 18), mas não no depósito subcutâneo (Figura 19), os animais alimentados com DHL e tratados com liraglutida, apresentaram redução do tamanho do adipócito, indicado pela redução de tamanho das gotículas lipídicas.

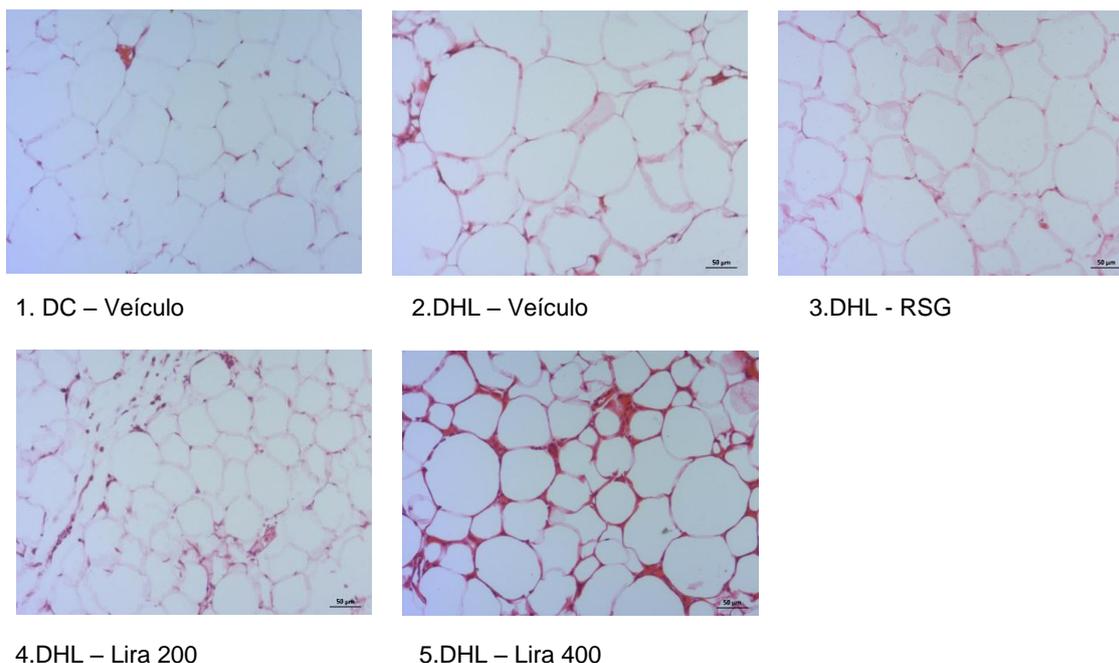


Figura 18. Efeito da liraglutida sobre características histológicas do tecido adiposo epididimal após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Amostras de tecido adiposo epididimal coradas com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo. Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 µm. n = 3-5 camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida (200 µg/kg/d); Lira 400, liraglutida (400 µg/kg/d).

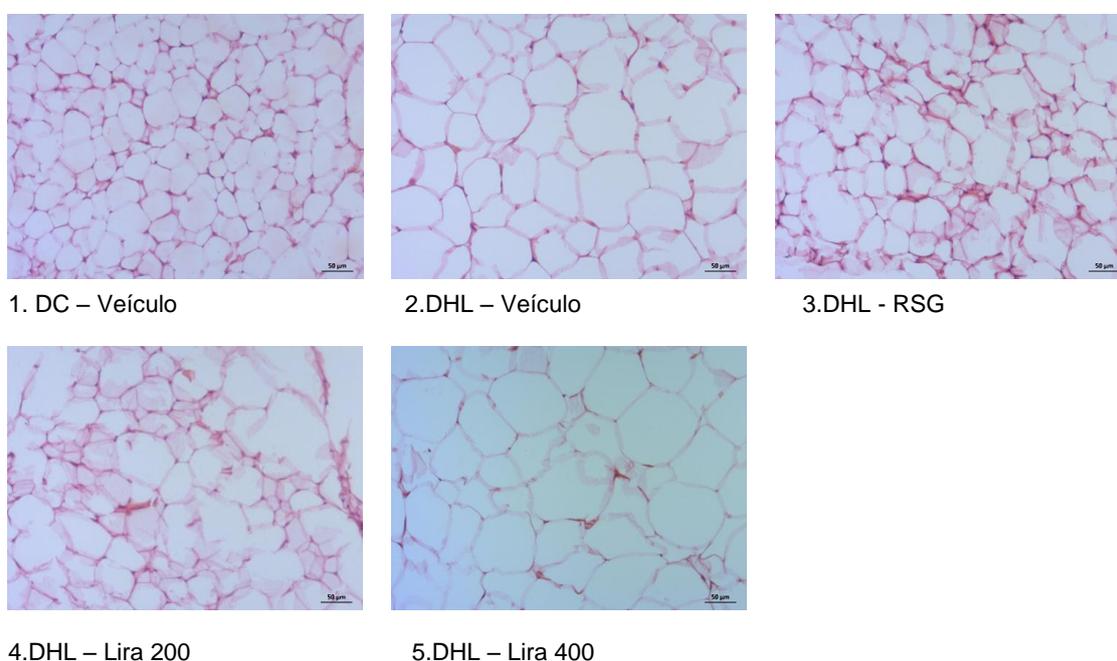


Figura 19. Efeito da liraglutida sobre características histológicas do tecido adiposo inguinal após 21 dias de tratamento com veículo nos camundongos alimentados com dieta controle (DC), e veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. Amostras de tecido adiposo inguinal coradas com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo. Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 µm. n = 3-5 camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida (200 µg/kg/d); Lira 400, liraglutida (400 µg/kg/d).

5.2.1.6 Efeito da liraglutida sobre a expressão relativa de *Ucp1*

Nos tecidos adiposos branco epididimal e inguinal não houve diferença na expressão relativa de *Ucp1* entre os grupos (Figura 20 A e B).

No tecido adiposo marrom interescapular a expressão relativa de *Ucp1* foi maior no grupo que recebeu liraglutida (400 µg/kg/dia) quando comparado ao grupo que recebeu rosiglitazona (4 mg/kg/dia) (Figura 20 C).

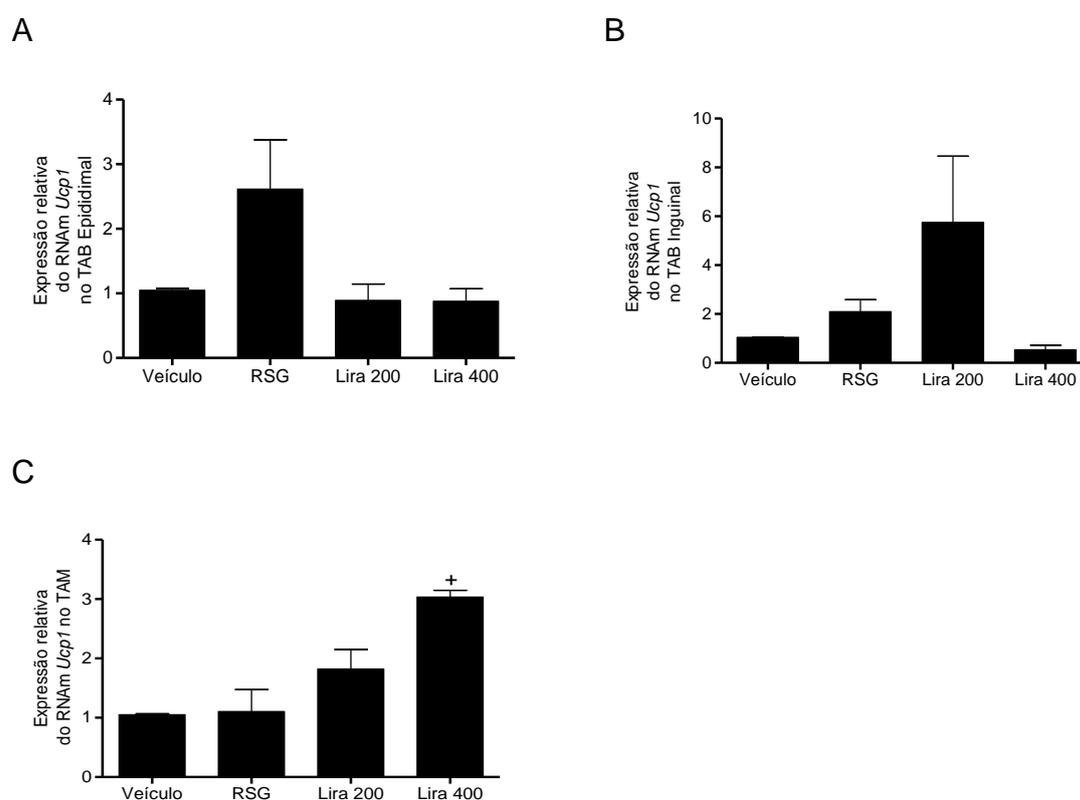


Figura 20. Expressão relativa de *Ucp1* nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida após 21 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4mg/kg/d), ou liraglutida (200 e 400 µg/kg/d), nos camundongos alimentados com DHL. (A) Expressão relativa de *Ucp1* no tecido adiposo branco epididimal, (B) no tecido adiposo branco inguinal e (C) no tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média ± EPM. + $p < 0,05$ vs. RSG (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 3 - 5$ camundongos por grupo. RSG, rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/d; Lira 200, liraglutida na dose de 200 µg/kg/d; Lira 400, liraglutida na dose de 400 µg/kg/d.

5.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2

No segundo delineamento experimental, teve-se como objetivo avaliar o efeito da liraglutida, isoladamente ou associada a um agonista $\beta 3$ -adrenérgico, sobre a

massa corporal, massa e histologia de diferentes depósitos de tecido adiposo, consumo de oxigênio tecidual e expressão de genes relacionados à termogênese.

5.2.2.1 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre o ganho de peso e a glicemia

Para avaliar o efeito da liraglutida e da sinalização β 3-adrenérgica sobre o ganho de peso e a glicemia em jejum, a partir da 17^a semana de vida, os camundongos que estavam recebendo DHL desde a 5^a semana de vida foram divididos em 2 grupos, cada um com 12 animais, para receber os seguintes tratamentos durante 21 dias: veículo ou liraglutida (400 μ g/kg/dia, divididos em duas doses diárias). Nos últimos cinco dias de tratamento, 6 animais tratados com veículo e 6 animais tratados com liraglutida receberam o agonista β 3-adrenérgico CL316,243, diluído em solução fisiológica a 0,9%, via intraperitoneal, uma vez ao dia, na dose de 1 mg/kg/dia.

Após 21 dias de tratamento, houve redução do ganho de peso induzido pela DHL nos animais tratados com liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo (Figura 21). Os animais que receberam a liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (L+B3) tiveram uma redução do ganho de peso significativa quando comparado aos animais que receberam apenas veículo e nos que receberam veículo e agonista β 3-adrenérgico (Figura 21).

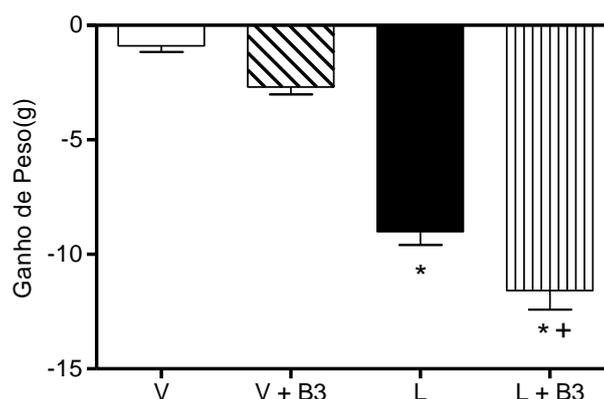


Figura 21. Ganho de peso em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo durante 21 dias, na ausência (V) ou presença (V+B3) do agonista β 3-adrenérgico do 16º ao 21º dia, ou com liraglutida durante 21 dias, na ausência (L) ou presença (L+B3) do agonista β 3-adrenérgico do 16º ao 21º dia. Liraglutida administrada na dose de 400 μ g/kg/d) agonista β 3-adrenérgico CL316,243 administrado na dose de 1mg/kg/dia. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V. + $p < 0.05$ vs V+B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo.

Foi observada redução significativa da glicemia no grupo tratado com liraglutida (400 μ g/kg/dia) por 21 dias e agonista β 3-adrenérgico (Cl 316,243, 1 mg/kg/dia) nos últimos 5 dias do tratamento, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 22).

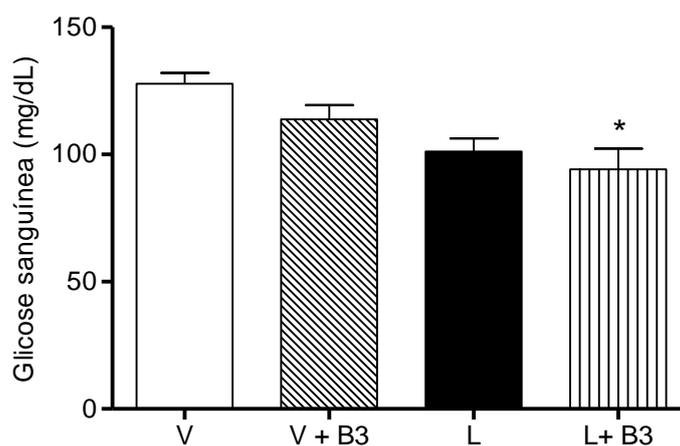


Figura 22. Glicemia de jejum em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo durante 21 dias, na ausência (V) ou presença (V+B3) do agonista β 3-adrenérgico do 16º ao 21º dia, ou com liraglutida durante 21 dias, na ausência (L) ou presença (L+B3) do agonista β 3-adrenérgico do 16º ao 21º dia. Liraglutida administrada na dose de 400 μ g/kg/d) agonista β 3-adrenérgico Cl316,243 administrado na dose de 1mg/kg/dia. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo.

5.2.2.2 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a adiposidade, massa do coração, do fígado e dos rins

Nos camundongos tratados com a liraglutida (400 μ g/kg/dia) por 21 dias e o agonista β 3-adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento foi observada redução da massa adiposa epididimal relativa (depósito visceral), quando comparados aos que receberam veículo apenas (Figura 22A e Tabela 06).

Tabela 6: Massa absoluta e relativa de tecidos em camundongos tratados com veículo ou liraglutida na presença ou ausência de ativação β 3-adrenérgica.

Depósito	Veículo		Veículo + B3		Liraglutida		Liraglutida + B3	
	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)	A (mg)	R (mg/g)
TAB epididimal	1973,7 \pm 178,8	54,0 \pm 6,3	1454,8 \pm 113,1	42,2 \pm 2,5	1123,5 \pm 43,8	39,5 \pm 1,6	792,94 \pm 82,54 **	29,2 \pm 1,6 *
TAB inguinal	1506,8 \pm 140,4	40,7 \pm 3,6	1241,5 \pm 143,8	35,8 \pm 3,5	627,4 \pm 77,4 *	21,9 \pm 2,5	459,8 \pm 130,6 *	16,3 \pm 3,8 **
TAM interescapular	131,8 \pm 17,5	3,5 \pm 0,4	71,7 \pm 7,6	2,1 \pm 0,2 *	87,9 \pm 10,6	3,1 \pm 0,3	61,3 \pm 10,7 *	2,3 \pm 0,3
Coração	132,5 \pm 7,0	3,6 \pm 0,1	144,8 \pm 2,5	4,2 \pm 0,07	121,5 \pm 9,5	4,3 \pm 0,3	135,8 \pm 13,4	5,0 \pm 0,3*
Rins	318,6 \pm 13,6	8,6 \pm 0,2	304,7 \pm 6,8	8,9 \pm 0,2	309,5 \pm 11,3	10,9 \pm 0,4 *	298,7 \pm 12,4	11,2 \pm 0,6 **

Dados apresentados como média \pm EPM (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn); * $p < 0.05$ vs V. + $p < 0.05$ vs V+B3. n = 5 - 6 camundongos por grupo. A: massa absoluta (g), B3: agonista β 3-adrenérgico CL316,243, R: massa relativa (mg/g de peso corporal).

No grupo tratado com liraglutida por 21 dias e com agonista β -3 adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento observou-se uma redução da massa adiposa inguinal (depósito subcutâneo), quando comparado com o grupo tratado com veículo e no grupo tratado com veículo e agonista β -3 adrenérgico (Figura 23B e Tabela 06).

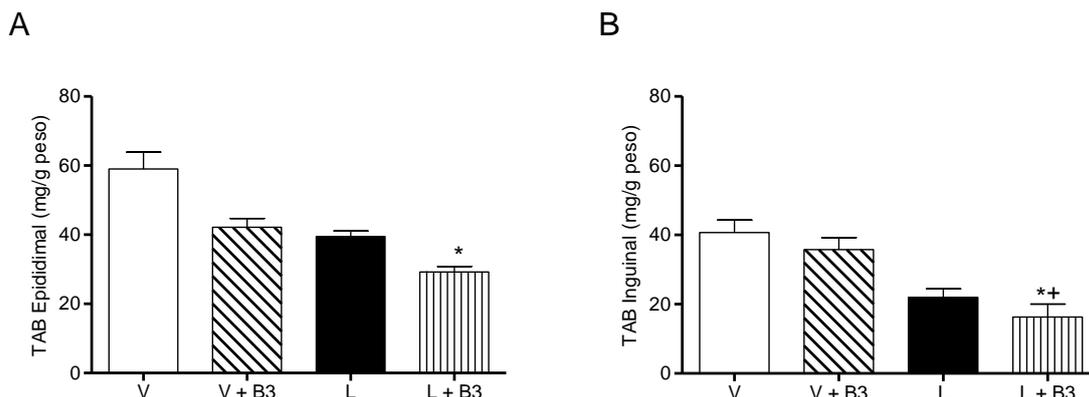


Figura 23. Massa de tecido adiposo branco visceral e subcutâneo em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Massa de tecido adiposo branco epididimal (visceral) e (B) massa de tecido adiposo branco inguinal (subcutâneo), corrigida para a massa corporal total, após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V. + $p < 0.05$ vs V + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

A massa do tecido adiposo marrom interescapular apresentou redução no grupo que recebeu veículo por 21 dias e o agonista β -3 adrenérgico por 5 dias, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo (Figura 24 e Tabela 06). No grupo que recebeu liraglutida associada ao agonista β -3 adrenérgico, observou-se apenas uma tendência de redução da massa adiposa marrom interescapular.

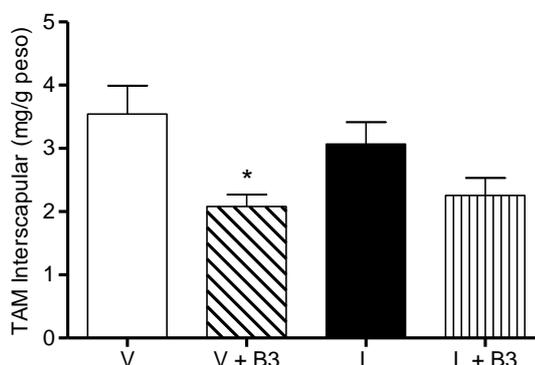


Figura 24. Massa de tecido adiposo marrom interescapular em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. Massa do tecido adiposo marrom interescapular, corrigida para a massa corporal total, após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. + $p < 0.05$ vs V + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos

por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

A massa relativa do coração apresentou aumento no grupo que recebeu a liraglutida (400 µg/kg/dia) por 21 dias e o agonista β3-adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo (Figura 25A e Tabela 06). Não foi observada diferença entre os grupos na massa absoluta do coração (Tabela 06). A massa relativa dos rins apresentou aumento tanto no grupo que recebeu a liraglutida (400 µg/kg/dia) por 21 dias e o agonista β3-adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento, quanto no grupo que recebeu a liraglutida isoladamente, quando comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo. Esse aumento na massa relativa dos rins foi observado também no grupo que recebeu a liraglutida e o agonista β3-adrenérgico quando comparado ao grupo que recebeu o veículo e o agonista β3-adrenérgico (Figura 25B e Tabela 06). Não foi observada diferença entre os grupos na massa absoluta dos rins (Tabela 06)

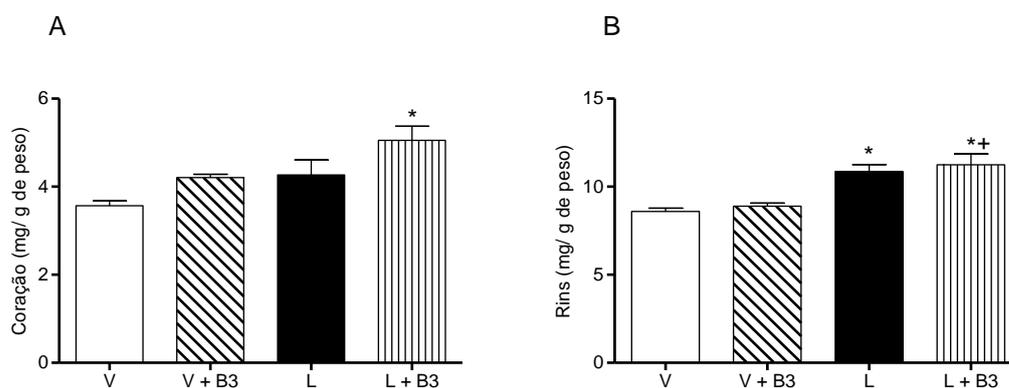


Figura 25. Massa do coração e rins em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica. (A) Massa do coração e (B) dos rins, corrigida para a massa corporal total, após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 µg/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média ± EPM. * p < 0.05 vs V. + p < 0.05 vs V + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). n = 5-6 camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

5.2.2.3 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a ingestão de energia e sobre a eficiência calórica

A quantidade absoluta de energia ingerida pelos animais no grupo que recebeu a liraglutida isoladamente (400 μ g/kg/dia) por 21 dias e no grupo que recebeu a liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico nos últimos 5 dias do período de 21 dias de tratamento, quando comparados aos grupos que receberam apenas o veículo e veículo associado ao agonista β 3-adrenérgico, foi menor (Figura 26 A).

Foi verificada redução da eficiência calórica nos animais dos grupos que receberam liraglutida, tanto isoladamente durante 21 dias, quanto na presença do agonista β 3-adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento, quando comparados aos animais do grupo veículo, como apresentado na Figura 25 B. Os animais que receberam liraglutida associada ao agonista β 3-adrenérgico também tiveram uma redução da eficiência calórica quando comparados aos animais que receberam veículo e agonista β 3-adrenérgico nos últimos 5 dias de tratamento (Figura 26B).

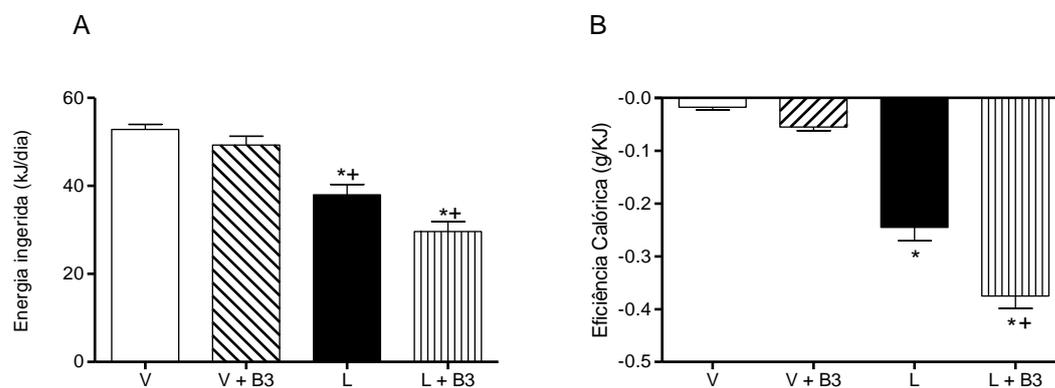


Figura 26. Energia ingerida e eficiência calórica em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Energia ingerida e (B) eficiência calórica após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V. + $p < 0.05$ vs V + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

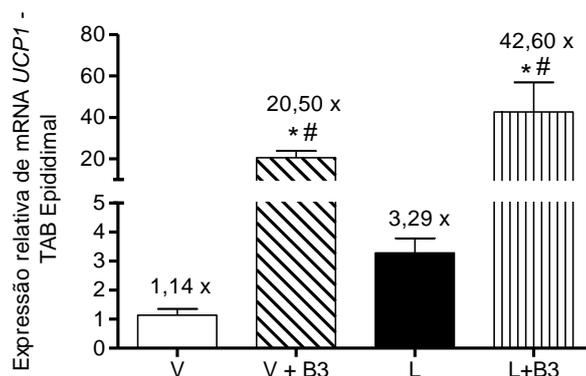
5.2.2.4 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a expressão gênica relativa de *Ucp1*

No tecido adiposo branco epididimal, a expressão relativa de *Ucp1* foi maior nos grupos tratados com o agonista β 3-adrenérgico (1 mg/kg/d, 5 dias), na presença ou ausência de liraglutida (400 μ g/kg/dia, 21 dias), quando comparados ao grupo que recebeu veículo. O tratamento isolado com liraglutida promoveu indução menos acentuada, de 3,29 vezes, da expressão de *Ucp1*. Houve, ainda, tendência de efeito sinérgico do co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico na indução da expressão de *Ucp1* (Figura 27 A).

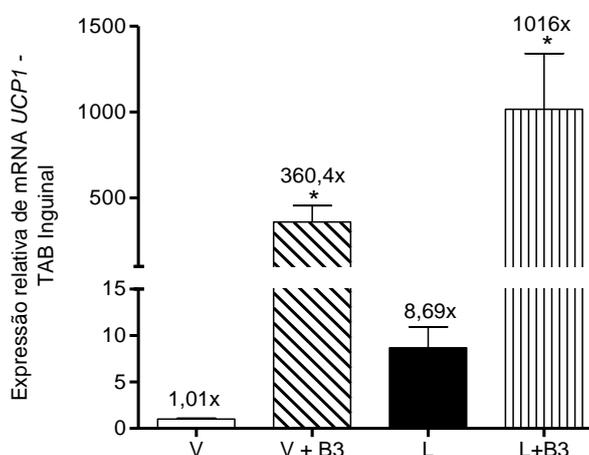
No tecido adiposo branco inguinal, a expressão relativa de *Ucp1* foi maior nos grupos tratados com o agonista β 3-adrenérgico (1 mg/kg/d, 5 dias), na presença ou ausência de liraglutida (400 μ g/kg/dia, 21 dias), quando comparados ao grupo que recebeu veículo. O tratamento isolado com liraglutida promoveu indução menos acentuada, de 8,69 vezes, da expressão de *Ucp1*. Houve, ainda, tendência de efeito sinérgico do co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico na indução da expressão de *Ucp1* (Figura 27 B).

No tecido adiposo marrom interescapular a expressão relativa de *Ucp1* foi maior no grupo tratado com o agonista β 3-adrenérgico, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo (Figura 27 C).

A



B



C

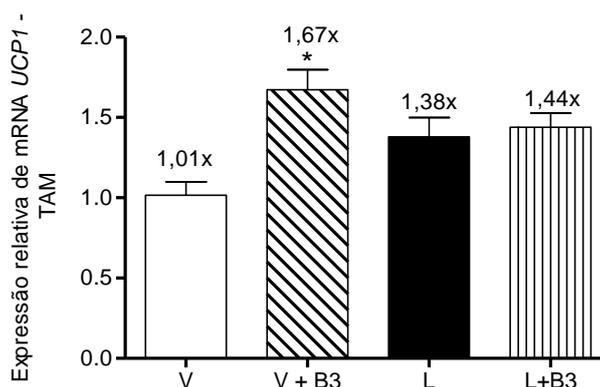


Figura 27. Expressão relativa de Ucp1 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Expressão relativa de Ucp1 no tecido adiposo branco epididimal, (B) branco inguinal e (C) marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V. # $p < 0.05$ vs L (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

5.2.2.5 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo de camundongos

A análise imunohistoquímica evidenciou que o tratamento com liraglutida ou com o agonista β 3-adrenérgico, isoladamente, não pareceu promover aumento da expressão proteica da UCP1 no tecido adiposo epididimal. O co-tratamento com liraglutida e com o agonista β 3 adrenérgico, no entanto, pareceu aumentar a expressão proteica da UCP1 (Figura 28).

No tecido adiposo inguinal, foi observado que o tratamento com liraglutida ou com o agonista β 3-adrenérgico, isoladamente, aumentaram a expressão proteica da UCP1, e que o co-tratamento com liraglutida e com o agonista β 3 adrenérgico pareceu induzir expressão mais acentuada da UCP1, quando comparado ao tratamento isolado com cada um deles (Figura 29). Comportamento semelhante foi observado no tecido adiposo marrom (Figura 30).

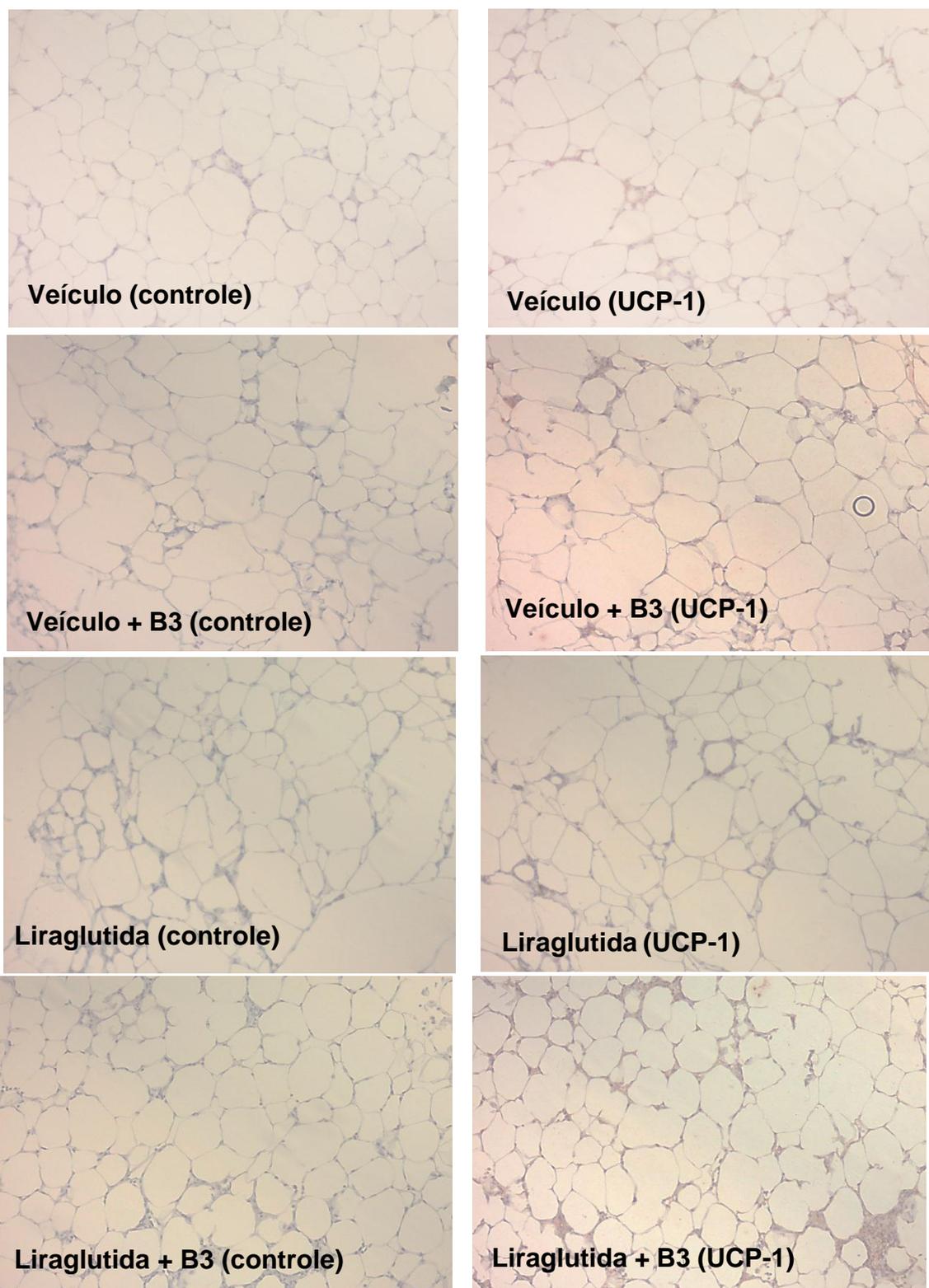


Figura 28 . Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo branco epididimal em resposta ao tratamento com liraglutida (400 µg/kg/d, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação β3-adrenérgica (CL316,243, 1 mg/kg/dia, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida). As imagens representativas foram capturadas com aumento de 20X em B, e escala de 100 µm, respectivamente. Amostra: anticorpo primário IgG anti-UCP1 (Abcam, 1-100), reativo a espécie camundongo; Controle: sem anticorpo primário. As lâminas foram coradas com substrato NovaRED que produz uma coloração avermelhada na proteína UCP1 e contracoradas com hematoxilina, que resulta na coloração azul-violeta dos núcleos celulares.

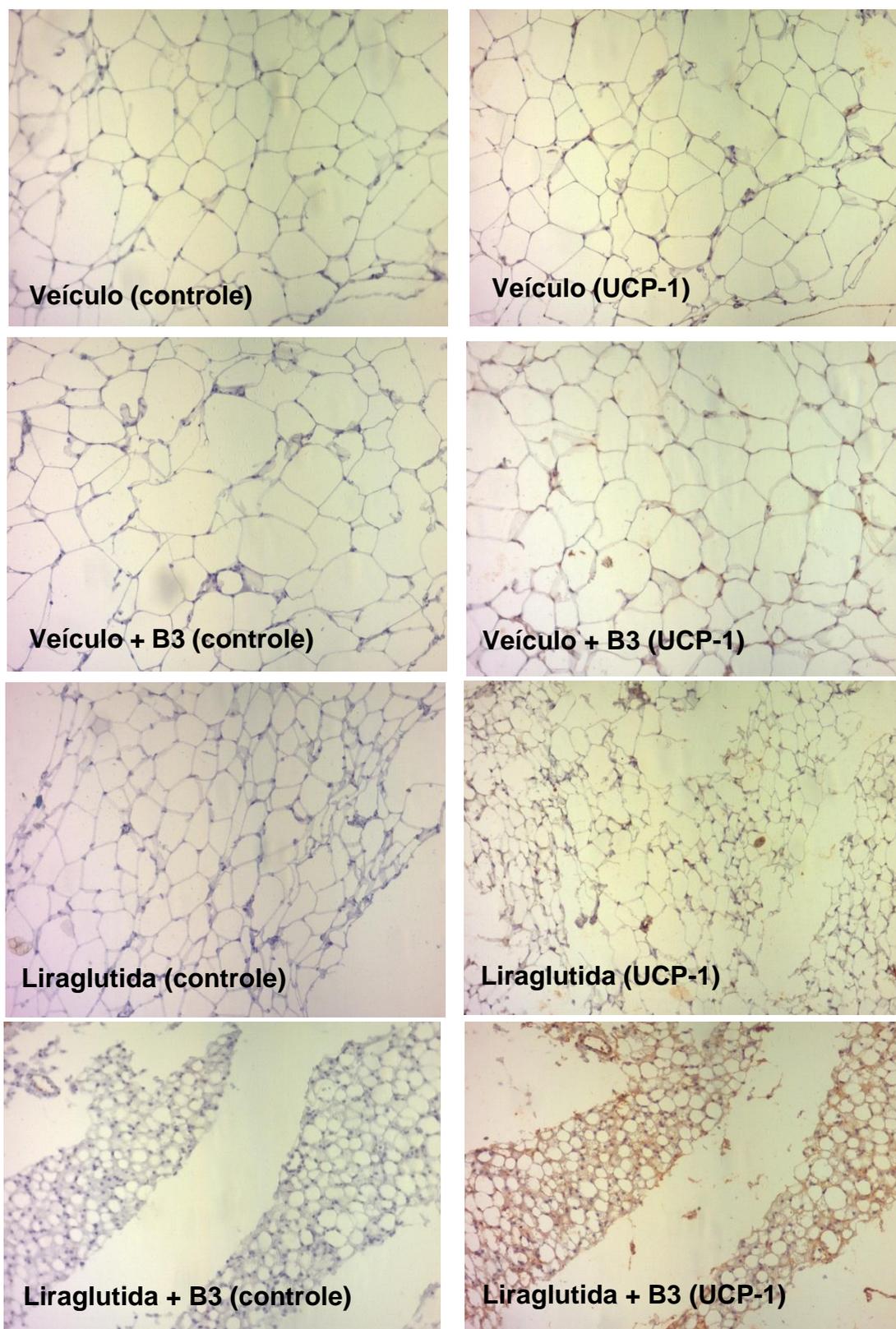


Figura 29 . Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo branco inguinal em resposta ao tratamento com liraglutida (400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica (CL316,243, 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida). As imagens representativas foram capturadas com aumento de 20X em B, e escala de 100 μm , respectivamente. Amostra: anticorpo primário IgG anti-UCP1 (Abcam, 1-100), reativo a espécie

camundongo; Controle: sem anticorpo primário. As lâminas foram coradas com substrato NovaRED que produz uma coloração avermelhada na proteína UCP1 e contracoradas com hematoxilina, que resulta na coloração azul-violeta dos núcleos celulares.

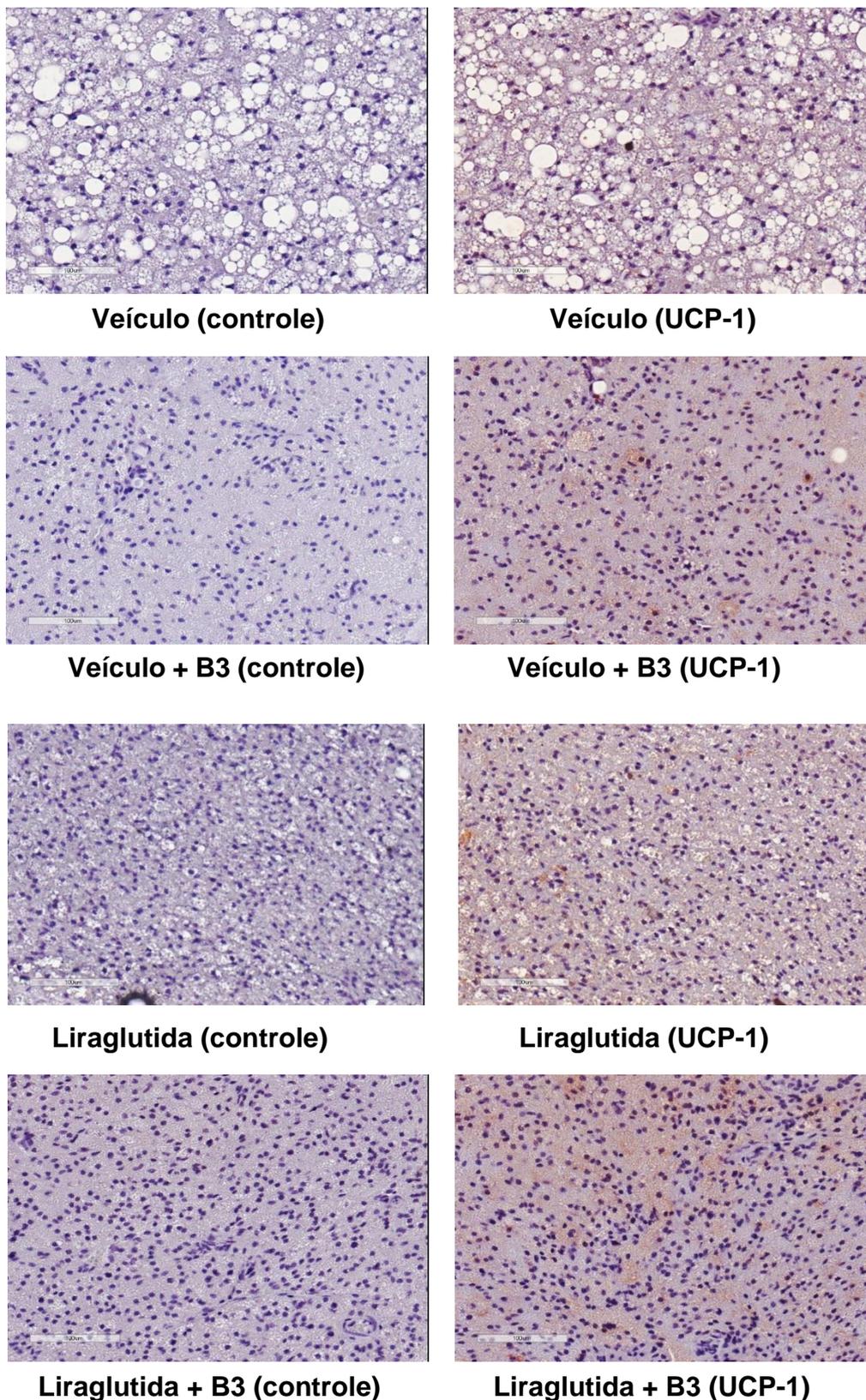


Figura 30. Imunolocalização da proteína UCP1 no tecido adiposo marrom em resposta ao tratamento com liraglutida (400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, durante 21 dias), na ausência ou presença de ativação $\beta 3$ -adrenérgica (CL316,243, 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, nos últimos 5 dias do período de tratamento com liraglutida). As imagens representativas foram capturadas com aumento de 20X em B, e escala de 100 μm , respectivamente. Amostra: anticorpo primário IgG anti-UCP1 (Abcam, 1-100), reativo a espécie camundongo; Controle: sem anticorpo primário. As lâminas foram coradas com substrato NovaRED que produz uma coloração avermelhada na proteína UCP1 e contracoradas com hematoxilina, que resulta na coloração azul-violeta dos núcleos celulares.

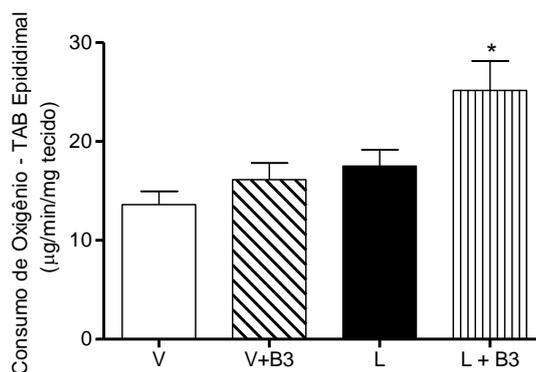
5.2.2.6 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre o consumo de oxigênio no tecido adiposo

No tecido adiposo branco epididimal, não foi observada mudança do consumo de oxigênio nos animais tratados com liraglutida ou com o agonista β 3-adrenérgico, isoladamente, em comparação com os animais que receberam veículo. Entretanto, o co-tratamento com liraglutida e com o agonista β 3-adrenérgico aumentou o consumo de oxigênio neste depósito de tecido adiposo (Figura 31 A).

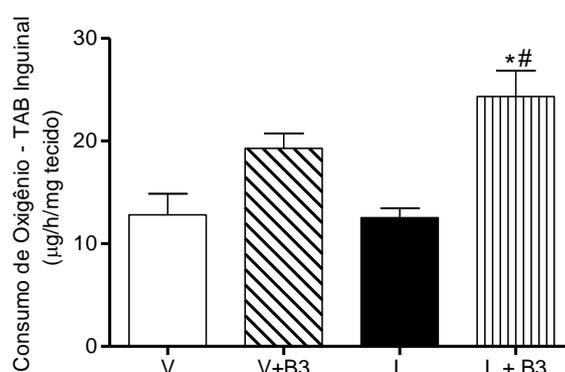
No tecido adiposo branco inguinal, houve tendência de aumento do consumo de oxigênio no grupo tratado com o agonista β 3-adrenérgico, em comparação com o grupo que recebeu veículo. O co-tratamento com liraglutida e com o agonista β 3-adrenérgico aumentou significativamente o consumo de oxigênio neste depósito, em comparação com o tratamento com cada um isoladamente (Figura 31 B).

No tecido adiposo marrom interescapular, houve tendência de aumento do consumo de oxigênio nos animais tratados com liraglutida ou o agonista β 3-adrenérgico isoladamente. O consumo foi significativamente maior nos animais que foram co-tratados com liraglutida e o β 3-adrenérgico (Figura 31 C).

A



B



C

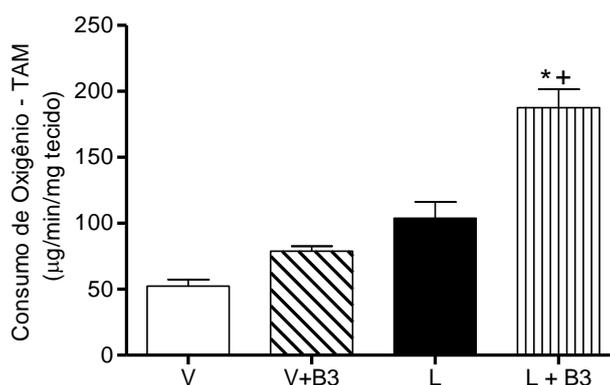


Figura 31. Consumo de oxigênio nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Consumo de oxigênio no tecido adiposo branco epididimal, (B) branco inguinal e (C) marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V. # $p < 0.05$ vs L. + $p < 0.05$ vs V + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

5.2.2.5 Efeito da liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica, sobre a expressão relativa de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano

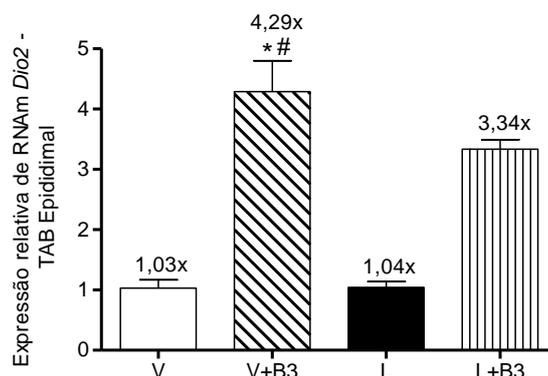
Foi investigado o efeito do tratamento com liraglutida durante 21 dias, na dose de 400 μ g/kg/dia, na presença ou ausência de co-tratamento com o agonista β 3-adrenérgico nos últimos 5 dias do período de 21 dias, sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano, incluindo a desidrinase tipo 2 (*Dio2*), proteínas de membrana transportadoras de hormônio tireoidiano MCT8 (*Sc16a2*) e MCT10 (*Sc16a10*) e os receptores de hormônio tireoidiano TR α (*Thra*) e TR β (*Thrb*).

No tecido adiposo branco epididimal, o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico induziu significativamente a expressão relativa de *Dio2*, quando comparado ao veículo, efeito não observado em resposta ao tratamento com liraglutida. Houve tendência de redução da expressão de *Dio2* em resposta ao co-tratamento com liraglutida e com o agonista β 3-adrenérgico, quando comparado ao tratamento isolado como agonista β 3-adrenérgico, embora não significativa (Figura 32 A).

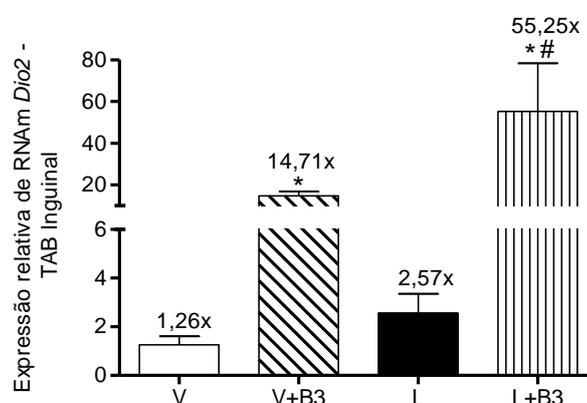
No tecido adiposo branco inguinal, houve aumento significativo da expressão de *Dio2* em resposta ao tratamento com o agonista β 3-adrenérgico e tendência de aumento em resposta ao tratamento com liraglutida, em comparação com o veículo. O co-tratamento com o agonista β 3-adrenérgico e liraglutida apresentou efeito sinérgico na indução da expressão de *Dio2* (Figura 32 B).

No tecido adiposo marrom, houve aumento significativo da expressão de *Dio2* em resposta ao tratamento com agonista β 3-adrenérgico, isoladamente ou na presença da liraglutida. Houve tendência de aumento da expressão de *Dio2* em resposta ao tratamento com liraglutida, embora não significativa (Figura 32 C).

A



B



C

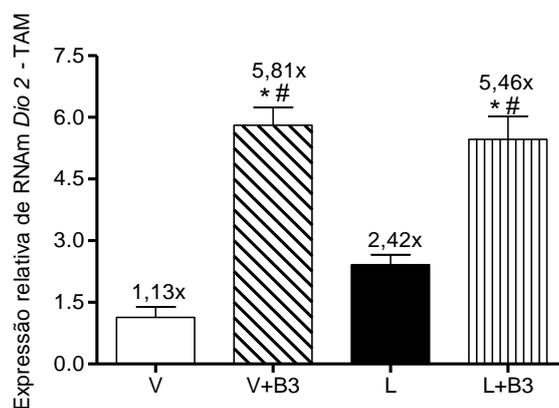
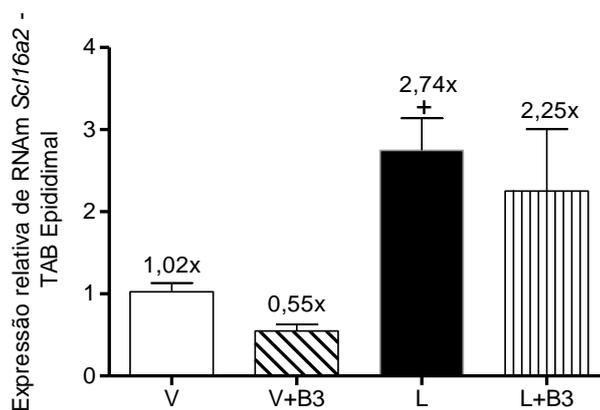


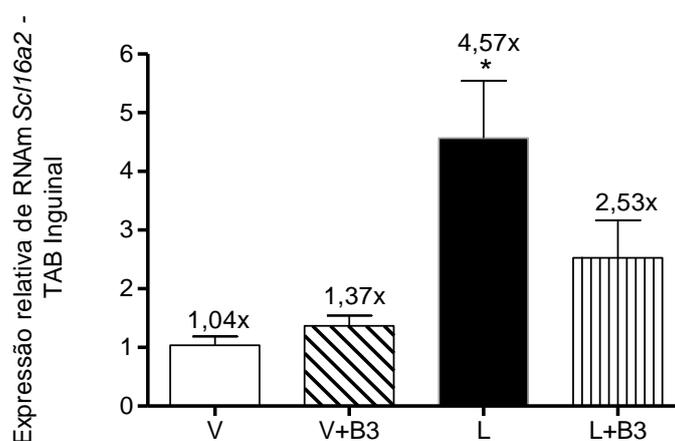
Figura 32. Expressão relativa de Dio2 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β_3 -adrenérgica. (A) Expressão relativa de Dio2 no tecido adiposo branco epididimal, (B) branco inguinal e (C) marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ e 5 dias de tratamento com o agonista β_3 -adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V; + $p < 0.05$ vs V + B3; # $p < 0.05$ vs L; $\neq p < 0.05$ vs L + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e L+B3, liraglutida na dose de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

A expressão relativa do transcrito do gene que codifica o transportador de hormônio tireoidiano MCT8 (*Sc1116a2*), no tecido adiposo branco epididimal, diminuiu nos animais tratados com o agonista β 3-adrenérgico, em comparação com os que receberam veículo. O tratamento com liraglutida aumentou significativamente a expressão deste transcrito, em comparação com o veículo, de forma significativa nos animais que não foram co-tratados com o agonista β 3-adrenérgico (Figura 33 A). No tecido adiposo branco inguinal, houve aumento significativo da expressão deste transcrito nos animais tratados com liraglutida isoladamente, em comparação com o veículo. Esse aumento foi menos acentuado nos animais co-tratados com o agonista β 3-adrenérgico (Figura 33 B). No tecido adiposo marrom, houve aumento significativo da expressão do transcrito do MCT8 em resposta ao tratamento com o agonista β 3-adrenérgico, em comparação com o veículo; a indução deste transcrito foi menos acentuada nos animais tratados com liraglutida isoladamente ou co-tratados com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (Figura 33 C).

A



B



C

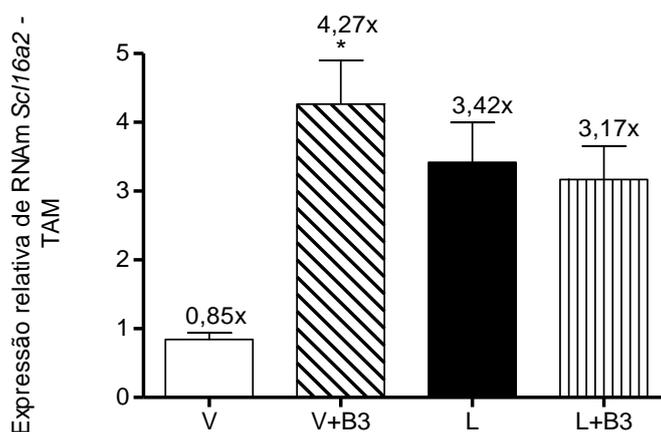
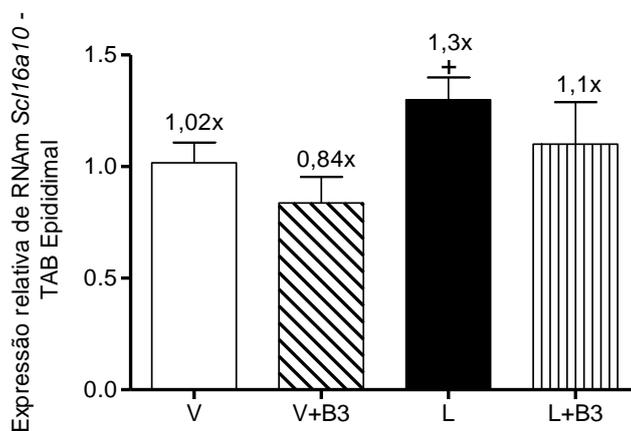


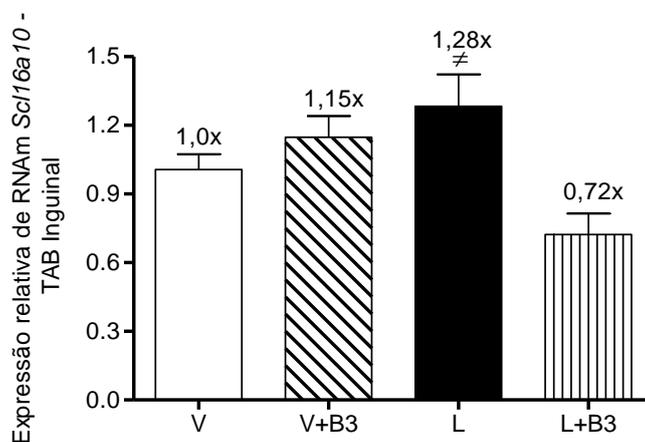
Figura 33. Expressão relativa de Sc16a2 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Expressão relativa de Sc16a2 no tecido adiposo branco epididimal, (B) no tecido adiposo branco inguinal e (C) no tecido adiposo marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V; + $p < 0.05$ vs V + B3; # $p < 0.05$ vs L; \neq $p < 0.05$ vs L + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

A expressão do transcrito do gene que codifica o transportador de hormônio tireoidiano MCT10 aumentou discretamente no tecido adiposo branco epididimal dos animais tratados com liraglutida e não se modificou em resposta ao tratamento com o agonista β 3-adrenérgico ou ao co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (Figura 34 A). Comportamento semelhante foi observado no tecido adiposo branco inguinal (Figura 34 B) e no tecido adiposo marrom (Figura 34 C).

A



B



C

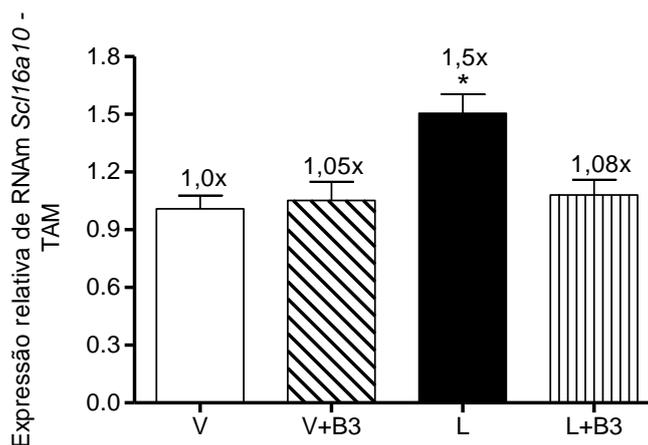
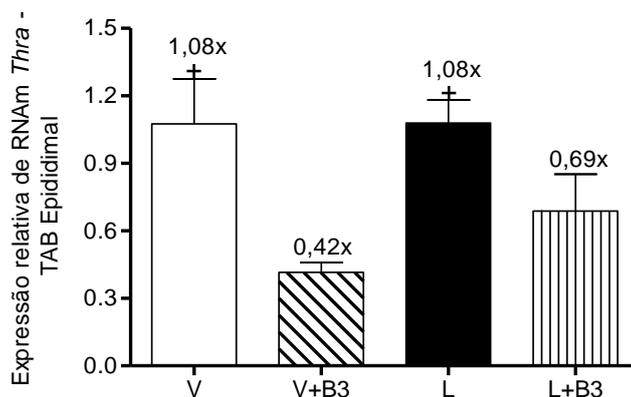


Figura 34. Expressão relativa de Scl16a10 nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Expressão relativa de Scl16a10 no tecido adiposo branco epididimal, (B) branco inguinal e (C) marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V; + $p < 0.05$ vs V + B3; # $p < 0.05$ vs L; \neq $p < 0.05$ vs L + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1

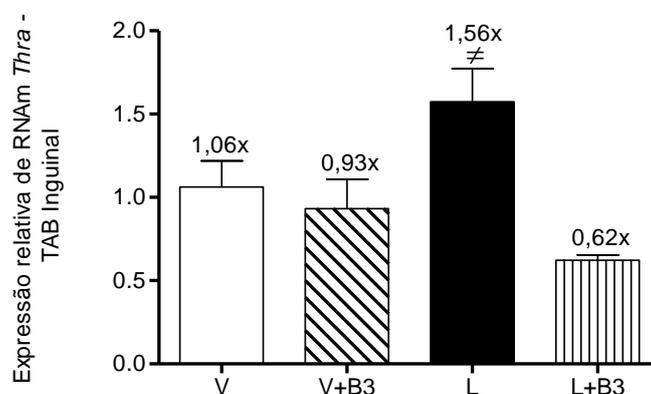
mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

Foi avaliada, também, a expressão do transcrito dos genes que codificam as duas isoformas do receptor do hormônio tireoidiano, TR α e TR β . No tecido adiposo branco epididimal, foi observado que o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico reduziu de forma significativa a expressão de *Thra*, isoladamente ou na presença da liraglutida, e não houve mudança em resposta ao tratamento isolado com liraglutida (Figura 35 A). No tecido adiposo branco inguinal, houve indução discreta, porém significativa, da expressão de *Thra*, em resposta ao tratamento com a liraglutida, e tendência de redução da expressão deste transcrito em resposta ao co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (Figura 35 B). No tecido adiposo marrom, não houve mudança significativa da expressão de *Thra* nos diferentes grupos experimentais (Figura 35 C).

A



B



C

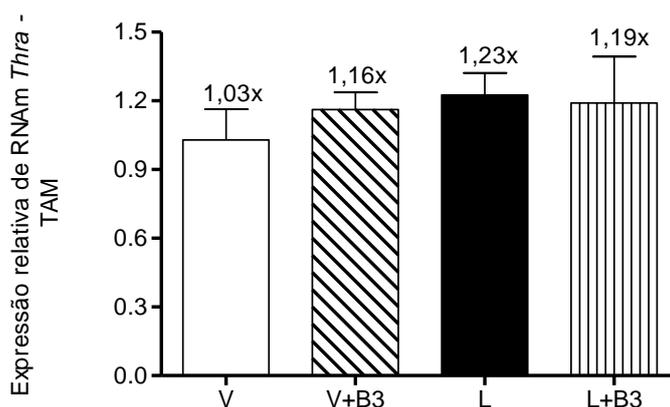
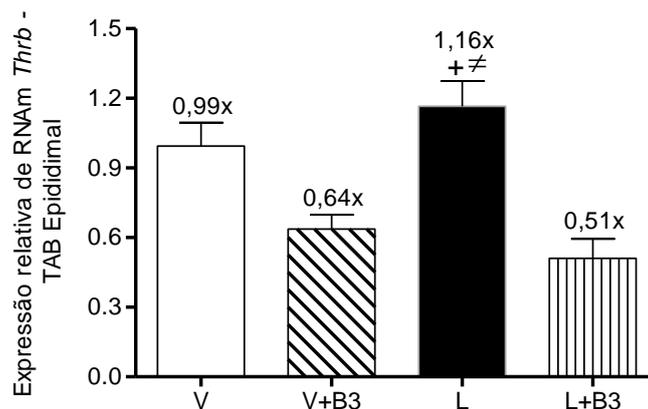


Figura 35 . Expressão relativa de *Thra* nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Expressão relativa de *Thra* no tecido adiposo branco epididimal, (B) branco inguinal e (C) marrom após 21 dias de tratamento com veículo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V; + $p < 0.05$ vs V + B3; # $p < 0.05$ vs L; $\neq p < 0.05$ vs L + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na

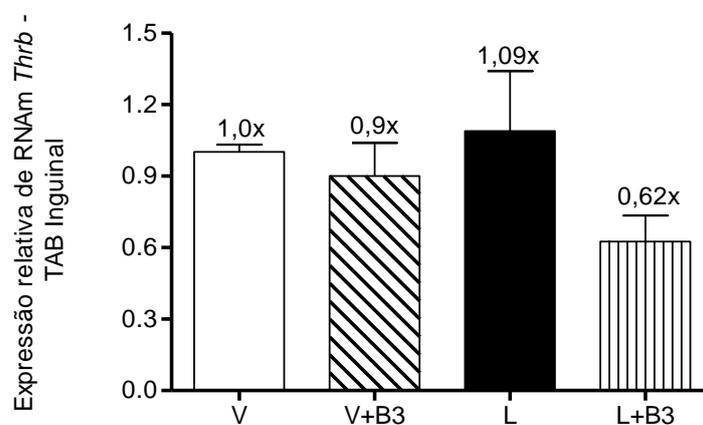
dose de 400 µg/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 µg/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

No tecido adiposo branco epididimal, a expressão relativa de *Thrb* diminuiu em resposta ao tratamento com o agonista β 3-adrenérgico, na ausência ou presença de liraglutida, em comparação com o veículo. Não houve mudança significativa da expressão deste transcrito em resposta ao tratamento isolado com a liraglutida (Figura 36 A). No tecido adiposo branco inguinal, foi observada tendência de redução da expressão de *Thrb* em resposta ao co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (Figura 36 B), ao passo que no tecido adiposo marrom o tratamento com liraglutida isoladamente induziu significativamente a expressão de *Thrb*, efeito atenuado pelo co-tratamento com liraglutida e o agonista β 3-adrenérgico (Figura 36 C).

A



B



C

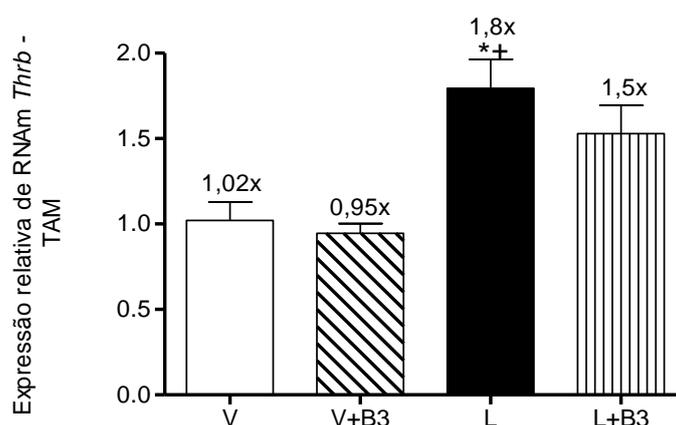


Figura 36. Expressão relativa de Thrb nos tecidos adiposos em resposta ao tratamento com liraglutida, na ausência ou presença de ativação β 3-adrenérgica. (A) Expressão relativa de Thrb no tecido adiposo branco epididimal, (B) no tecido adiposo branco inguinal e (C) no tecido adiposo marrom após 21 dias de tratamento com veiculo (V e V+B3) ou liraglutida (L e L+B3) na dose de 400 μ g/kg/d e 5 dias de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico CL316,243 na dose de 1mg/kg/dia (V+B3 e L+B3). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs V; + $p < 0.05$ vs V + B3; # $p < 0.05$ vs L; \neq $p < 0.05$ vs L + B3 (análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste De Dunn). $n = 5-6$ camundongos por grupo. V, solução fisiológica (NaCl 0,9%); V+B3, solução fisiológica (NaCl 0,9%) e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia; L, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e L+B3, liraglutida na dose de 400 μ g/kg/dia e CL316,243 na dose de 1 mg/kg/dia.

5.3 CULTURA DE CÉLULAS

5.3.1 Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em cultura

Pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a se diferenciar em meio completo (contendo a combinação IBMX, dexametasona e insulina) (Figura 37) ou em meio incompleto (contendo insulina) (Figura 38). Durante todo o período de diferenciação (14 dias), as células foram tratadas com veículo (DMSO, controle negativo), rosiglitazona (10^{-5} M, controle positivo) ou a liraglutida (10^{-8} M e 10^{-7} M), em placas de 6 poços.

Foi observado aumento da diferenciação adipocitária, avaliada pelo acúmulo intracelular de lipídeos, nas células induzidas a se diferenciar com meio completo (Figura 36) e tratadas com liraglutida, em relação às células tratadas com veículo. O acúmulo lipídico foi comparável nas células tratadas com liraglutida e rosiglitazona.

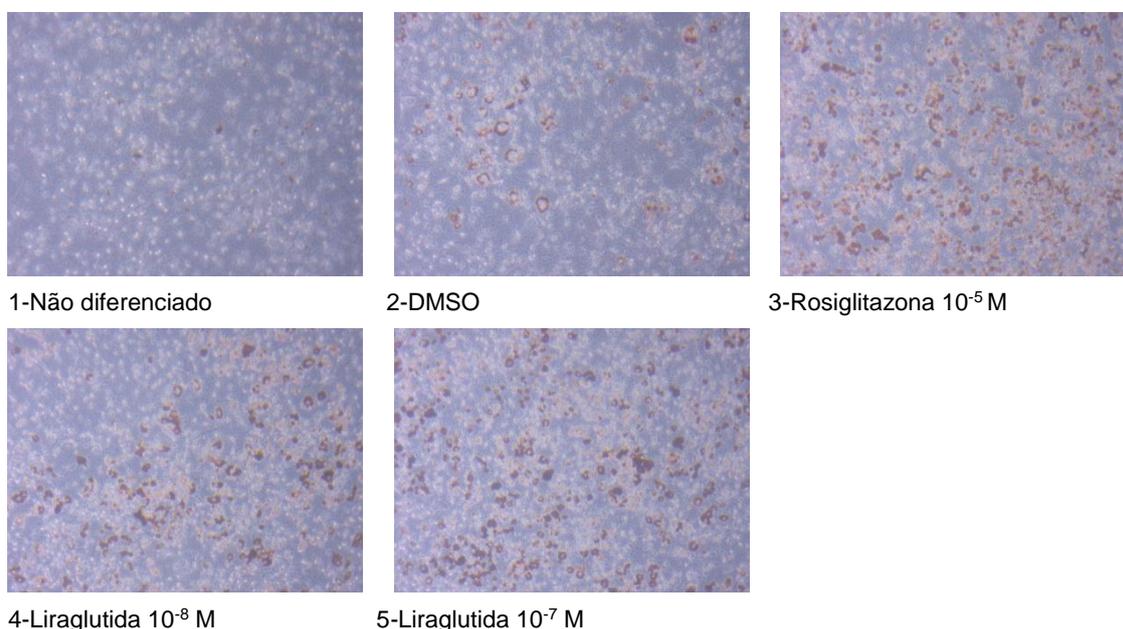


Figura 37 . Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos com meio completo. Dois dias após a confluência, as células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com $1 \mu\text{M}$ de dexametasona, $0,5 \text{ mM}$ de IBMX e $1 \mu\text{g/mL}$ de insulina por dois dias e, em seguida, mantidas em meio contendo $1 \mu\text{g/mL}$ de insulina. Durante o período de cultivo, foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (10^{-5} M) ou liraglutida nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-7} M. Após 14 dias, foram coradas com óleo vermelho O e observadas por microscopia (aumento de 10X)

Nas células induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina, não foi observado aumento do acúmulo lipídico intracelular no grupo tratado com liraglutida, em relação ao grupo controle (Figura 38).

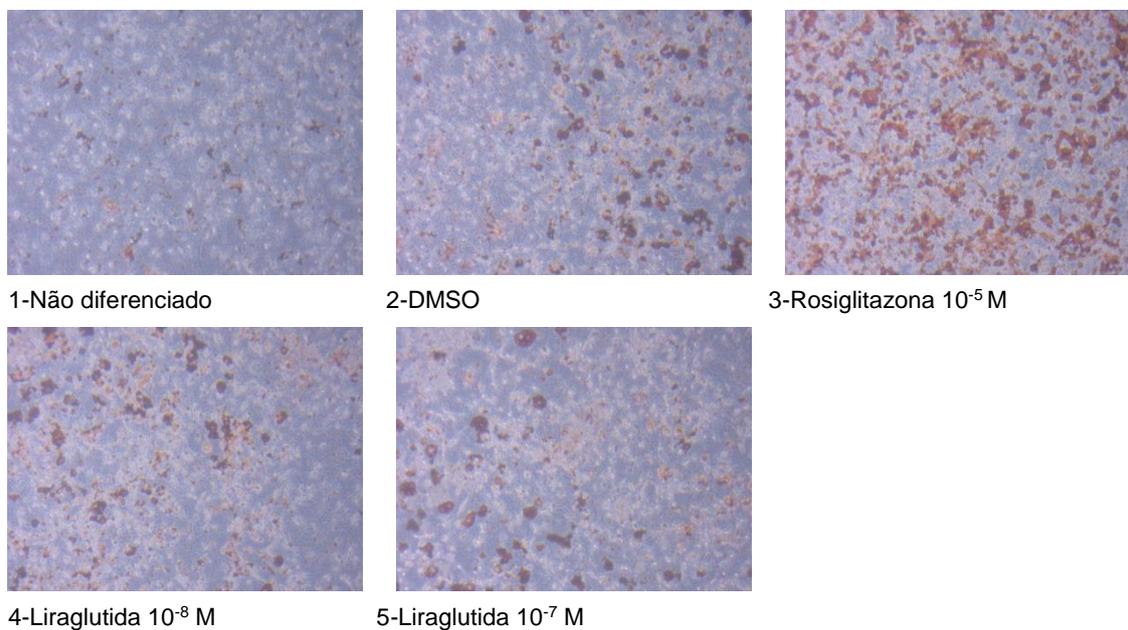


Figura 38. Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos com meio incompleto. Dois dias após a confluência, as células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com $10 \mu\text{g/mL}$ de insulina por dois dias e, em seguida, mantidas em meio contendo $5 \mu\text{g/mL}$ de insulina. Durante o período de cultivo, foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (10^{-5} M) ou liraglutida nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-7} M. Após 14 dias, foram coradas com óleo vermelho O e observadas por microscopia (aumento de 10X)

O ensaio utilizando o meio completo foi também realizado utilizando células mesenquimais C3H10T1/2 (Figura 39). Ao final dos 14 dias, a diferenciação foi avaliada pela coloração com óleo vermelho O. Neste tipo celular, não foi observada indução de acúmulo lipídico intracelular nas células tratadas com liraglutida.

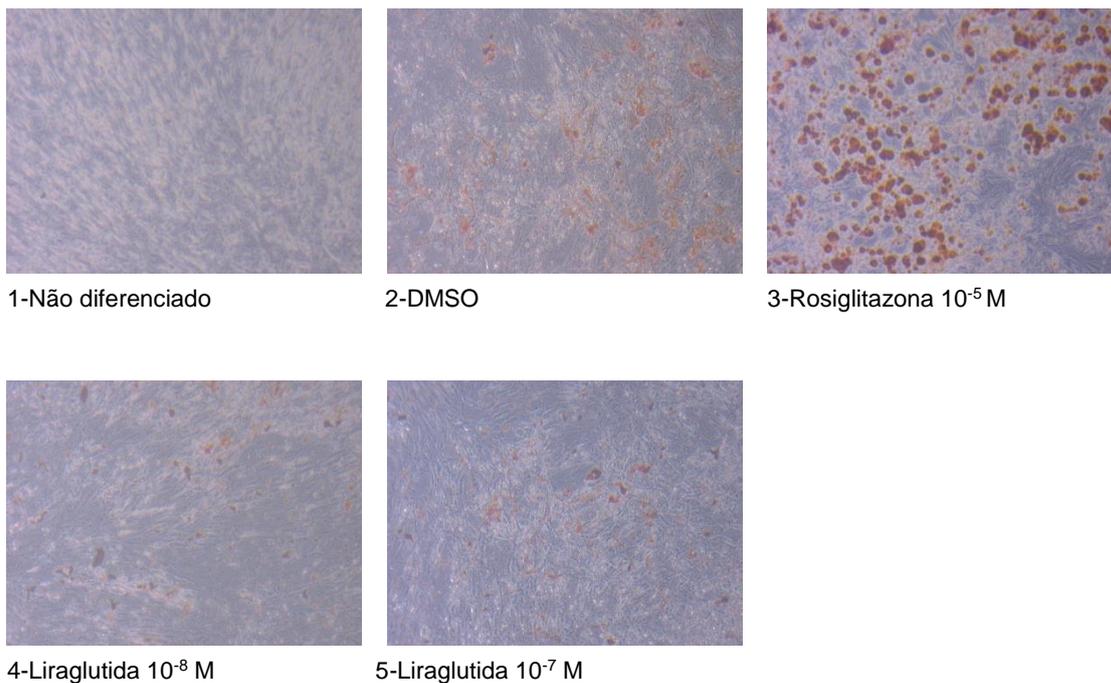


Figura 39. Efeito da liraglutida sobre a adipogênese em células mesenquimais C3H10T1/2. Dois dias após a confluência, células C3H10T1/2 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com $1 \mu\text{M}$ de dexametasona, $0,5 \text{ mM}$ de IBMX e $1 \mu\text{g/mL}$ de insulina por dois dias e, em seguida, mantidas em meio contendo $1 \mu\text{g/mL}$ de insulina. Durante o período de cultivo, foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (10^{-5} M) ou liraglutida nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-7} M. Após 14 dias, foram coradas com óleo vermelho O e observadas por microscopia (aumento de 10X)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se o efeito da liraglutida, um incretinomimético, em cultura de células e *in vivo*. Em cultura, foi observado efeito adipogênico e, *in vivo*, efeito antidiabético acompanhado de perda de peso, perda de massa adiposa, redução da eficiência calórica e aumento da expressão do gene que codifica a UCP1 nos depósitos visceral e subcutâneo do tecido adiposo branco.

Estudos em animais (77) mostraram o papel da ativação de receptores de GLP1, no hipotálamo, na promoção da redução do peso corporal. Foi observado que a administração intracerebroventricular de agonista do receptor de GLP1 (liraglutida), em ratos, resultou em perda de peso e inibição, em curto e longo prazos, da ingestão de alimentos. A administração periférica de GLP1 apresenta efeito semelhante. Foi observado que o tratamento de camundongos, por via subcutânea, com liraglutida na dose de 10 nmol/kg, por 6 semanas, promoveu redução do peso corpóreo e da adiposidade (87).

A liraglutida foi inicialmente aprovada para o tratamento da hiperglicemia no diabetes mellitus tipo 2, devido ao seu efeito de promover aumento da secreção de insulina dependente de glicose. Em razão de seu efeito em induzir saciedade e, assim, perda de peso significativa, foi aprovada recentemente como medicamento anti-obesidade. Em um estudo multicêntrico randomizado, conduzido em 27 países da Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia, África e Austrália, foi observada a eficácia e a segurança da liraglutida, administrada por via subcutânea em dose única diária, em promover redução do peso corpóreo e melhora do controle metabólico (88).

Em concordância com os dados descritos acima, no presente estudo observou-se redução do peso dos animais que receberam liraglutida nas duas doses (200 e 400 µg/kg/d), quando comparados aos animais que receberam rosiglitazona ou veículo. Observou-se perda de peso mais acentuada nos animais que receberam a maior dose da liraglutida, sugerindo efeito dose-dependente, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Esperava-se maior ganho de peso nos animais que receberam rosiglitazona, visto que em trabalhos anteriores (89) (90), tanto em roedores quanto em humanos, houve aumento do ganho de peso em resposta ao tratamento com a rosiglitazona. No nosso estudo, o ganho de peso pode não ter sido tão pronunciado devido à dose da rosiglitazona utilizada, inferior à de estudos

anteriores. Cabe ressaltar que embora os animais tratados com rosiglitazona não tenham apresentado ganho de peso significativo, eles apresentaram aumento da massa adiposa, esperado em resposta à ativação total do PPAR gama (91).

Além de ter sido observada maior perda de peso nos animais tratados com a liraglutida, no presente estudo, também houve tendência de redução da massa adiposa subcutânea e visceral, e redução do tamanho do adipócito visceral, o que sugere redução do peso corporal às custas da massa gordurosa. Esses achados são condizentes com os observados em estudo prévio, descrito anteriormente (87), no qual os animais foram tratados com a liraglutida por 6 semanas. A redução da massa adiposa, sobretudo visceral, está associada a benefícios sobre a homeostase metabólica (24). Além disso, o tratamento com a liraglutida reduziu o acúmulo de gordura no fígado, o que pode ser atribuído ao seu efeito sobre o peso. A rosiglitazona, em concordância com dados de estudos prévios em roedores (91, 92), aumentou o acúmulo hepático de lipídios.

No presente estudo, o tratamento com liraglutida não modificou significativamente a massa de tecido adiposo marrom. Houve tendência de aumento da massa deste depósito em resposta ao tratamento com a rosiglitazona, e de redução em resposta ao tratamento com a liraglutida. A redução da massa do tecido adiposo marrom nos camundongos tratados com liraglutida pode ser interpretada como o resultado de redução do seu conteúdo lipídico. Não é possível, também, descartar efeito tóxico da liraglutida e, em consequência, redução do peso e da massa adiposa. Entretanto, consideramos pouco provável este efeito considerando que as doses de liraglutida utilizadas foram semelhantes às utilizadas em estudos prévios (93). Além disso, embora não tenham sido realizados testes específicos para avaliação de toxicidade, os animais não apresentaram alterações sugestivas de toxicidade, como modificações do seu comportamento ou alterações histológicas indicativas de toxicidade, inclusive hepáticas.

Os mecanismos envolvidos na melhora do controle glicêmico e redução do peso corporal em resposta ao uso de agonista dos receptores de GLP1 foram explorados em estudos anteriores (13, 94). O principal mecanismo envolvido na melhora da hiperglicemia é o aumento da secreção de insulina, dependente de glicose, e secundariamente a redução da secreção de glucagon (54). A sinalização pelo GLP-1 também aumenta a síntese de insulina, diminuem a resistência das células

β à glicose, além de estimularem a proliferação e a neogênese destas células e inibirem sua apoptose(95). Estes efeitos fundamentam o uso de análogos de GLP1, como a albiglutida, dulaglutida, exenatida e a liraglutida, no tratamento do DM2. Além disto, estes fármacos apresentam como vantagem o baixo risco de hipoglicemia, em monoterapia, redução do peso corporal e de fatores de risco cardiovascular (57, 96).

Outro efeito observado no presente estudo em resposta ao tratamento com a liraglutida, por via intraperitoneal, foi a redução da ingestão de energia, como esperado em face à ação hipotalâmica do fármaco (59). O tratamento com a rosiglitazona não aumentou a ingestão de energia, como esperado e já descrito em alguns estudos (97, 98), o que pode ter ocorrido devido à baixa dose da rosiglitazona.

A redução do peso somente por resultado da redução do apetite possivelmente resultaria em redução do gasto energético e, assim, aumento da eficiência calórica, traduzindo aumento da capacidade de armazenamento energético. Entretanto, este efeito não foi observado no presente estudo, uma vez que animais tratados com a liraglutida apresentaram redução da eficiência calórica apesar de terem perdido peso. A redução da eficiência calórica, como foi medida no estudo, poderia significar perda calórica fecal ou aumento do gasto energético. Perda calórica fecal não foi medida, mas, para nosso conhecimento, não há descrição do efeito do tratamento da liraglutida em aumentar a perda calórica. Desta forma, consideramos a possibilidade de aumento do gasto energético. De fato, este efeito foi observado em estudos anteriores. Beiroa e colaboradores (2014) (12) mostraram que a administração intracerebroventricular da liraglutida em camundongos resultou em perda de peso, redução da massa adiposa e aumento da expressão de genes relacionados à termogênese. Estudos em modelos animais sugerem que os agonistas do receptor de GLP-1 possam apresentar efeito direto sobre o gasto energético (99, 100).

Uma forma fisiologicamente importante de aumento do gasto energético é o aumento da termogênese adaptativa, mediada pela UCP1, no adipócito marrom e no bege. Para investigar este efeito no presente estudo foi avaliada a expressão do RNAm da UCP1 nos depósitos de TAB e TAM. Foi observado aumento da expressão no TAB inguinal e TAM, porém não no TAB epididimal. Tais resultados não seriam esperados na perda de peso exclusivamente devida à redução do apetite, visto que uma situação análoga ao jejum tradicionalmente não está associada à redução do gasto energético

(101). Desta forma, este efeito foi melhor investigado com novo delineamento experimental.

O segundo delineamento experimental buscou aprofundar a investigação do efeito da liraglutida no TAM e a aquisição de fenótipo termogênico pelo TAB, em modelo animal de obesidade induzida por DHL, em condições basais e estimuladas. O estímulo clássico para a termogênese no TAM e no TAB é o frio (102). Protocolo de aclimação ao frio em seres humanos aumenta a atividade TAM em paralelo com um aumento na termogênese sem tremor, ou termogênese adaptativa (103). Para mimetizar esta situação, os animais foram tratados com o agonista β 3-adrenérgico CL 316,243.

À semelhança do delineamento 1, foi observada redução do peso em resposta ao tratamento com liraglutida, mais acentuada na presença do agonista β 3-adrenérgico. Diversos estudos anteriores mostraram que o tratamento com agonistas β 3-adrenérgicos causa redução do peso, que em geral é acompanhada por diminuição da energia ingerida e aumento do gasto energético (104, 105). Também houve tendência de redução da glicemia de jejum com o tratamento com liraglutida, acentuada em presença do agonista β 3-adrenérgico. Este dado é concordante com os de estudos anteriores, que indicaram que o tratamento com agonista β 3-adrenérgico resulta na redução dos índices glicêmicos (106, 107).

Houve tendência de redução da massa adiposa branca nos animais tratados com a liraglutida, sendo mais acentuada em resposta ao co-tratamento com agonista beta 3-adrenérgico. Em concordância, estudos anteriores mostraram que o tratamento com CL316,243 reduz a massa adiposa (106). No presente estudo, também foi observado aumento relativo da massa do coração e dos rins, mas não aumento absoluto, o que sugere que isso ocorreu apenas devido à perda de massa gordurosa. Assim sendo, a interpretação foi de que os órgãos ficaram proporcionalmente maiores em relação ao peso total dos animais.

O tratamento com a liraglutida resultou em redução da ingestão de energia e da eficiência calórica, efeito consistente com dados de estudos anteriores (100). Esperava-se efeito do tratamento isolado com agonista β 3-adrenérgico, considerando dados anteriores (104, 108), porém não foi observado efeito do tratamento isolado com este fármaco, embora ele tenha acentuado o efeito da liraglutida.

Para investigar o efeito da liraglutida, na ausência ou presença de estimulação β 3-adrenérgica, foi inicialmente avaliada a expressão do transcrito da UCP1 no tecido adiposo marrom e no TAB. No TAM, não foi observado efeito significativo dos tratamentos com a liraglutida sobre a expressão de *Ucp1*, embora tenha havido resultado sugestivo de aumento de sua expressão proteica. Houve discreto aumento da expressão de *Ucp1* e aumento da expressão proteica de UCP1 nos animais tratados apenas com o agonista β 3-adrenérgico, em concordância com estudos anteriores (109), e pareceu haver efeito aditivo da liraglutida e do agonista β 3-adrenérgico em promover indução da expressão proteica de UCP1. É possível que a indução discreta da expressão de *Ucp1* neste tecido seja consequência da expressão de maiores níveis deste transcrito em condições basais, o que torna mais difícil observação de aumento em resposta à estimulação β 3-adrenérgica. Entretanto, não é possível descartar mecanismos pós-traducionais em regular a expressão de UCP-1 em resposta à liraglutida ou mesmo ao agonista β 3-adrenérgico, considerando o aumento mais acentuado da expressão proteica da UCP1 frente a estes tratamentos.

No TAB, foi observado aumento dos níveis de *Ucp1* em resposta ao tratamento com liraglutida, mais acentuado no depósito subcutâneo em relação ao visceral. O agonista β 3-adrenérgico promoveu acentuada indução da expressão deste transcrito e, interessantemente, pareceu haver efeito sinérgico da liraglutida e do agonista β 3-adrenérgico, uma vez que o efeito do co-tratamento sobre a indução de *Ucp1* foi superior à adição dos efeitos individuais da liraglutida e do agonista β 3-adrenérgico. Resultado semelhante foi observado quando se analisou a expressão proteica da UCP1.

O significado funcional do aumento da expressão da UCP1 foi investigado pela determinação do consumo de oxigênio em cada um destes três depósitos (TAM, TAB subcutâneo e TAB visceral). Os dados foram consistentes com os de expressão de UCP1, indicando aumento do consumo de oxigênio tecidual nos três tecidos quando se associou o tratamento com liraglutida ao agonista β 3-adrenérgico. Estudos anteriores mostraram que o tratamento com a liraglutida (110) e com CL316,243 (111), isoladamente, resultaram em aumento do consumo de oxigênio, avaliado por calorimetria. No presente estudo, o consumo de oxigênio foi avaliado diretamente no tecido adiposo e representa, possivelmente, medida direta do aumento da termogênese adaptativa em resposta aos tratamentos citados.

Estudos prévios exploraram, ainda, os possíveis mecanismos envolvidos no efeito da sinalização pelo GLP1 em promover aumento da termogênese adaptativa. Beiroa e cols (2014) (12) observaram que a liraglutida aumenta a atividade termogênica do TAM e promove amarronzamento do TAB por reduzir a atividade hipotalâmica da AMPK (mais especificamente, no núcleo ventromedial) o que, por sua vez, aumenta o tônus simpático. Segundo este estudo, a sinalização central pelo GLP-1R resultaria em aumento da atividade simpática e, assim, indução da atividade termogênica do adipócito marrom e bege. Entretanto, este mesmo estudo não descreveu dados que descartassem a possibilidade de efeitos periféricos da liraglutida, uma vez que não comparou a administração central com a periférica. Assim, existe a possibilidade de efeito periférico, diretamente no tecido adiposo, já que há estudos que indicam a presença do GLP-1R no tecido adiposo (112). No nosso estudo, não há também como diferenciar efeito central de periférico, visto que a administração periférica da liraglutida, via intraperitoneal, é capaz de ativar o GLP-1R hipotalâmico (110). Para investigar esta hipótese, seria necessário conduzir o estudo em cenário de deservação do tecido adiposo ou inibição central da AMPK, o que não foi realizado. Entretanto, um aspecto que sugere que possa ter havido efeito não mediado pelo aumento do tônus simpático, por mecanismo central, foi o efeito sinérgico da liraglutida e do agonista β 3-adrenérgico em promover aumento da expressão da UCP1 (RNA mensageiro e proteína) e aumento do consumo de oxigênio no TAB inguinal, no presente estudo. Se o efeito da liraglutida se devesse ao aumento do tônus simpático, a princípio não seria esperado efeito sinérgico com o CL316,243, que ativa, possivelmente de modo suprafisiológico, os receptores β 3-adrenérgicos. Em consistência com a possibilidade de efeito suprafisiológico do CL316,243, no estudo de Beiroa e cols (2014), a administração intracerebroventricular da liraglutida, via aumento do tônus simpático, promoveu aumento médio da expressão de Ucp1 de 3 vezes no TAB inguinal e de 1,5 vez no TAM (12).

Pazos et al (2015)(113) observaram que a exposição de camundongos C57Bl/6, alimentados com dieta normolipídica, ao frio (4°C) durante 5 dias (o período de administração do agonista no presente estudo) aumentou a expressão do mRNA da UCP1 no tecido adiposo branco inguinal apenas 2 vezes. O presente estudo avaliou camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, que está associada a aumento da expressão da UCP1, diferentemente do estudo de Pazos. Apesar

desta diferença, os diferentes níveis de indução da expressão da UCP1 nos dois estudos podem indicar que o uso do agonista represente um modelo de ativação suprafisiológica da sinalização beta 3 no tecido adiposo, o que reforça o argumento de que o efeito aditivo da liraglutida e do agonista β 3-adrenérgico não seria esperado caso o efeito da sinalização pelo GLP1-R fosse resultado exclusivamente de sua ação em promover aumento do tônus simpático.

Outros dados que sugerem a importância da sinalização pelo GLP1-R adipocitário na fisiologia deste tipo celular são aqueles provenientes dos estudos em cultura de células. Segundo Challa et al (2012) (86), o GLP-1 representa sinal derivado do intestino que induz a formação de adipócitos tanto em cultura de células (células 3T3-L1) como *in vivo* (camundongos machos C57Bl/6). O GLP-1 e a liraglutida ativam o GLP-1R, promovendo a proliferação de pré-adipócitos e inibindo a apoptose destes (86). Yang e colaboradores (2013) examinaram o efeito do GLP-1 na diferenciação de pré-adipócitos e seus mecanismos (114). Observaram que o GLP-1 elevou os níveis de expressão proteica da proteína 4 de ligação de ácidos graxos livres (aP2) e PPAR- γ , de forma dose-dependente durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, sugerindo que o GLP-1 induz a diferenciação de pré-adipócitos. No presente estudo, observamos efeito adipogênico da liraglutida somente em um cenário de adipogênese em cultura, o de pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar na presença de insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina.

Alguns mecanismos diferentes já foram implicados no efeito da sinalização pelo GLP-1 em promover o aumento da termogênese nos adipócitos marrom e bege. Além da ação de reduzir a atividade da AMPK hipotalâmica e, assim, aumentar o tônus simpático, descrita anteriormente (12), foi observado que a liraglutida induz a expressão de FGF21 por células T citotóxicas naturais invariáveis (células iNKT) no tecido adiposo branco, o que induz seu amarronzamento (115). Foi descrito, ainda, que a exenatida, outro análogo do GLP-1, promove amarronzamento do tecido adiposo por mecanismo dependente da sirtuína (116). Uma via importante para indução do amarronzamento do TAB e da termogênese no TAB e TAM envolve a ação hormônio tireoidiano (HT) no adipócito, efeito não investigado até este momento, para nosso conhecimento. Para explorar este aspecto, avaliamos a expressão dos transcritos dos genes que codificam a deiodinase tipo 2 (D2), dos transportadores de HT MCT8 e MCT10 e das isoformas alfa e beta dos receptores de HT.

A D2 desempenha um importante papel no desenvolvimento do tecido adiposo, na termogênese e na lipogênese. O estímulo adrenérgico aumenta a expressão de D2 no TAM, o que resulta em um aumento de T3 nesse tecido e estímulo à termogênese (117). As duas isoformas do receptor do HT também desempenham um papel importante na termogênese do tecido adiposo, embora por mecanismos diferentes. A isoforma alfa está implicada no aumento da produção de calor em resposta às catecolaminas, ao passo que a beta medeia o aumento da expressão do gene da que codifica a UCP1 (118). O metabolismo e a ação do HT são eventos intracelulares que requerem seu transporte através da membrana plasmática. Embora assumido por um longo tempo que isso ocorresse por difusão passiva, hoje está claro que a absorção celular e o fluxo de HT é mediado por proteínas transportadoras. Recentemente, vários transportadores específicos foram identificados, incluindo o transportador de monocarboxilato 8 (MCT8), MCT10 e polipeptídeo de transporte de ânions orgânicos 1C1 (OATP1C1). O último é expresso predominantemente em capilares do cérebro e transporta preferencialmente T4, enquanto MCT8 e MCT10 são expressos em múltiplos tecidos e são capazes de transportar diferentes iodotironinas (119).

Estudos têm mostrado que a noradrenalina induz rapidamente o aumento do AMPc no TAM, ativando a lipólise, a produção de calor e aumentando a conversão de T4 em T3 via D2 (120). No presente estudo, quando os animais foram tratados com o agonista β 3-adrenérgico isoladamente ou em associação com a liraglutida observamos aumento significativo da expressão do gene da D2 no TAM e no TAB, sobretudo inguinal. Neste último depósito, inclusive, foi observado efeito aditivo da liraglutida e agonista β 3-adrenérgico em aumentar a expressão de *Dio2*. O dados obtidos no TAB subcutâneo foram semelhantes aos observados em relação ao gene da UCP1, o que pode ser considerado esperado uma vez que a D2 é considerada um marcador termogênico geral (117), induzido no frio.

A avaliação da expressão dos transportadores de HT, MCT8 e MCT10, e das isoformas do receptor de HT, alfa e beta, evidenciou comportamento diferente entre os depósitos de tecido adiposo, em resposta à sinalização β 3-adrenérgica e à liraglutida. No TAM, o tratamento com agonista β 3-adrenérgico aumentou a expressão de MCT8 e não modificou a expressão das isoformas de TR. Estes achados, em conjunto com o aumento da expressão de *Dio2* em resposta ao CL316,243, podem

sugerir que a sinalização β 3-adrenérgica promova aumento do conteúdo intracelular de T3 por aumentar o transporte de HT e a ativação intracelular do hormônio.

A liraglutida também aumentou a expressão de MCT8 e, ainda, de *Thrb*, mas não de *Thra*, e não foi observada mudança significativa da expressão destes transcritos em resposta ao co-tratamento com liraglutida e o agonista beta 3, quando comparado com o tratamento isolado com cada um deles. Estes dados sugerem que a liraglutida também possa contribuir para o aumento do conteúdo intracelular de HT, por promover seu transporte para o meio intracelular e ativação intracelular de T4 em T3 (via aumento de *Dio2*), além de, talvez, promover aumento da sinalização pelo TR beta. Estes dados, contudo, precisam ser interpretados com restrição considerando que no presente estudo foram analisados somente os transcritos dos genes que codificam estas proteínas.

No tecido adiposo branco inguinal, foi observado que a sinalização β 3-adrenérgica aumentou a expressão do transcrito da D2, mas não modificou a expressão de MCT8 ou das isoformas do receptor do HT. A liraglutida, diferentemente, induziu de forma menos acentuada a expressão de *Dio2*, porém aumentou significativamente a expressão do transcrito do MCT8 e, de forma menos acentuada, do TR alfa. Estes dados sugerem que a liraglutida possa aumentar a ação do HT no adipócito inguinal por promover seu transporte para o meio intracelular, a ativação do T4 em T3 e, talvez, o aumento da sinalização pelo TR alfa, que está envolvido na resposta do tecido às catecolaminas. O co-tratamento pareceu ter efeito sinérgico sobre a indução de *Dio2*, porém pareceu reduzir a expressão do transcrito de ambas as isoformas do TR, à semelhança do efeito do agonista β 3-adrenérgico isoladamente, o que enfraquece a hipótese de que a liraglutida tenha aumentado a resposta às catecolaminas por promover aumento da expressão do TR alfa. Ainda assim, o efeito da liraglutida em promover indução da expressão do transcrito do MCT8 poderia promover aumento do conteúdo intracelular de HT no adipócito inguinal e isto, por sua vez, explicar o efeito sinérgico do co-tratamento sobre a expressão da UCP1, uma vez que o promotor da UCP1 apresenta elemento de resposta ao T3 (51), porém esta hipótese precisaria ser confirmada por outros experimentos, uma vez que no presente estudo foram observados apenas os níveis transcritos dos genes que codificam estas proteínas.

Efeitos semelhantes aos observados no TAB inguinal foram observados no TAB epididimal, embora com menor intensidade. Interessantemente, neste depósito foi observada redução da expressão de TR alfa em resposta ao agonista β 3-adrenérgico. Considerando que esta isoforma do receptor de HT está implicada na resposta dos tecidos às catecolaminas (118), é possível especular que a diminuição da expressão do receptor poderia estar relacionada a algum mecanismo de diminuir esta sinalização, desencadeado pela própria ativação do receptor.

Nossos achados sugerem que o tratamento com liraglutida induz o amarronzamento de TAB e aumenta a capacidade termogênica do TAB e do TAM, através de um mecanismo que pode envolver o aumento da ativação do hormônio tireoidiano no TAM. Além disso, os efeitos da liraglutida sobre a expressão de Ucp1 e o consumo de oxigênio foram aditivos aos da sinalização β 3-adrenérgica, uma via clássica de ativação da termogênese adaptativa. Isso sugere que os agonistas dos receptores de GLP-1 podem aumentar o gasto de energia ativando adipócitos termogênicos e abrindo novos horizontes para o tratamento da obesidade.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que, em camundongos C57Bl/6 com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o tratamento com liraglutida:

- Induziu perda de peso, menor ingestão de energia e redução da eficiência calórica, acentuados na presença de ativação β 3-adrenérgica;
- Resultou em tendência de redução da massa adiposa branca visceral e subcutânea, acentuada na presença de ativação β 3-adrenérgica;
- Não alterou as massas cardíaca e renal;
- Resultou em tendência de redução da glicemia no tratamento com a liraglutida, acentuada na presença de ativação β 3-adrenérgica;
- Aumentou a expressão do RNAm do gene que codifica a proteína UCP-1 no tecido adiposo branco inguinal e epididimal, e no tecido adiposo branco epididimal o efeito foi acentuado na presença de ativação β 3-adrenérgica;
- Aumentou a expressão proteica de UCP1 no tecido adiposo marrom interescapular e branco inguinal e epididimal, efeito acentuado na presença de ativação β 3-adrenérgica
- Aumentou o consumo de oxigênio tecidual induzido pela na presença de ativação β 3-adrenérgica no tecido adiposo marrom, branco inguinal e branco epididimal;
- Aumentou a expressão do RNAm dos genes que codificam o transportador de hormônio tireoidiano MCT10, desidrinase tipo 2 e receptor beta do hormônio tireoidiano no tecido adiposo marrom, sugerindo aumento do conteúdo e atividade do hormônio tireoidiano neste depósito;
- Aumentou a expressão do RNAm do gene que codifica o MCT8 no tecido adiposo branco inguinal, e de forma menos acentuada a expressão do RNAm dos genes que codificam a desidrinase tipo 2 e o receptor alfa do hormônio tireoidiano, sugerindo aumento do conteúdo e atividade do hormônio neste depósito.

Em cultura de células, a liraglutida não apresentou efeito adipogênico em células mesenquimais C3H10T1/2 tanto na presença de meio de indução completo, contendo isometilbutilxantina, dexametasona e insulina, como na presença de meio de indução incompleto, contendo apenas insulina. Em pré-adipócitos 3T3-L1

induzidos a se diferenciar em adipócitos apresentou efeito adipogênico apenas na presença de meio de indução completo, contendo isometilbutilxantina, dexametasona e insulina.

8 REFERÊNCIAS

1. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017;377(1):13-27.
2. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;9:88.
3. de Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, Dieben SW, Helmerhorst FM. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(4):495-500.
4. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(1):96-105.
5. Okamatsu-Ogura Y, Fukano K, Tsubota A, Uozumi A, Terao A, Kimura K, et al. Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One*. 2013;8(12):e84229.
6. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
7. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526-31.
8. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*. 2009;360(15):1509-17.
9. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
10. Hayes MR. Neuronal and intracellular signaling pathways mediating GLP-1 energy balance and glycemic effects. *Physiol Behav*. 2012;106(3):413-6.
11. Lockie SH. Glucagon-like peptide-1 receptor in the brain: role in neuroendocrine control of energy metabolism and treatment target for obesity. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(7):597-604.
12. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*. 2014;63(10):3346-58.

13. Nonogaki K, Hazama M, Satoh N. Liraglutide suppresses obesity and hyperglycemia associated with increases in hepatic fibroblast growth factor 21 production in KKAy mice. *Biomed Res Int.* 2014;2014:751930.
14. Masuda T, Fu Y, Eguchi A, Czogalla J, Rose MA, Kuczkowski A, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor lowers PPAR γ agonist-induced body weight gain by affecting food intake, fat mass, and beige/brown fat but not fluid retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(4):E388-98.
15. WHO, WORLD, ORGANIZATION H. Obesity www.who.int/topics/obesity/en/: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2017 [
16. WHO, World, Organization H. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
17. WHO, WORLD, ORGANIZATION H. Obesity and overweight www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2017 [
18. 2016 VB. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/vigitel.pdf: Vigitel Brasil; 2016 [
19. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science.* 1987;237(4813):405-8.
20. Dhurandhar EJ, Keith SW. The aetiology of obesity beyond eating more and exercising less. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(4):533-44.
21. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J.* 2009;276(20):5747-54.
22. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011;32(7):307-14.
23. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab.* 2014;20(1):103-18.
24. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6778):635-43.
25. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA.* 2003;289(1):76-9.

26. Burgio E, Lopomo A, Migliore L. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. *Molecular biology reports*. 2015;42(4):799-818.
27. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, Association AH, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.
28. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
29. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* (London, England). 2005;366(9492):1197-209.
30. Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2011;29(7):1034-40.
31. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
32. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(11):4401-6.
33. Seale P. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *International journal of obesity* (2005). 2010;34 Suppl 1:S17-22.
34. Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development. *Cell metabolism*. 2010;11(4):257-62.
35. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961-7.
36. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*. 2006;4(4):263-73.
37. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes & development*. 2002;16(1):22-6.
38. Salma N, Xiao H, Imbalzano AN. Temporal recruitment of CCAAT/enhancer-binding proteins to early and late adipogenic promoters in vivo. *Journal of molecular endocrinology*. 2006;36(1):139-51.
39. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*. 2001;106(5):563-73.

40. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
41. Christian M, Parker MG. The engineering of brown fat. *Journal of molecular cell biology*. 2010;2(1):23-5.
42. Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, et al. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism: clinical and experimental*. 1992;41(11):1242-8.
43. Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2003;19(5):457-66.
44. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2094-101.
45. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(3):269-84.
46. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(2):85-97.
47. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004;84(1):277-359.
48. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. 1983;305(5936):712-3.
49. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006;439(7075):484-9.
50. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(1):24-36.
51. Weiner J, Kranz M, Klötting N, Kunath A, Steinhoff K, Rijntjes E, et al. Thyroid hormone status defines brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissues in mice. *Sci Rep*. 2016;6:38124.
52. Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(10):582-91.
53. Vaitkus JA, Farrar JS, Celi FS. Thyroid Hormone Mediated Modulation of Energy Expenditure. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16158-75.
54. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;287(2):E199-206.

55. Vilsboll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2004;47(3):357-66.
56. Fujita Y, Wideman RD, Asadi A, Yang GK, Baker R, Webber T, et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide is expressed in pancreatic islet alpha-cells and promotes insulin secretion. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1966-75.
57. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006;3(3):153-65.
58. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell metabolism*. 2013;17(6):819-37.
59. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*. 2007;87(4):1409-39.
60. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):24-32.
61. Holz GG. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*. 2004;53(1):5-13.
62. Frimurer TM, Bywater RP. Structure of the integral membrane domain of the GLP1 receptor. *Proteins*. 1999;35(4):375-86.
63. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(12):728-42.
64. WHO. Diabetes <http://www.who.int/diabetes/en/>: World Health Organization; 2018 [
65. WHO. Diabetes: fact sheet <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>: World Health Organization; 2018 [updated November 2017.
66. Tamez-Perez HE, Proskauer-Pena SL, Hernandez-Coria MI, Garber AJ. AACE Comprehensive Diabetes Management Algorithm 2013. *Endocrine Practice*. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2013;19(4):736-7.
67. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. AACE comprehensive diabetes management algorithm 2013. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2013;19(2):327-36.
68. Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Clinical utility of insulin and insulin analogs. *Islets*. 2013;5(2):67-78.
69. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2014;30(5):354-71.

70. Tong J, Sandoval DA. Is the GLP-1 system a viable therapeutic target for weight reduction? *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2011;12(3):187-95.
71. Madsbad S, Kielgast U, Asmar M, Deacon CF, Torekov SS, Holst JJ. An overview of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists--available efficacy and safety data and perspectives for the future. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13(5):394-407.
72. Iepsen EW, Torekov SS, Holst JJ. Therapies for inter-relating diabetes and obesity - GLP-1 and obesity. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2014;15(17):2487-500.
73. Deacon CF. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition with sitagliptin: a new therapy for type 2 diabetes. *Expert opinion on investigational drugs*. 2007;16(4):533-45.
74. Deacon CF, Mannucci E, Ahren B. Glycaemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes-a review and meta analysis. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012;14(8):762-7.
75. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008;57(5):1340-8.
76. Astrup A, Rossner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet (London, England)*. 2009;374(9701):1606-16.
77. Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology*. 2011;152(8):3103-12.
78. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *The New England journal of medicine*. 2015;373(1):11-22.
79. (CONCEA) CNdCdEA, Ministério da Ciência Tel. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos. In: Ministério da Ciência Tel, editor. 2013.
80. Conselho, (CONCEA) NdCdEA. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. In: Ministério, da Ciência Tel, editors. 2013.
81. CFMV. Guia de Boas Práticas para Eutanásia de Animais: Conceitos e procedimentos recomendados In: Conselho, Veterinária FdM, editors. 2013.
82. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

83. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3(2):127-33.
84. Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 1980;255(10):4745-50.
85. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2005;40(4):229-42.
86. Challa TD, Beaton N, Arnold M, Rudofsky G, Langhans W, Wolfrum C. Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(9):6421-30.
87. Heppner KM. Contribution of brown adipose tissue activity to the control of energy balance by GLP-1 receptor signalling in mice. 2015;58(9):2124-32.
88. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med*. 2015;373(1):11-22.
89. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557-66.
90. Bundhun PK, Janoo G, Teeluck AR, Huang F. Adverse drug effects observed with vildagliptin versus pioglitazone or rosiglitazone in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017;18(1):66.
91. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34268-76.
92. Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A, et al. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J*. 2011;25(8):2538-50.
93. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(4):E745-52.
94. Astrup A, Rössner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2009;374(9701):1606-16.
95. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(1):471-8.

96. Thrasher J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. *Am J Med.* 2017;130(6S):S4-S17.
97. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, et al. Brain PPAR- γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med.* 2011;17(5):618-22.
98. Joosen AM, Bakker AH, Gering MJ, Westerterp KR. The effect of the PPAR γ ligand rosiglitazone on energy balance regulation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006;22(3):204-10.
99. Lutz TA. Gut hormones such as amylin and GLP-1 in the control of eating and energy expenditure. *Int J Obes Suppl.* 2016;6(Suppl 1):S15-S21.
100. Potts JE, Gray LJ, Brady EM, Khunti K, Davies MJ, Bodicoat DH. The Effect of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists on Weight Loss in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Mixed Treatment Comparison Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0126769.
101. Schlögl M, Piaggi P, Pannacciuli N, Bonfiglio SM, Krakoff J, Thearle MS. Energy Expenditure Responses to Fasting and Overfeeding Identify Phenotypes Associated With Weight Change. *Diabetes.* 2015;64(11):3680-9.
102. Heeren J, Münzberg H. Novel aspects of brown adipose tissue biology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(1):89-107.
103. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3395-403.
104. Souza CJd, Hirshman MF, Horton ES. CL-316,243, a β 3 -Specific Adrenoceptor Agonist,
Enhances Insulini-Stimulated Glucose Disposal in
Nonobese Rats. *DIABETES.* 1997;46:1257-63.
105. Coman OA, Păunescu H, Ghiță I, Coman L, Bădărăru A, Fulga I. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50(2):169-79.
106. Yoshida T, Safane N, Wakabayashi Y, Umekawa T, Kondo M. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific β 3 -adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sciences;* 1994. p. 491-8.
107. Pepler WT, Miotto PM, Holloway GP, Wright DC. CL 316, 243 mediated reductions in blood glucose are enhanced in RIP140 $^{-/-}$ mice independent of alterations in lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(2):486-91.
108. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol.* 1994;266(4 Pt 2):R1371-82.

109. Warner A, Kjellstedt A, Carreras A, Böttcher G, Peng XR, Seale P, et al. Activation of β 3-adrenoceptors increases in vivo free fatty acid uptake and utilization in brown but not white fat depots in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):E901-E10.
110. Heppner KM, Marks S, Holland J, Ottaway N, Smiley D, Dimarchi R, et al. Contribution of brown adipose tissue activity to the control of energy balance by GLP-1 receptor signalling in mice. *Diabetologia*. 2015;58(9):2124-32.
111. Inokuma K, Okamatsu-Ogura Y, Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Yamashita H, et al. Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of beta3-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(5):E1014-21.
112. Vendrell J, El Bekay R, Peral B, García-Fuentes E, Megia A, Macias-Gonzalez M, et al. Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance. *Endocrinology*. 2011;152(11):4072-9.
113. Pazos P, Lima L, Tovar S, González-Touceda D, Diéguez C, García MC. Divergent responses to thermogenic stimuli in BAT and subcutaneous adipose tissue from interleukin 18 and interleukin 18 receptor 1-deficient mice. *Sci Rep*. 2015;5:17977.
114. Yang J, Ren J, Song J, Liu F, Wu C, Wang X, et al. Glucagon-like peptide 1 regulates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Int J Mol Med*. 2013;31(6):1429-35.
115. Lynch L, Hogan AE, Duquette D, Lester C, Banks A, LeClair K, et al. iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. *Cell Metab*. 2016;24(3):510-9.
116. Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, et al. GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*. 2016;59(5):1059-69.
117. Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*. 2008;18(2):185-95.
118. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest*. 2001;108(1):97-105.
119. Heuer H, Visser TJ. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*. 2009;150(3):1078-83.
120. Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(4):570-90.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de abril de 2015.



DECLARAÇÃO (ADENDO)

Declaramos que o adendo ao projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA INCRETÍNICO SOBRE O RECRUTAMENTO DE ADIPÓCITOS BEGE.", UnBDoC n.º 112635/2014, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este adendo foi aprovado para utilização de Mus musculus espécie C57Bl/6: 15. A presente aprovação é válida pelo período de 10/10/2014 a 01/08/2017.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

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