

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

JANAINA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DO GQ-16, UM AGONISTA PARCIAL DO RECEPTOR GAMA
ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS, SOBRE A
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TERMOGÊNESE NO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

BRASÍLIA

2014

JANAINA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DO GQ-16, UM AGONISTA PARCIAL DO RECEPTOR GAMA
ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS, SOBRE A
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TERMOGÊNESE NO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

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

BRASÍLIA
2014

JANAINA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DO GQ-16, UM AGONISTA PARCIAL DO RECEPTOR GAMA
ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS, SOBRE A
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TERMOGÊNESE NO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Dissertação apresentada e aprovada no dia 08/12/2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Angélica Amorin Amato - Presidente
Universidade de Brasília/UNB

Profa. Dra. Michella Soares Coêlho
Universidade de Brasília/UNB

Profa. Dra. Monalisa Ferreira Azevedo
Universidade de Brasília/UNB

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos
Universidade de Brasília/UNB

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília/UNB

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Dedico...

Ao Gelben, pelo amor, carinho e incentivo, por acreditar em mim e por estar ao meu lado sempre.

À Laura, nosso “presentinho” de Deus, que nos ensina diariamente o significado da palavra amor.

À minha mãe Luzinete e irmãs Josiane e Jordane, pelo amor incondicional e por sempre estarmos juntas.

À minha avó Geralda (in memoriam), que durante toda sua vida me apoiou e que hoje com certeza vibraria com mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Angélica, toda gratidão, admiração e respeito. Agradeço por ter me dado a oportunidade de concluir a pós-graduação. Agradeço pela oportunidade de convívio, pelos exemplos de sabedoria, humildade e generosidade.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Michella pelo exemplo de dedicação e pela oportunidade de aprendizado.

À minha amiga Flora por ter me introduzido neste mundo maravilhoso das pesquisas e por ter me incentivado sempre.

Ao Luiz Casseiro, pelo apoio e compreensão durante estes anos.

Às bibliotecárias da Rede Sarah Brasília pela valiosa ajuda durante a realização do mestrado.

RESUMO

Os adipócitos bege compreendem um tipo celular único em roedores e em humanos que, à semelhança do adipócito marrom, expressam a proteína desacopladora tipo 1 (UCP1), são capazes de executar a termogênese quando apropriadamente estimulado. Além de conferir proteção contra hipotermia, são considerados críticos para a homeostase energética. Foi demonstrado que a ativação do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) por agonistas completos, como as tiazolidinedionas (TZDs), mas não por agonistas parciais, induz o aparecimento de adipócitos UCP1-positivos no tecido adiposo branco, um processo denominado amarronzamento do tecido adiposo. Entretanto, os agonistas completos do PPAR γ estão associados a uma variedade de efeitos adversos, incluindo o ganho de peso. Neste estudo, investigamos os efeitos de um agonista parcial do PPAR γ , o GQ-16, sobre variáveis metabólicas e sobre a expressão, no tecido adiposo branco, de genes relacionados à termogênese e de genes seletivos do adipócito bege. Camundongos Swiss machos com obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica foram tratados com 5, 10, 20 ou 40 mg/kg/d de GQ-16, durante 14 dias. Observou-se que o tratamento com as doses de 20 e 40 mg/kg/d induziu menor ganho de peso em resposta à dieta hiperlipídica e redução da massa adiposa epididimal a despeito de aumento da ingestão de energia. No tecido adiposo epididimal (visceral), foi observado aumento da expressão dos genes que codificam a UCP1 e a CIDEA, proteínas relacionadas à termogênese. No tecido adiposo inguinal (subcutâneo), foi observado aumento da expressão dos genes que codificam a TMEM26 e o CD40, que representam marcadores seletivos do adipócito bege. Estes achados indicam o amarronzamento do tecido adiposo branco em resposta ao tratamento com um agonista parcial de PPAR γ e sugerem que a modulação da atividade do receptor com ligantes com esta característica possa representar uma estratégia para induzir o fenótipo termogênico do tecido adiposo branco e, assim, tratar a obesidade e as doenças a ela associadas.

Palavras-chave: receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais; GQ-16; obesidade; proteína desacopladora tipo 1.

ABSTRACT

Beige adipocytes comprise a unique cell type in both rodents and humans. They are fully capable of expressing uncoupling protein 1 (UCP1) and executing thermogenesis upon appropriate stimulation, and play a critical role in energy homeostasis. Full PPAR γ activation by agonists such as thiazolidinediones has been shown to drive the appearance of UCP1-positive cells of white fat, a process so-called browning of white adipose tissue. However, full PPAR γ activation is associated with a number of adverse effects, including weight gain. Partial PPAR γ agonists, that typically do not induce weight gain, have not been shown to induce browning of white adipose tissue. In this study, we investigated the effects of a partial PPAR γ agonist, GQ-16, on metabolic parameters and on the expression of thermogenesis-related and beige-selective genes in white adipose tissue. Male Swiss mice with high fat induced obesity and hyperglycemia were treated with GQ-16 (5, 10, 20 or 40 mg/kg/d) during 14 days. We observed that treatment with the highest doses (20 and 40 mg/kg/d) of GQ-16 reduced high fat diet induced weight gain and reduced epididymal fat mass despite increasing energy intake. We also found increased expression of thermogenesis-related genes (*Ucp1* and *Cidea*) in epididymal (visceral) white adipose tissue and increased expression of beige-selective genes (*Tmem26* and *Cd40*) in inguinal (subcutaneous) adipose tissue. These findings indicate browning of white adipose tissue in response to a partial PPAR γ agonist and suggest that these types of agonists may represent an effective strategy to induce the thermogenic phenotype in white adipose tissue and possibly treat obesity.

Keywords: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; GQ-16; obesity; uncoupling protein-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do tecido adiposo marrom.

Figura 2. Regulação transcricional da diferenciação e função do adipócito marrom.

Figura 3. Estrutura dos receptores nucleares.

Figura 4. Estrutura química do GQ-16, em comparação com a das TZDs rosiglitazona e pioglitazona.

Figura 5. O GQ-16 é um agonista parcial do PPAR γ com baixa atividade adipogênica em cultura.

Figura 6. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica, estudo 1.

Figura 7. Glicemia em jejum dos camundongos alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica, estudo 1.

Figura 8. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica, estudo 2.

Figura 9. Glicemia em jejum dos camundongos alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica, estudo 2.

Figura 10. Ganho de peso após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 11. Glicemia de jejum após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 12. Massa adiposa epididimal (A) e do depósito de tecido adiposo marrom interescapular (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 13. Ingestão de energia (A) e ingestão hídrica (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 14. Concentração circulante de aspartato aminotransferase (A) e alanina aminotransferase (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos

alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 15. Ganho de peso em resposta ao tratamento com GQ-16.

Figura 16. Glicemia em jejum, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 17. Energia ingerida, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou dieta hiperlipídica (tratados com veículo, RSG ou GQ-16).

Figura 18. Massa adiposa epididimal em resposta ao tratamento com GQ-16.

Figura 19. Massa do depósito de tecido adiposo marrom interescapular em resposta ao tratamento com GQ-16.

Figura 20. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo marrom interescapular.

Figura 21. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco epididimal, estudo 1.

Figura 22. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco inguinal, estudo 1.

Figura 23. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco epididimal, estudo 2.

Figura 24. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco inguinal, estudo 2.

Figura 25. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco epididimal, estudo 1.

Figura 26. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco inguinal, estudo 1.

Figura 27. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco epididimal, estudo 2.

Figura 28. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco inguinal, estudo 2.

Figura 29. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular.

Figura 30. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo branco epididimal.

Figura 31. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo branco inguinal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos componentes das dietas controle e hiperlipídica.

Tabela 2. Reagentes da reação em cadeia de polimerase e suas respectivas quantidades.

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CD40	Antígeno de grupamento de diferenciação 40, <i>cluster of differentiation 40</i>
CIDEA	Fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor A semelhante à subunidade alfa
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DHL	Dieta hiperlipídica
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
EPM	Erro padrão da média
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
LBD	Domínio de ligação ao ligante
Myf5	Fator miogênico 5
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PPAR	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PRDM16	Proteína 16 contendo o domínio PR
RN	Receptores nucleares
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RSG	Rosiglitazona
RXR	Receptor retinoide X
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TMEM26	Proteína transmembrana 26
TZD	Tiazolidinedionas
UCP1	Proteína desacopladora tipo 1, <i>uncoupling protein 1</i>

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Tecido adiposo marrom</i>	18
2.2 <i>Adipócito bege</i>	21
2.3 <i>Receptores ativados por proliferadores peroxissomais</i>	22
2.3.1 <i>Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais</i>	25
2.4 <i>GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina</i> <i>-2,4diona)</i>	28
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 <i>Objetivo geral</i>	32
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	32
4 MÉTODOS	33
4.1 <i>Considerações éticas</i>	33
4.2 <i>Modelo animal</i>	33
4.3 <i>Desenho experimental</i>	33
4.3.1 <i>Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16</i>	34
4.3.2 <i>Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16</i>	35

4.3.3 Procedimentos	35
4.4 Isolamento de RNA total	36
4.4.1 Tratamento do RNA com DNase	37
4.4.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra ...	37
4.4.3 Avaliação da integridade do RNA	37
4.5 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativa	38
4.6 Análise Estatística	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Indução de ganho de massa corporal e hiperglicemia por dieta hiperlipídica	41
5.2 Efeitos do GQ-16 sobre o peso corporal, glicemia, adiposidade, ingestão hídrica e de energia e concentração circulante de transaminases	43
5.2.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16	43
5.2.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16	47
5.3 Efeitos do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo	51
5.3.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16	51
5.3.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16	52
5.4 Efeitos do GQ-16 sobre a expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo	53
5.4.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16	53
5.4.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16	54
5.5 Efeitos do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo.	56
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	70

1 INTRODUÇÃO

A obesidade e o diabetes tipo 2 (DM2) constituem importantes problemas de saúde pública em todo o mundo. O aumento rapidamente progressivo da incidência de DM2 e o risco de morbimortalidade relacionados às suas complicações vasculares crônicas representam grandes desafios sociais e econômicos ¹. Neste contexto, a identificação do tecido adiposo como um regulador chave da homeostase energética tornou este tipo celular um importante foco de interesse para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças metabólicas.

O tecido adiposo é tradicionalmente classificado em branco e marrom. O tecido adiposo branco é um órgão endócrino reconhecido por sua capacidade de armazenar energia química na forma de triglicerídeos, ao passo que o tecido adiposo marrom, embora compartilhe a capacidade de sintetizar e armazenar lipídeos, é especializado em dissipar energia na forma de calor, por ação da proteína desacopladora tipo 1 (UCP1), em um processo denominado termogênese adaptativa. Até recentemente, considerava-se que humanos adultos apresentavam tecido adiposo marrom apenas vestigial. Entretanto, a presença de tecido adiposo marrom funcional foi demonstrada, de forma inequívoca, em humanos adultos, por meio de técnicas de imagem funcional, e pela análise da expressão da proteína UCP1 ²⁻⁴. Além disso, a quantidade de tecido adiposo marrom assim determinada foi correlacionada com indicadores de saúde metabólica, como menor glicemia de jejum e menor índice de massa corporal ^{2,3}. Um terceiro tipo de adipócito, denominado adipócito bege, foi descrito inicialmente em roedores como um tipo celular recrutável no tecido adiposo branco, por um processo denominado amarronzamento do tecido adiposo branco. Essas células apresentam morfologia semelhante à do adipócito marrom, expressam marcadores de termogênese típicos do tecido adiposo marrom genuíno, como a UCP1, e apresentam capacidade termogênica plena quando estimuladas por condições como frio ou agonistas de receptores β 3-adrenérgicos ⁵. Consistentemente com sua capacidade termogênica, foi demonstrado que os adipócitos bege protegem camundongos contra obesidade induzida por dieta ^{6,7}.

Os adipócitos bege apresentam uma assinatura genética única, e foram identificados nas regiões cervical e interescapular de humanos adultos, localizações

em que apenas tecido adiposo marrom genuíno é observado em neonatos humanos⁶. De fato, foi demonstrado que humanos adultos apresentam depósitos de tecido adiposo com características de marrom e bege nestas localizações⁸⁻¹¹. Estes achados sugerem que os dados relativos à biologia dos adipócitos bege, observados em roedores, possam se aplicar também a humanos, e isso tornou este tipo de adipócito um alvo atraente para o tratamento da obesidade. Desta forma, tem havido um intenso esforço para se identificarem fatores capazes de induzir o aparecimento de adipócitos bege no tecido adiposo branco.

A ativação do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) por agonistas completos, como as tiazolidinadionas (TZD), induz o amarronzamento do tecido adiposo branco¹², por estabilização da proteína 16 que contém o domínio homólogo PRD1-BF-1-RIZ1 (PRMD16, *PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16*), um corregulador da transcrição envolvido também na diferenciação de adipócitos marrom genuínos a partir de precursores mioblásticos¹³. Embora recrutem adipócitos com fenótipo termogênico no tecido adiposo branco, as TZD não induzem perda ponderal. De fato, estas drogas induzem ganho de peso e seu uso clínico é limitado também por outros efeitos adversos, como retenção hídrica, perda de massa óssea, aumento do risco de eventos cardiovasculares (com a rosiglitazona, RSG) e possivelmente aumento do risco de câncer de bexiga (com a pioglitazona), como revisado anteriormente¹⁴. Agonistas parciais do PPAR γ , diferentemente, mantêm o efeito sensibilizador insulínico dos agonistas completos sem induzir ganho de peso, retenção hídrica e perda de massa óssea¹⁴. Entretanto, até o momento não foram descritos agonistas parciais capazes de promover amarronzamento do tecido adiposo branco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Dois tipos de tecido adiposo são tradicionalmente encontrados em mamíferos, o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom. Ambos compartilham a capacidade de armazenar lipídeos, porém diferem em relação a características morfológicas, moleculares e funcionais ¹⁵.

O tecido adiposo branco origina-se do mesoderma, é pobre em mitocôndrias e apresenta uma única gotícula lipídica, o que o confere a característica de unilocular. Embora tenha a função clássica de armazenar energia na forma de triglicerídeo, desempenha uma variedade de funções críticas para a homeostase metabólica, por meio da secreção de hormônios, citocinas e também de ácidos graxos (AG) livres ¹⁶.

2.1 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo marrom é mais facilmente encontrado em pequenos mamíferos e em humanos recém-nascidos, e é altamente especializado em dissipar energia na forma de calor. Sua função clássica é de manter a temperatura corporal, e recentemente tem sido implicado também na manutenção da homeostase energética ^{17,18}.

O adipócito marrom origina-se de uma linhagem celular que expressa o fator miogênico 5 (*Myf-5*), e que também dá origem ao músculo esquelético ¹⁹. Morfologicamente, caracteriza-se pela presença de múltiplas gotículas lipídicas e pela riqueza de mitocôndrias, que lhe conferem a coloração marrom ¹⁷. Sua função de dissipar energia química na forma de calor é resultado da atividade da UCP1, que medeia o desacoplamento do gradiente de prótons, gerado no processo de respiração mitocondrial (cadeia transportadora de elétrons), da síntese de ATP. Desta forma, a oxidação de AG e também de glicose é desviada da síntese de ATP para a produção de calor ¹⁷.

Quando os animais são submetidos ao frio, o sistema nervoso autônomo simpático é estimulado e libera catecolaminas, que irão se ligar ao receptor β 3-adrenérgico na membrana do adipócito marrom (Figura 1). A ativação do receptor

resulta em uma cascata de sinalização intracelular que envolve a ativação da adenilato ciclase e geração de adenosina 3',5'- monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. O aumento da concentração intracelular de AMPc aumenta a expressão da desidrodinase tipo 2, que catalisa a conversão de tetraiodotironina (T4) em triiodotironina (T3), ou ativação do hormônio tireoidiano. O T3, por sua vez, aumenta a expressão da UCP1, que medeia a produção de calor, ou termogênese. O AMPc também ativa as enzimas que promovem a lipólise, ou liberação de AG a partir do triglicerídeo nas gotículas lipídicas, que atuam como substratos para os processos oxidativos necessários à termogênese, e que também ativam a UCP1. Deste modo, a estimulação dos receptores β_3 adrenérgicos aumenta a expressão e a atividade de UCP-1, que proporcionará uma rápida oxidação dos AG e produção de calor ^{17,20}.

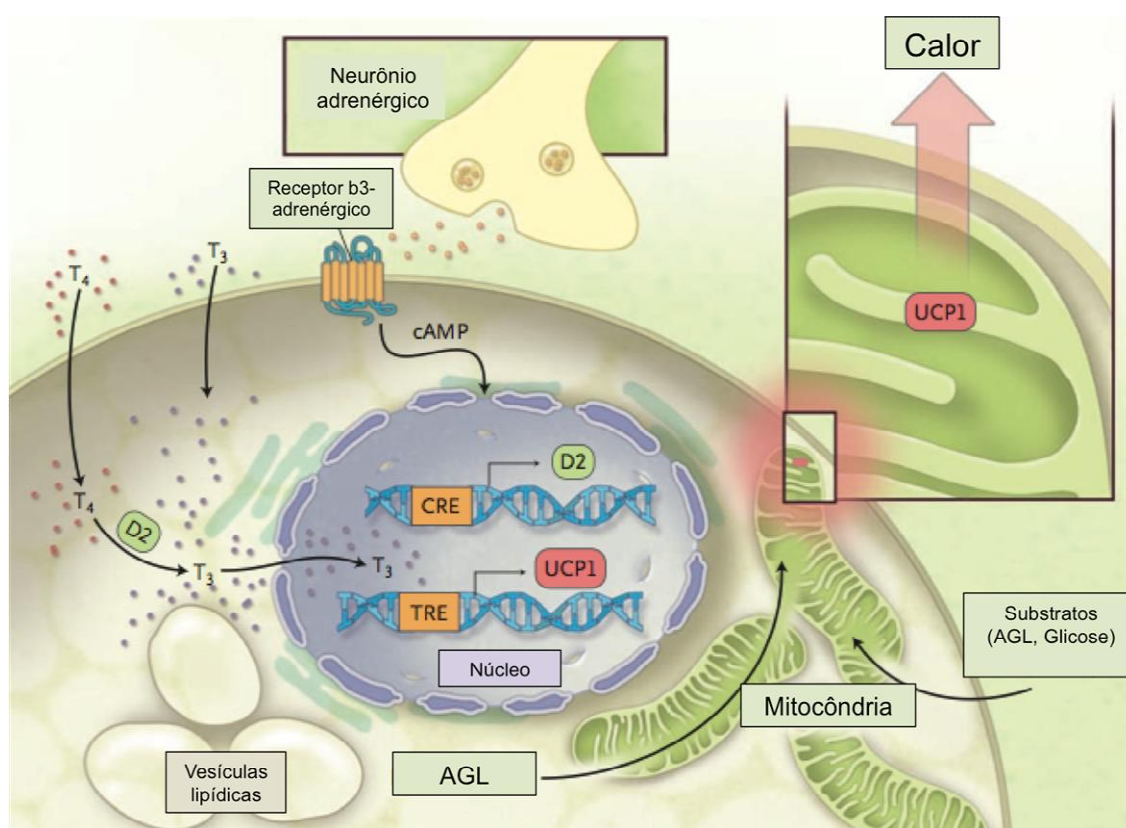


Figura 1. Ativação do tecido adiposo marrom. A estimulação dos receptores β_3 -adrenérgicos resulta em aumento da concentração intracelular de T3, por meio do aumento da expressão da desidrodinase tipo 2. O T3, por sua vez, estimula a expressão da UCP1, que desacopla o gradiente de prótons da cadeia transportadora de elétrons, na membrana mitocondrial interna, da síntese de ATP, dissipando energia na forma de calor. AMPc: AMP cíclico; CRE cAMP: elemento de resposta ao AMPc; T4: tetraiodotironina; T3: triiodotironina; TRE: elemento de resposta ao T3, AGL: ácidos graxos livres. Adaptado de Celi FS ²⁰.

A termogênese no tecido adiposo marrom, além de ser crítica para a resposta contra o frio, parece ser importante para a regulação da homeostase energética ²¹. Tem sido demonstrado que dietas hipercalóricas estimulam a termogênese no tecido adiposo marrom, mediada pela UCP1, sendo este processo considerado um mecanismo compensatório ao aumento do aporte energético, pela alimentação, para garantir a manutenção do peso corporal ²². Feldmann et al (2009) demonstraram a importância do tecido adiposo marrom para a homeostase energética por meio da avaliação do fenótipo de camundongos com deleção gene que codifica a UCP1. Foi observado que em condições de termoneutralidade (em que não são acionados mecanismos alternativos de termogênese ao que ocorre no tecido adiposo marrom) houve indução de obesidade em camundongos alimentados com dieta controle (normolipídica) e com dieta hiperlipídica, com resposta mais pronunciada neste último grupo ²³.

O desenvolvimento do adipócito marrom, a partir de seu precursor, envolve a ação de uma cascata de fatores transcricionais, entre os quais destacam-se o PPAR γ , membros da família das proteínas de ligação ao acentuador CCAAT ([C/EBPs (C/EBP α , C/EBP β e C/EBP δ)], o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PGC1 α) e a PRDM16 ^{24,25}, como apresentado esquematicamente na Figura 2.

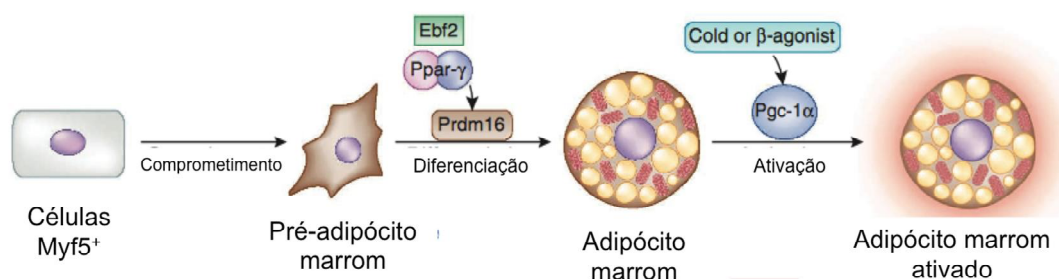


Figura 2. Regulação transcricional da diferenciação e função do adipócito marrom. Os adipócitos marrons originam-se de um precursor comum ao mioblasto, e que expressa o Myf5. O fator de transcrição Ebf2 interage com o PPAR γ para promover a expressão da PRDM16, que determina a diferenciação do precursor em adipócito marrom. A termogênese, na célula madura, é ativada pela norepinefrina, um agonista β 3 adrenérgico liberado por neurônios simpáticos. Por meio da ativação destes receptores, a norepinefrina sinaliza para aumento da expressão e atividade do PGC-1 α , um coativador da transcrição que coordena a expressão gênica relacionada à ativação do adipócito marrom. Adaptado de Harms M, Seale P ²⁵.

A PRDM16 é considerada um regulador chave do desenvolvimento do adipócito marrom, que especifica sua diferenciação a partir da linhagem precursora comum ao mioblasto, e também de sua atividade termogênica. Seale et al. (2008), demonstraram que a deleção do gene que codifica a PRDM16 em precursores do adipócito marrom resulta em diferenciação em mioblastos, ao passo que a expressão ectópica de PRDM16 em mioblastos induz sua diferenciação em adipócitos marrons²⁶. Na cascata de diferenciação do adipócito marrom, a PRDM16 atua como potente coativador da atividade transcricional do PGC1 α e - β , do PPAR α e - γ , e também dos C/EBPs^{24,25}.

O PPAR γ é um também regulador chave da diferenciação do tecido adiposo marrom, e também do branco²². O PGC1 α , também expresso em ambos os tecidos adiposos, embora em maior quantidade no marrom, é considerado um dos principais genes envolvidos na regulação da diferenciação do adipócito marrom, na medida em que está associado à biogênese das mitocôndrias e à indução da expressão da UCP1 e de enzimas envolvidas na respiração mitocondrial²².

2.2 Adipócito bege

No tecido adiposo branco, são observados agrupamentos de células que expressam a UCP1 em resposta ao frio ou à estimulação simpática. Estas células são denominadas adipócitos marrons adaptativos ou recrutáveis ou, mais recentemente, adipócitos bege ou “*brite*” (*brown from white*)²⁶⁻²⁹. Apresentam morfologia semelhante à dos adipócitos marrons, incluindo o aspecto multilocular de suas gotículas lipídicas e a abundância de mitocôndrias, e expressam a UCP1²⁶⁻²⁹. Além disso, seu recrutamento envolve a atividade de fatores de transcrição envolvidos também na diferenciação do adipócito marrom, como a PRDM16, PGC1 α e - β , PPAR γ , entre outros²⁵.

Embora compartilhem as características acima mencionadas, o adipócito marrom e o adipócito bege são hoje considerados células distintas. O adipócito bege não se origina da linhagem celular *Myf-5* positiva³⁰, mas parece ter origem de uma linhagem de células semelhante à célula muscular lisa, residentes no estroma vascular do tecido adiposo branco³⁰. Apresenta também um perfil de expressão

gênica particular, que permite distingui-lo dos dois outros tipos de adipócito, branco e marrom ⁵. Entre os genes seletivamente expressos no adipócito bege, destacam-se o *Tbx1* (que codifica o fator de transcrição *T-box 1*), o *Slc27a1* (que codifica o transportador de ácidos graxos *solute carrier family 27*) e genes que codificam proteínas de superfície, como *Cd40* e *Cd137* (envolvidos na resposta imunológica e inflamatória), e *Tmem26* (que codifica a proteína transmembrana 26) ⁵.

O adipócito bege, assim como o marrom, é capaz de executar a termogênese, por apresentar UCP1 funcionante ³¹. Entretanto, observa-se que em condições basais a expressão de UCP1 é consideravelmente superior nos adipócitos marrons, ao passo que as células bege expressam altas quantidades de UCP1 e de outras proteínas relacionadas à termogênese somente em condições que representam estímulos à termogênese, como estimulação β 3-adrenérgica e o frio ^{5,31}. Nestas condições, a expressão de UCP1 no adipócito bege é comparável à que se observa no adipócito marrom, sugerindo capacidade termogênica semelhante ⁵. Acredita-se, desta forma, que o adipócito bege apresente a capacidade de alternar seu estado funcional entre armazenamento lipídico e dissipação de energia, de acordo com o estímulo a que é submetido ^{5,31}.

A ocorrência das células bege no tecido adiposo branco tem sido correlacionada tanto com proteção contra o frio ³² quanto com proteção contra obesidade e distúrbios metabólicos ⁷. Em um modelo murino de deleção seletiva do gene que codifica a PRDM16 no tecido adiposo, observou-se comprometimento da função termogênica do adipócito bege em resposta ao frio e à estimulação β 3-adrenérgica, além de predisposição à obesidade, resistência insulínica e esteatose hepática em animais alimentados com dieta hiperlipídica ⁷.

2.3 Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares (RN), que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes. Eles controlam a expressão de uma uma série de genes envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos dos mamíferos, incluindo desenvolvimento, reprodução, resposta imune, função cardiovascular, crescimento e diferenciação celular,

depuração de toxina e metabolismo de carboidratos e lipídeos³³.

Os PPARs são classificados como receptores órfãos adotados³³ e são descritos três isotipos de PPAR, o PPAR α , - β/δ e - γ , cada um deles codificado por um gene distinto³³. Esses receptores compartilham da mesma organização estrutural dos RN, definida por domínios funcionais (Figura 3). O domínio A/B correspondente à região amino-terminal; o domínio C correspondente ao domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*); o domínio D corresponde à *hinge*, que representa a região de dobradiça; e o domínio E, na região carboxi-terminal, corresponde ao domínio de ligação ao ligante (LBD, *ligand binding domain*)³³.

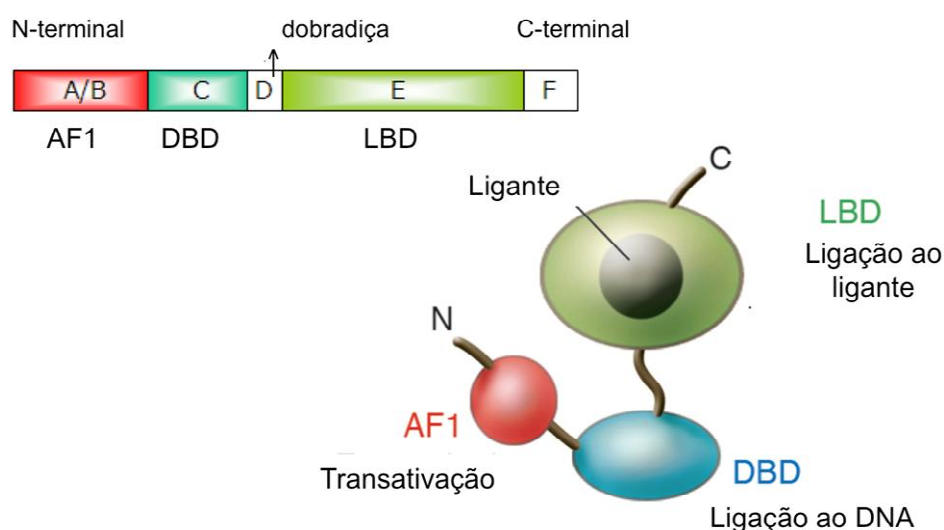


Figura 3. Estrutura dos receptores nucleares. AF1: região de transativação independente do ligante; DBD: domínio de ligação ao DNA; LBD: domínio de ligação ao DNA. Adaptado de Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S³⁶.

Na região amino-terminal (A/B), encontra-se o domínio de ativação independente do ligante, denominado AF-1 (função de ativação 1). O DBD é a região mais conservada e apresenta duas estruturas denominadas dedo de zinco, por meio das quais o receptor interage com regiões específicas do DNA que contêm duas repetições da sequência hexanucleotídica AGGTCA, separadas por um único nucleotídeo (*direct repeat 1*, DR-1), e são denominadas elementos responsivos ao PPAR (*PPAR responsive elements*, PPREs). Entre o DBD e o LBD, encontramos o domínio D, que é uma região menos conservada que proporciona flexibilidade

estrutural ao receptor, se comportando como uma dobradiça, e permitindo que a dimerização dos PPARs a outros RN e sua ligação ao DNA ocorram simultaneamente. A região carboxi-terminal, ou domínio E, contém o LBD, que reconhece ligantes hormonais e não hormonais específicos determinando a especificidade da resposta aos ligantes ³³.

A estrutura tridimensional do LBD dos PPARs, semelhante à de outros RN, possui treze hélices alfa e quatro fitas beta, que delimitam um bolso de ligação hidrofóbico, em forma de Y, maior que o de outros RN ³³. Na hélice 12 do LBD, encontra-se a região de ativação da transcrição dependente do ligante, denominada AF-2, que é estruturalmente dinâmica. A ativação do receptor por um ligante altera a conformação da hélice 12, estabilizando-a em uma conformação mais compacta em relação ao restante do LBD. Isto promove a liberação de proteínas corressoras e o recrutamento de proteínas coativadores ³³.

Os PPARs modulam a expressão gênica por pelo menos três mecanismos distintos: a repressão basal, a transativação e transrepressão da transcrição ³⁵. Eles ativam a expressão gênica como heterodímeros com outro RN, o receptor retinoide X (RXR, *retinoid X receptor*). O heterodímero PPAR-RXR se liga aos PPREs na região promotora de seus genes alvo e, na ausência do ligante, a transcrição é reprimida por associação do complexo a proteínas corressoras, como o corressor de RN (N-CoR) e as desacetilases de histonas (HDACs). Estas proteínas mantêm a cromatina na sua forma enovelada, o que impede o início da transcrição e resulta em repressão basal da expressão gênica ³³.

A ativação do PPAR pelo ligante com atividade agonista resulta em mudança conformacional do LBD que determina a dissociação das proteínas corressoras e o recrutamento de proteínas coativadoras, algumas delas com atividade de acetilase de histonas. A acetilase de histonas altera a estrutura da cromatina proporcionando a interação do promotor com a maquinaria geral de transcrição e, assim, o início da transcrição gênica. A ativação transcricional dos PPARs regula positivamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo de AG, homeostase de lipídeos e diferenciação de adipócitos, o que torna os PPARs reconhecidos como sensores lipídicos ^{37,38}. Os três isotipos de PPAR são ativados por uma variedade de ligantes endógenos, gerados a partir do metabolismo de AG ³³. Entretanto, até o momento,

não foi identificado um ligante endógeno com alta afinidade e especificidade para cada isoforma de PPAR³³.

Os PPARs podem influenciar a expressão gênica também de forma negativa, ou seja, reprimindo a expressão gênica na presença de um agonista. Este mecanismo é menos claro, mas parece envolver, pelo menos em parte, a competição com outros fatores de transcrição por proteínas correguladoras. A regulação negativa da expressão gênica é reconhecida como a forma com que os PPARs ativados reprimem a resposta inflamatória em diversos tipos celulares³³.

Os PPARs estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, e a atividade integrada dos três isotipos é responsável pela coordenação do metabolismo energético^{33,36}. O PPAR α é altamente expresso no coração, rim, fígado, intestino e tecido adiposo marrom, que são tecidos com altas taxas de catabolismo de AG e atividade peroxissomal. Ele regula a homeostase energética a partir do controle da expressão de genes envolvidos em vias de β -oxidação peroxissomal e mitocondrial, captação de AG, catabolismo de triglicerídeos e cetogênese, além de modular o metabolismo de lipoproteínas^{33,36}.

PPAR β/δ é a forma menos caracterizada de PPAR e apresenta expressão tecidual ampla³³. Está envolvido em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento da placenta, reparo tecidual, mielinização, regulação da homeostase energética, proliferação, diferenciação e apoptose celulares³³. Semelhante aos outros PPARs, o mesmo é expresso na parede vascular e em macrófagos e sua ativação nestas células diminui a expressão de genes que codificam proteínas com atividade pró-inflamatórias³³.

2.3.1 Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais

O PPAR γ é o alvo farmacológico das TZD, uma classe de sensibilizadores insulínicos utilizada no tratamento do DM2 e que tem como representantes a RSG, pioglitazona e troglitazona³⁷. O PPAR γ é expresso em diversos tecidos, principalmente no tecido adiposo³³. A transcrição do gene que codifica o PPAR γ origina três RNAs mensageiros (PPAR γ 1, PPAR γ 2, e PPAR γ 3), por utilização de promotores distintos e processamento alternativo. O PPAR γ 1 e PPAR γ 3 são

traduzidos na mesma proteína, denominada PPAR γ 1, encontrada em diversos tecidos como cérebro, intestino e células vasculares. O PPAR γ 2, por sua vez, é expresso seletivamente e em altos níveis no tecido adiposo ³³.

PPAR γ é considerado o principal regulador da diferenciação e função do tecido adiposo. Em conjunto com a família dos fatores de transcrição C/EBPs, regula a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em funções chave dos adipócitos, como metabolismo de lipídeos, sensibilidade insulínica, produção de adiponectina e outras citocinas, entre outros ^{33,38}. Diversas moléculas lipídicas podem ativar o PPAR γ , porém acredita-se que o seu principal ligante endógeno seja a 15-deoxi- Δ -prostaglandina-J₂ (15d-PGJ₂) ³³.

A ativação PPAR γ por agonistas proporciona melhora da capacidade do tecido adiposo subcutâneo em armazenar lipídeos, levando ao aumento de massa do mesmo. O tecido adiposo visceral, entretanto, apresenta massa inalterada ou mesmo reduzida em resposta à atividade do PPAR γ . Esta modificação diferencial do tecido adiposo subcutâneo e do visceral é denominada remodelamento do tecido adiposo, e promove o armazenamento de lipídeos em depósitos subcutâneos, sem acesso direto à circulação portal e menos sensíveis a ação de hormônios lipolíticos, proporcionando aumento de triglicerídeos no tecido adiposo subcutâneo e menor exposição do fígado e do músculo esquelético a AG. Isto resulta em redução da lipotoxicidade e melhora insulínica nestes tecidos ³⁶.

Esta melhora na capacidade de armazenamento de lipídeos a partir da ativação do PPAR γ é decorrente do aumento da expressão de genes que codificam proteínas que participam da síntese e armazenamento lipídico, como a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP-A ou aP2), o receptor de lipoproteínas CD36, a lipoproteína lipase, o transportador 1 de AG, a proteína 1 ligadora do elemento regulador de esterol, a glicerol quinase e a dessaturase 1 de estearoil-COA ^{33,36}.

A melhora da sensibilidade insulínica em resposta à ativação do PPAR γ também resulta da regulação da expressão de fatores secretados pelo adipócito e pelos macrófagos residentes no tecido adiposo. Observa-se inibição da expressão do fator de necrose tumoral alfa e resistina, que são indutores de resistência insulínica no fígado e no músculo esquelético, e estimulação da produção de adiponectina que melhora a sensibilidade insulínica nestes tecidos ³⁶, indicando a

importância do receptor para sensibilidade insulínica no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético.

A expressão do PPAR γ no fígado e no músculo esquelético também é importante para a homeostase da glicose ³⁶. A deleção seletiva do gene que codifica o PPAR γ no fígado de camundongos resultou em diminuição da captação hepática de triglicérides, dislipidemia e resistência insulínica ³⁹. No músculo esquelético, a deleção do gene que codifica o receptor resultou em hiperglicemia e resistência insulínica no próprio músculo esquelético, e também no tecido adiposo e no fígado, indicando que a expressão do PPAR γ no músculo esquelético, ainda que em baixos níveis, é importante para homeostase da glicose ⁴⁰.

Um aspecto interessante do PPAR γ é que tanto a ativação quanto a perda parcial de função do receptor promovem um aumento da sensibilidade insulínica. Camundongos com deleção heterozigota do gene que codifica o PPAR γ demonstraram ser mais sensíveis à ação da insulina, resistentes à obesidade e resistência insulínica induzidas por dieta hiperlipídica ⁴¹. A perda de função do receptor pela deleção heterozigota reduziu a lipogênese e o conteúdo de TG no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado, proporcionando melhora da sensibilidade insulínica. Diferentemente, a ativação suprafisiológica do receptor com a RSG, em modelos animais de obesidade e resistência insulínica, promove o aumento da deposição de TG no tecido adiposo branco, redução da deposição de TG no músculo esquelético e fígado, e inibe a produção de adipocitocinas que promovem resistência insulínica. A melhora da sensibilidade insulínica em um cenário de aumento de massa de tecido adiposo é relacionada à melhora da função endócrina e armazenamento de lipídeos desse tecido ^{41,42}.

O envolvimento do PPAR γ em diversos processos fisiológicos e principalmente no metabolismo de lipídeos e resposta inflamatória tornou o desenvolvimento de agonistas deste receptor um alvo atraente para tratamento das doenças metabólicas humanas. Entretanto, o amplo padrão de expressão tecidual do receptor, assim como sua participação em numerosas vias de sinalização, constituem desvantagem à abordagem do PPAR γ como alvo farmacológico. De fato, a ativação do PPAR γ está associada a diversos efeitos adversos, como os observados com o uso das TZD ⁴³.

Uma estratégia atual para reduzir os efeitos adversos observados com ativação do PPAR γ é o desenvolvimento de compostos que sejam capazes de ativar um subconjunto específico de genes alvos que regulam um número restrito de vias metabólicas de modo que seja possível obter os efeitos benéficos da ativação do receptor sobre a homeostase energética sem os efeitos adversos, ou seja, ligantes capazes de manter a atividade sensibilizadora da insulina, porém sem os efeitos adversos observados com a utilização de agonistas completos, o que representa uma modulação seletiva do receptor ⁴⁴.

Acredita-se que os efeitos adversos relacionados ao uso das TZD sejam resultado de ativação suprafisiológica do PPAR γ por agonistas completos. Desta forma, o agonismo parcial pode representar uma estratégia mais segura para ativar o receptor ⁴⁴.

2.4 GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona)

Agonistas clássicos de PPAR γ , como as TZD, são eficientes sensibilizadores insulínicos tanto em humanos como em modelos animais de diabetes e obesidade, porém com efeitos adversos que limitam a sua ampla utilização. Estas limitações direcionam as buscas por ligantes com atividade distinta das TZDs, em especial os moduladores seletivos do receptor ^{43,44}.

A busca por moduladores seletivos do PPAR γ levou ao desenvolvimento do GQ-16, um composto sintético derivado da 5-benzilideno-3(4-metil-benzil)tiazolina-2,4-diona ⁴⁵, cuja estrutura é apresentada na Figura 4.

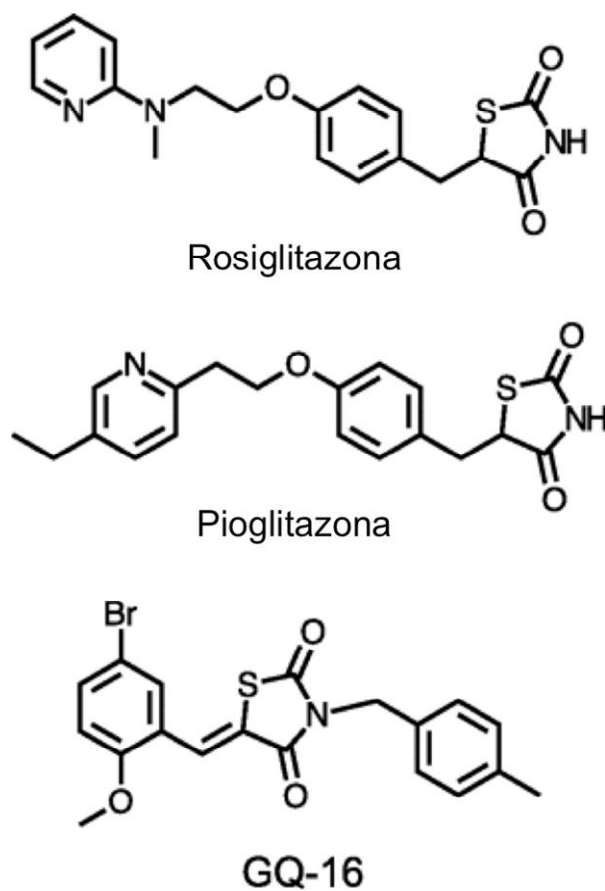


Figura 4. Estrutura química do GQ-16, em comparação com a das TZDs rosiglitazona e pioglitazona. Fonte: Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al.⁴⁵

O GQ-16 apresenta atividade agonista parcial no PPAR γ (Figura 5A), e não apresenta atividade em PPAR α , PPAR β/δ ou RXR α ⁴⁵. Além disso, liga-se ao LBD do PPAR γ com baixa afinidade e apresenta potencial adipogênico reduzido tanto em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 quanto em células mesenquimais murinas C3H10T1/2 (Figura 5B) ⁴⁵.

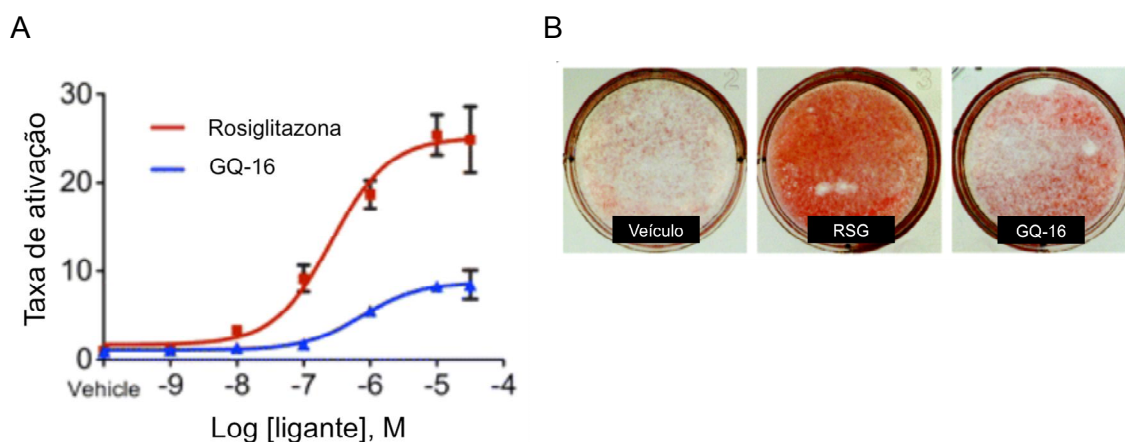


Figura 5. O GQ-16 é um agonista parcial do PPAR γ com baixa atividade adipogênica em cultura. A. Atividade parcial do GQ-16 no PPAR γ , quando comparado à RSG, por meio de ensaio de gene repórter. B. Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 evidenciando menor potencial adipogênico do GQ-16 em comparação com a RSG, como evidenciado na figura. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al.⁴⁵

Em camundongos Swiss machos com obesidade, resistência insulínica e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica, tratamento com GQ-16 resultou em melhora da sensibilidade insulínica e da tolerância à glicose de forma comparável ao tratamento com rosiglitazona⁴⁵.

Choi et al. (2010) mostraram que o estado inflamatório relacionado à obesidade resulta em aumento da fosforilação do PPAR γ na serina 273 (Ser 273) pela quinase dependente de ciclina (Cdk5), e que essa fosforilação desregula a expressão de um subconjunto de genes alvos de PPAR γ necessários à sensibilidade insulínica⁴⁶. Agonistas de PPAR γ , tanto com atividade total quanto parcial, inibem a fosforilação do receptor neste sítio, o que pode justificar seu efeito semelhante em relação à melhora da sensibilidade insulínica, a despeito de atividade agonista distinta⁴⁶. Desta forma, a melhora da sensibilidade insulínica associada aos agonistas de PPAR γ está associada não apenas à sua capacidade de induzir a atividade transcricional clássica do receptor, mas também à capacidade de inibir a fosforilação da Ser273 pela Cdk5⁴⁶.

O GQ-16 inibe a fosforilação do PPAR γ em Ser273 *in vitro*, de modo semelhante à rosiglitazona⁴⁵. Estudos estruturais indicaram que o GQ-16 se liga ao LBD do PPAR γ de maneira única, diferente das outras TZD e de outros ligantes de

PPAR γ descritos até o momento. Enquanto as TZD se ligam ao LBD perpendicularmente à hélice 3, o GQ-16 se liga em outra orientação, em paralelo à hélice 3, e não faz contato direto com nenhum resíduo da hélice 12. Em estudos de troca hidrogênio-deutério, no entanto, o GQ-16 promove estabilização da hélice 12, que, em análise de dinâmica molecular, parece ser mediada por uma molécula de água, que medeia interação entre o GQ-16 e a hélice 12 ⁴⁵.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do GQ-16, um agonista parcial de PPAR γ , sobre variáveis metabólicas e a expressão de genes relacionados à termogênese em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito de diferentes doses do GQ-16 (5, 10, 20 e 40 mg/kg/d) sobre o peso corporal, glicemia, consumo de energia, massa adiposa branca epididimal de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.
- Investigar o efeito de diferentes doses do GQ-16 (5, 10, 20 e 40 mg/kg/d) sobre a expressão de genes relacionados à termogênese (*Ucp1*, *Cidea* e *Prdm16*) de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.
- Investigar o efeito de diferentes doses do GQ-16 (5, 10, 20 e 40 mg/kg/d) sobre a expressão de genes seletivos do adipócito bege (*Tmem26* e *Cd40*) de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.
- Investigar o efeito do GQ-16, na dose de 40 mg/kg/d, sobre características histológicas do tecido adiposo marrom e branco epididimal e subcutâneo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido em camundongos e todos os procedimentos realizados seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources*, 2011) ⁴⁷. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, UnbDoc 27455/2011 (ANEXO I).

4.2 Modelo animal

Neste estudo, foram utilizados camundongos Swiss machos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em grupos de 4 a 5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada (25° C) e com um ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 18h e 6h). O acesso a alimento e água foi livre.

4.3 Desenho experimental

Um grupo de animais foi alimentado com dieta contendo baixa quantidade de lipídeos (10% do total de kcal representados por lipídeos) e os demais grupos, com dieta hiperlipídica (DHL) 60% do total de kcal representados por lipídeos), desde o desmame (3ª semana de vida) até à 18ª semana de vida. A DHL foi utilizada com o objetivo de induzir obesidade e hiperglicemia; a dieta contendo baixa quantidade de lipídeos foi utilizada como um controle do desenvolvimento de obesidade e hiperglicemia em resposta à DHL.

As dietas foram obtidas da empresa Resarch Diets (New Brunswick, EUA) e a descrição de sua composição está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos componentes das dietas controle e hiperlipídica.

	Dieta controle (D12450B)		Dieta hiperlipídica (D12492)	
	g (%)	kcal (%)	g (%)	kcal (%)
Proteína	19,2	20	26,2	20
Carboidrato	67,3	70	26,3	20
Lípídeo	4,3	10	34,9	60
Total (kcal/g)	3,85	100	5,24	100
Ingrediente	g	Kcal	g	kcal
Caseína	200	800	200	800
L-cistina	3	12	3	12
Amido de milho	315	1260	0	0
Maltodextrina	35	140	125	500
Sacarose	350	1400	68,8	275,2
Celulose	50	0	50	0
Óleo de soja	25	225	25	225
Lard	20	180	245	2205
Mistura mineral S10026	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato de Cálcio	5,5	0	5,5	0
Citrato de potássio	16,5	0	16,5	0
Mistura de vitamina V10001	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	0	2	0
Corante Amarelo	0,05	0	0,05	0
Total	1055,05	4057	773,85	4057

4.3.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/dia de GQ-16

Para o primeiro estudo, 4 camundongos foram tratados com dieta controle e 18 animais, com DHL. Após o desenvolvimento de obesidade (16^a semana de vida), os camundongos alimentados com DHL foram divididos em 5 grupos, 3 grupos contendo 4 camundongos e 2 grupos contendo 3 camundongos. Os grupos foram tratados da seguinte forma, durante 2 semanas (entre a 16^a e a 18^a semanas de vida), por meio de gavagem:

- Grupo 1: dieta controle, tratamento com veículo.
- Grupo 2: DHL, tratamento com veículo.
- Grupo 3: DHL, tratamento com RSG (4 mg/kg/d).
- Grupo 4: DHL, tratamento com GQ-16 (5 mg/kg/d).
- Grupo 5: DHL, tratamento com GQ-16 (10 mg/kg/d).
- Grupo 6: DHL, tratamento com GQ-16 (20 mg/kg/d).

O veículo foi constituído por Tween®-20 diluído em salina (0,25%, v/v; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). A RSG foi obtida da empresa Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA) e diluída em Tween®-20/salina. O GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona) foi sintetizado na Universidade Federal de Pernambuco, como descrito previamente na literatura ⁴⁸.

4.3.2 Estudo 2: tratamento 40 mg/kg/dia de GQ-16

Para segundo estudo, 4 camundongos foram tratados com dieta controle e 12 animais, com DHL. Após o desenvolvimento de obesidade (16^a semana de vida), os camundongos alimentados com DHL foram divididos em 3 grupos, cada um contendo 4 camundongos. Os grupos foram tratados da seguinte forma, durante 2 semanas (entre a 16^a e a 18^a semanas de vida), por meio de gavagem:

- Grupo 1: dieta controle, tratamento com veículo.
- Grupo 2: DHL, tratamento com veículo.
- Grupo 3: DHL, tratamento com RSG (4 mg/kg/d).
- Grupo 4: DHL, tratamento com GQ-16 (40 mg/kg/d).

4.3.3 Procedimentos

Entre a 3^a e a 16^a semanas de vida, o peso corporal (em gramas), a ingestão de dieta (em gramas) e a ingestão de líquido (em mL) foram avaliadas semanalmente. Durante o período do tratamento (14 dias, 16^a à 18^a semanas de vida), estas variáveis foram avaliadas diariamente e, após o período de tratamento, foram calculados:

- O ganho de peso corporal durante o tratamento (peso ao final do tratamento – peso no dia de início do tratamento).
- Energia ingerida durante o tratamento (soma da energia ingerida durante os 14 dias do tratamento, considerando a quantidade de energia, em kJ, por g de dieta).

A glicemia foi aferida na 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a e 18^a semanas de vida, com a utilização de um glicosímetro (Accucheck Performa, Roche), no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas.

Ao final do tratamento, nos dois estudos, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação, no período matutino (entre 9h00 e 10h00). Após a eutanásia, o sangue do tronco foi coletado, centrifugado (4000g durante 15 min a 4°C) e o soro armazenado a -80° C, para posterior medida da concentração de transaminases. Foram também dissecados os depósitos de tecido adiposo branco epididimal, tecido adiposo branco inguinal e tecido adiposo marrom interescapular. Depois desse procedimento, sua massa (em g) foi aferida, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior avaliação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse. Uma amostra de cada depósito de tecido adiposo acima descrito foi removida, fixada em paraformaldeído 4% e embebida em parafina para análise histológica, com coloração com hematoxilina e eosina.

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 tecidos 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 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferida para tubos de 1,5 mL. 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 14000 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 14000 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 9000rpm, durante 5 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de água MilliQ.

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.

4.4.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada no espectrofotômetro de microvolume Nanovue (GE Health Sciences®, Life Sciences, Buckinghamshire, UK), utilizando-se 1µL da amostra. A concentração de RNA, fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL.

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.

4.4.3 Avaliação da integridade do RNA

Para determinar a integridade do RNA nas amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, com o objetivo de visualização do RNA ribossômico 18S e 28S. A observação de bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S foi considerada indício de não degradação de RNA nas amostras.

4.5 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativa

A transcrição reversa (RT) e a amplificação por PCR quantitativa em tempo real foram realizadas em um único passo, com a utilização do kit *Power SYBR[®] Green RNA-to-C_T 1-Step* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo sistema *SYBR[®] Green*. Este método utiliza fluoróforos que se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, sendo a intensidade desta 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 tornar exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*) para um volume final de 20 µL, como descrito na tabela 2. Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi realizada para cada par de *primers*, a fim de se verificarem possíveis contaminações, e uma reação sem a transcriptase reversa foi realizada para cada par de *primers*, para certificação da ausência de possíveis contaminações com DNA genômico.

Tabela 2. Reagentes da reação em cadeia de polimerase e suas respectivas quantidades.

Reagente	Quantidade
Mix <i>Power SYBR[®] Green RT-PCR</i> (2x)	10 µL
Transcriptase reversa	0,16 µL
RNA (5 ng/4,5 µL)	4,5 µL
<i>Primer forward</i> (5 pmol/L)	0,4 µL
<i>Primer reverse</i> (5 pmol/L)	0,4 µL
Água MilliQ	5,54 µL
Volume total	20 µL

As reações foram conduzidas em um equipamento AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sequência dos iniciadores ou *primers* utilizados está descrita na tabela 3.

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

Primer ¹	Proteína correspondente	Sequência
<i>Ucp1</i>	Proteína desacopladora tipo 1 (UCP1)	F: 5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3' R: 5'-CTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'
<i>Cidea</i>	Fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efêtor A semelhante à subunidade alfa (CIDEA)	F: 5'-TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT-3' R: 5'-GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3',
<i>Tmem26</i>	Proteína transmembrana 26 (TMEM26)	F: 5'-ACCCTGTCATCCCACAGAG-3' R: 5'-TGTTTGGTGGAGTCCTAAGGTC-3'
<i>Cd40</i>	Antígeno de diferenciação de grupo 40 (CD40)	F: 5'-TTGTTGACAGCGGTCCATCTA-3' R: 5'-CCATCGTGGAGGTAAGGTTG-3'
<i>Prdm16</i>	Proteína 16 contendo o domínio PR (PRDM16)	F: 5'-CAGCACGGTGAAGCCATTC-3' R: 5'-GCGTGCATCCGCTTGTG-3'
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

¹ Identificação do primer pelo gene correspondente F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

As condições de termociclagem na 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, anelamento e amplificação: 95°C durante 15 segundos (desnaturação), 60°C durante 1 minuto (anelamento e extensão).
- Programa de desnaturação ou dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*): foi realizado após cada reação, com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* 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. Assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da razão entre a

derivada da fluorescência e a derivada da temperatura (dF/ dT) em relação a temperatura.

As expressão relativa de RNAm para cada um dos genes alvo foram determinadas pelo método comparativo $\Delta\Delta Ct$, com normalização para o gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), o gene referência. Para isso, os valores de Ct obtidos para cada amostra, nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar), foram subtraídos do Ct obtido para as mesmas amostras, nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o ΔCt . A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intervenção}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$, em que as intervenções corresponderam às amostras de tecido originadas de animais alimentados com DHL e tratados com RSG ou GQ-16 e o calibrador, às amostras de tecidos originadas de animais alimentados com DHL e tratados com veículo.

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste t de Student pareado ou a análise de variância (ANOVA) seguida da comparação múltipla de *Newman-Keuls*, para comparação das médias entre dois ou múltiplos grupos, respectivamente. As mudanças da glicemia de jejum, massa coporal e ingestão de energia e água ao longo do tempo e em resposta aos tratamentos foram analisadas pela análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni. O critério de significância estatística foi o valor de p inferior a 0,05.

Os resultados de expressão gênica relativa dos genes relacionados à termogênese e dos genes seletivos do adipócito bege foram apresentados como média \pm EPM da expressão nos grupos tratados com RSG ou GQ-16, em relação ao grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (controle). A análise dos dados foi realizada através o teste *t* de *Student* entre cada grupo tratado e o grupo controle.

5 RESULTADOS

5.1 Indução de ganho de massa corporal e hiperglicemia por dieta hiperlipídica

Os camundongos do estudo 1 foram divididos, no período do desmame (3^a semana de vida) em 6 grupos, cada um contendo 4 animais. Não foi observada diferença entre os grupos, com relação ao peso corporal, neste momento (Figura 6A). Um grupo foi alimentado com dieta controle e os outros 5, com DHL. A partir da 14^a semana de vida, observou-se aumento do ganho peso corporal nos grupos alimentados com DHL (Figura 6A). Na 16^a semana de vida, antes do início do tratamento, os animais alimentados com DHL apresentaram ganho cumulativo de peso corporal significativamente maior, considerado desde o desmame, na 3^a semana de vida (Figura 6B).

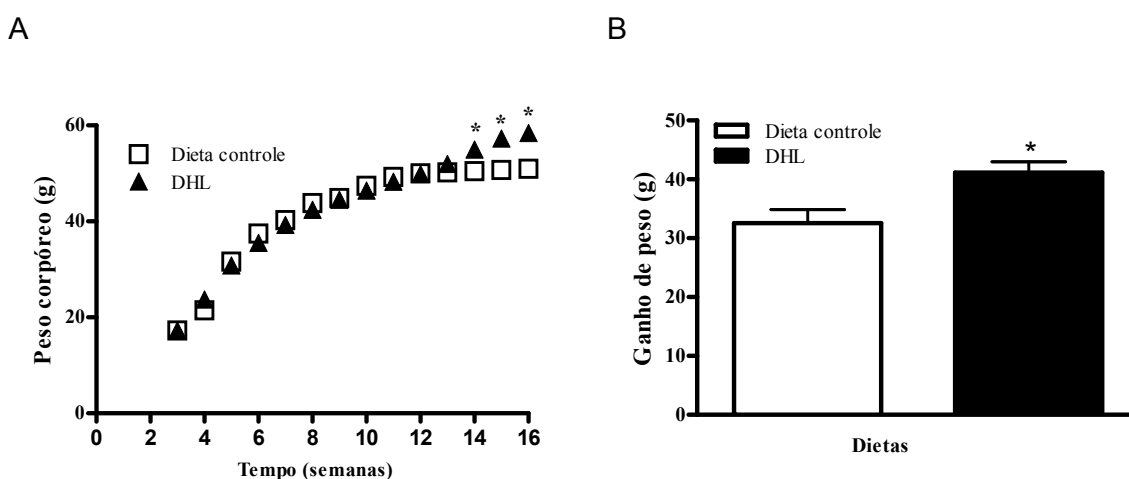


Figura 6. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica, estudo 1. (A) Peso corporal desde o desmame (3^a semana de vida) até à 16^a semana de vida e (B) Ganho de peso corporal desde o desmame até à 16^a semana de vida em camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou DHL (n = 18), a partir do desmame. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Grupo alimentado com dieta controle (análise de variância de dois fatores seguida do teste de Bonferroni e teste t de Student pareado).

Nos camundongos alimentados com DHL, foi observado aumento da glicemia média em jejum a partir da 12^a semana de vida em relação aos alimentados com dieta controle. Na 16^a semana de vida, antes do início do tratamento, os camundongos alimentados com DHL apresentaram glicemia média de jejum alterada (> 100 mg/dL), conforme apresentado na Figura 7.

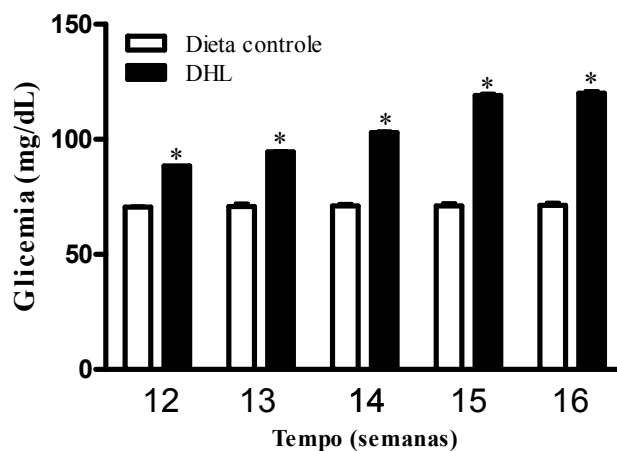


Figura 7. Glicemia em jejum dos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, estudo 1. A partir da 12^a semana de vida, foi observado aumento significativo da glicemia média em jejum nos camundongos alimentados com DHL, comparados aos alimentados com dieta controle. A partir da 14^a semana de vida, os camundongos alimentados com DHL apresentaram glicemia média em jejum acima de 100 mg/dL. Camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou DHL (n = 18), a partir do desmame. Dados apresentado como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Grupo alimentado com dieta controle (análise de variância de dois fatores seguida do teste de Bonferroni e teste t de Student pareado).

Os camundongos do estudo 2 foram divididos, no período do desmame (3^a semana de vida) em 4 grupos, cada um contendo 5 animais. Um grupo foi alimentado com dieta controle e os outros 3, com DHL. Neste estudo, não foi observada diferença entre o ganho de peso cumulativo nos animais alimentados com dieta controle ou DHL (Figura 8), embora tenha havido aumento significativo da glicemia de jejum (Figura 9), semelhante ao observado no estudo 1.

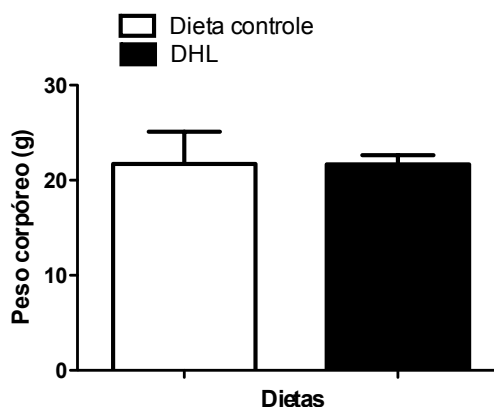


Figura 8. Ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica, estudo 2. Ganho de massa corporal desde o desmame até à 16^a semana de vida em camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou

DHL (n = 18), a partir do desmame. Dados apresentado como média \pm SEM. * 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 pareado).

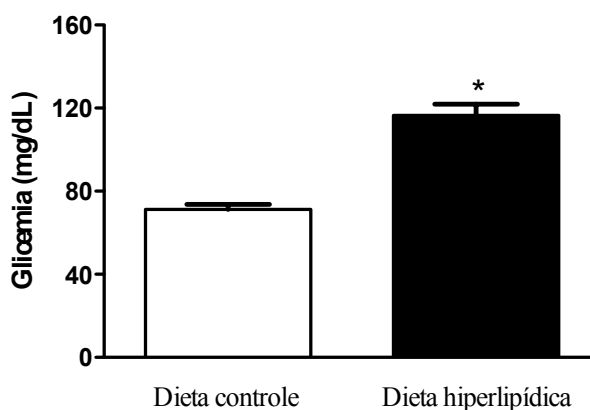


Figura 9. Glicemia em jejum dos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, estudo 2. Na 16ª semana, antes do início do tratamento, os camundongos alimentados com DHL apresentaram glicemia média em jejum acima de 100 mg/dL, e significativamente mais elevada que os animais alimentados com dieta controle. Camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou DHL (n = 18), a partir do desmame. Dados apresentado como média \pm SEM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (teste t de Student pareado).

5.2 Efeitos do GQ-16 sobre o peso corporal, glicemia, adiposidade, ingestão hídrica e de energia e concentração circulante de transaminases

5.2.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16

No estudo 1, os camundongos que receberam dieta controle foram tratados com veículo e os que receberam DHL foram divididos em 5 grupos, e cada um recebeu um dos seguintes tratamentos: veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (5, 10 ou 20 mg/kg/d). Os tratamentos foram conduzidos durante 14 dias.

Os camundongos tratados com RSG apresentaram ganho de peso significativo quando comparados aos que receberam dieta controle + veículo ou DHL + veículo. O tratamento com a menor dose de GQ-16 (5 mg/kg/d) induziu menor ganho de peso quando comparado ao tratamento com veículo ou RSG, nos animais alimentados com DHL. O tratamento com 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16 induziu perda de peso (Figura 10).

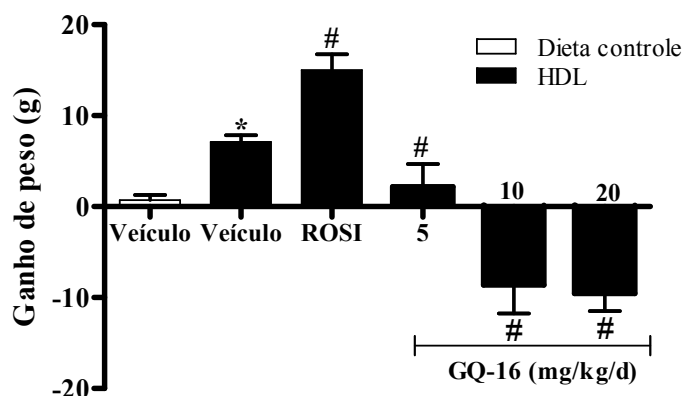


Figura 10. Ganho de peso após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

Foi observada também redução significativa da glicemia em resposta ao tratamento com RSG e as duas maiores doses de GQ-16 (10 e 20 mg/kg/d), conforme apresentado na Figura 11.

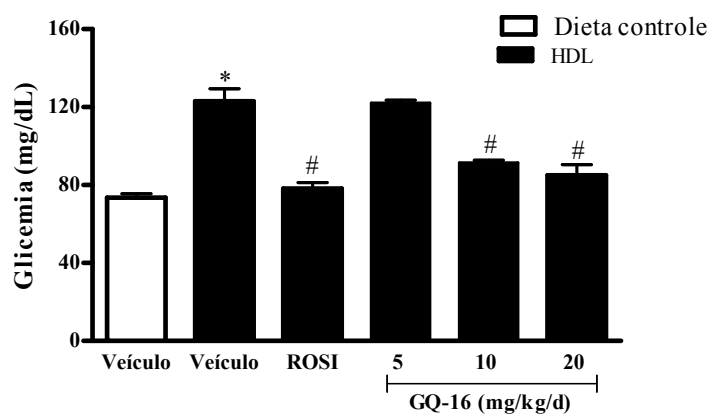


Figura 11. Glicemia de jejum após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

Os camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo apresentaram aumento da massa adiposa visceral (epididimal) em relação aos alimentados com

dieta controle. O tratamento com RSG aumentou a massa adiposa epididimal. No grupo tratado com a maior dose de GQ-16 (20 mg/kg/d), foi observada redução da massa adiposa para valores médios semelhantes aos dos animais que receberam dieta controle (Figura 12A). Não houve modificação significativa da massa do depósito de tecido adiposo marrom interescapular, embora tenha sido observada discreta tendência de aumento desta variável em resposta ao tratamento com RSG (Figura 12B).

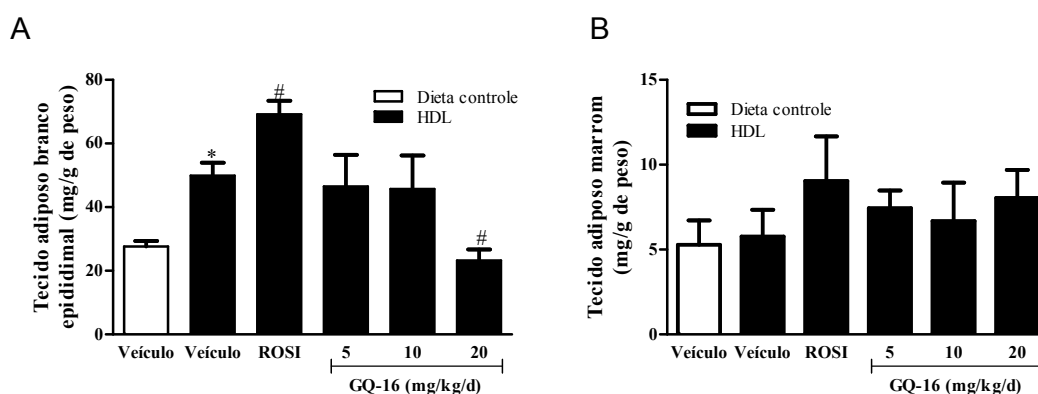


Figura 12. Massa adiposa epididimal (A) e do depósito de tecido adiposo marrom interescapular (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

Foi observado aumento da ingestão de energia nos camundongos tratados com 20 mg/kg/d, em relação aos animais que receberam DHL + veículo (Figura 13A). Não houve modificação da ingestão hídrica em resposta a nenhuma das intervenções, em comparação com os camundongos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (Figura 13B).

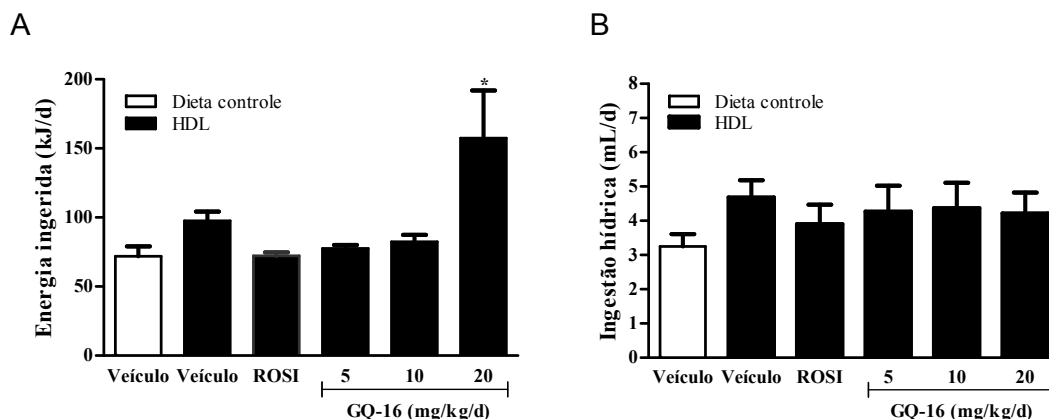


Figura 13. Ingestão de energia (A) e ingestão hídrica (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou QG-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

Não foi observada alteração da concentração sérica das transaminases aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em resposta aos tratamentos (Figuras 14 A e B).

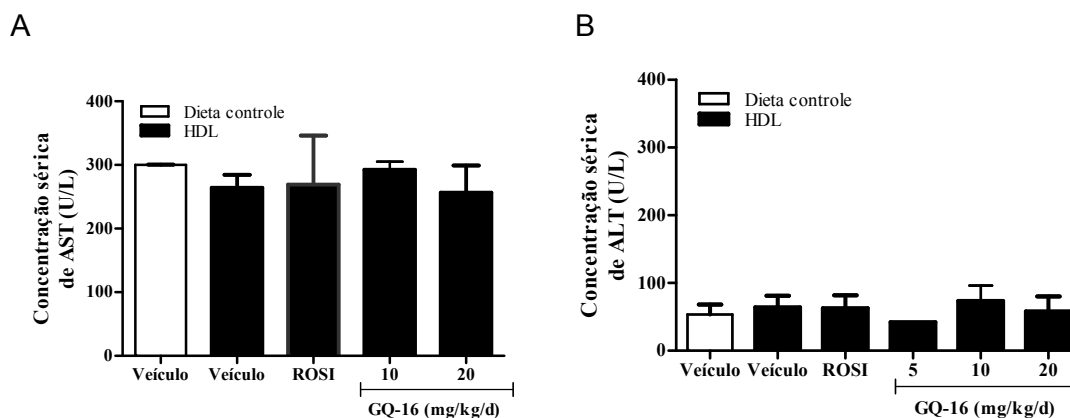


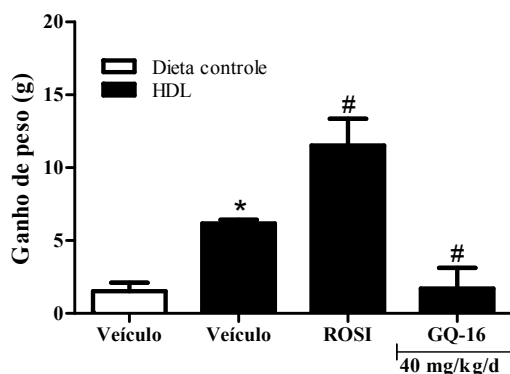
Figura 14. Concentração sérica de aspartato aminotransferase (A) e alanina aminotransferase (B) após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou QG-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

5.2.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16

No estudo 2, os camundongos que receberam dieta controle foram tratados com veículo e os que receberam DHL foram divididos em 3 grupos, e cada um recebeu um dos seguintes tratamentos: veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (40 mg/kg/d). Os tratamentos foram conduzidos durante 14 dias.

Foi observado aumento do ganho de peso, em resposta à DHL, nos camundongos tratados com RSG, e redução do ganho de peso nos animais tratados com GQ-16 (Figuras 15 A e B).

A



B

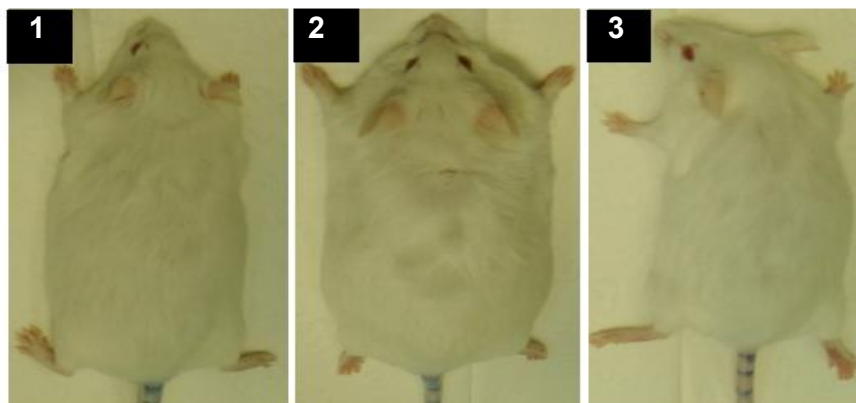


Figura 15. Ganho de peso em resposta ao tratamento com GQ-16. A. Ganho de peso, em gramas, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). B. Visão frontal de um camundongo representativo de cada grupo alimentado com dieta hiperlipídica; 1 DHL + veículo; 2 DHL + RSG; 3 DHL + GQ-16. Em A, dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n \sim 4$ camundongos por grupo.

Foi observada também redução significativa da glicemia nos grupos tratados com RSG e GQ-16 (Figura 16).

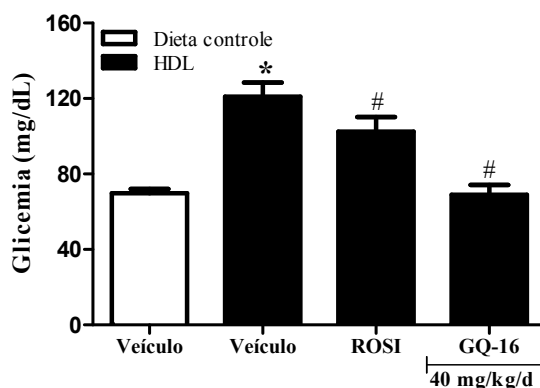


Figura 16. Glicemia em jejum, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

O tratamento com GQ-16, mas não com RSG, resultou em aumento significativo da energia ingerida (Figura 17).

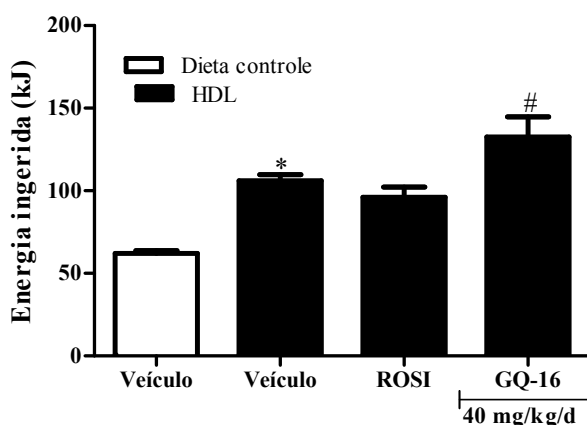
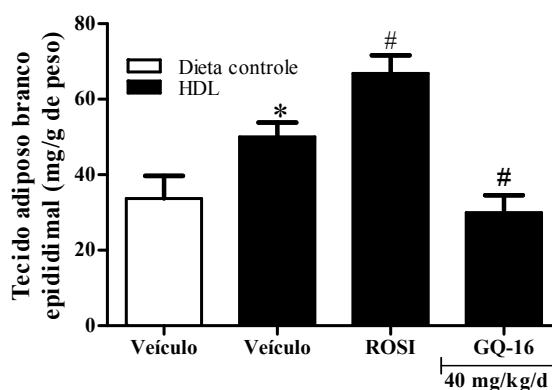


Figura 17. Energia ingerida, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

O tratamento com RSG aumentou o ganho de massa adiposa epididimal (visceral) em resposta à DHL, ao passo que no grupo de camundongos tratado com GQ-16 houve redução da massa deste depósito adiposo (Figuras 18 A e B).

A



B

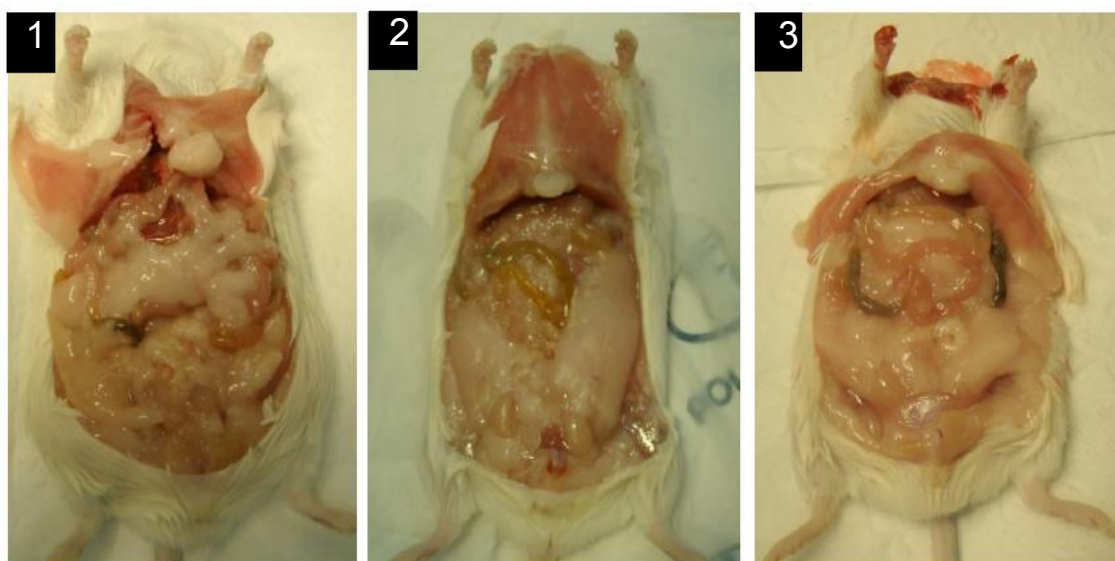
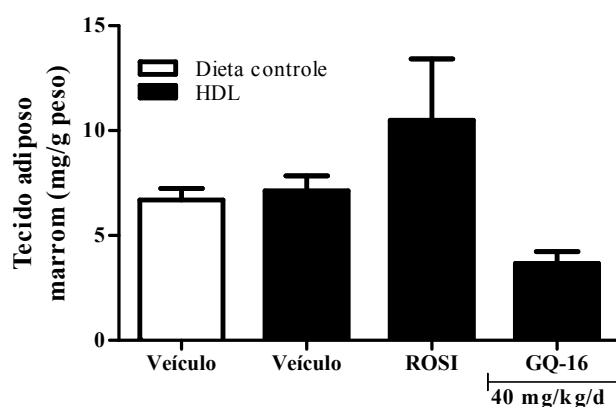


Figura 18. Massa adiposa epididimal em resposta ao tratamento com GQ-16. A. Massa adiposa epididimal, em gramas, corrigida para a massa corporal total, após duas semanas de tratamento com veiculo, RSG (4 mg/kg/d), ou GQ-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veiculo) ou DHL (tratados com veiculo, RSG ou GQ-16). B. Visão frontal da cavidade abdominal, com detalhe do depósito adiposo epididimal, em um camundongo representativo de cada grupo alimentado com dieta hiperlipídica; 1 DHL + veiculo; 2 DHL + RSG; 3 DHL + GQ-16; TABepi tecido adiposo branco epididimal; setas: TABepi. Em A, dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

Os camundongos tratados com RSG apresentaram tendência de aumento da massa do depósito de tecido adiposo marrom interescapular, ao passo que os tratados com GQ-16 apresentaram tendência de redução da massa deste depósito. No entanto, nenhuma das alterações foi estatisticamente significativa (Figuras 19 A e B). Estas tendências de alteração da massa do depósito de tecido adiposo marrom interescapular foram acompanhadas de coloração mais clara deste depósito nos camundongos tratados com RSG e mais escura nos tratados com GQ-16 (Figura 19 B).

A



B

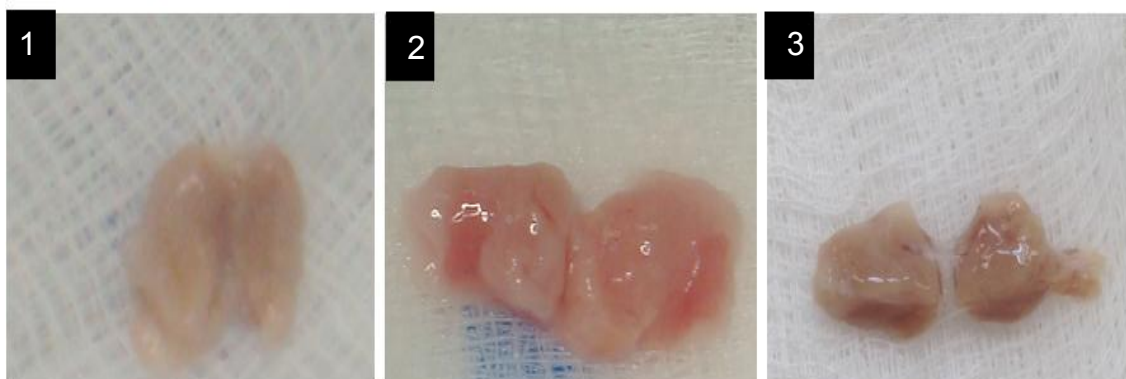


Figura 19. Massa do depósito de tecido adiposo marrom interescapular em resposta ao tratamento com GQ-16. A. Massa adiposa marrom interescapular, em gramas, corrigida para a massa corporal total, após duas semanas de tratamento com com veículo, RSG (4 mg/kg/d), ou QG-16 (40 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle (tratamento com veículo) ou DHL (tratados com veículo, RSG ou GQ-16). B. Visão macroscópica do depósito de tecido adiposo marrom

interescapular, em um camundongo representativo de cada grupo alimentado com dieta hiperlipídica; 1 DHL + veículo; 2 DHL + RSG; 3 DHL + GQ-16. Em A, dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL (análise de Variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*); $n = \sim 4$ camundongos por grupo.

5.3 Efeitos do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo

5.3.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16

Nos camundongos tratados com RSG, foi observado aumento da expressão do RNAm dos genes *Ucp1*, *Cidea* e *Prdm16* no tecido adiposo marrom interescapular (Figura 20). Foi observado aumento da expressão de *Ucp1* nos camundongos tratados com 10 e 20 mg/kg/d de GQ-16, e aumento da expressão de *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos tratados com 20 mg/kg/d de GQ-16 (Figura 20).

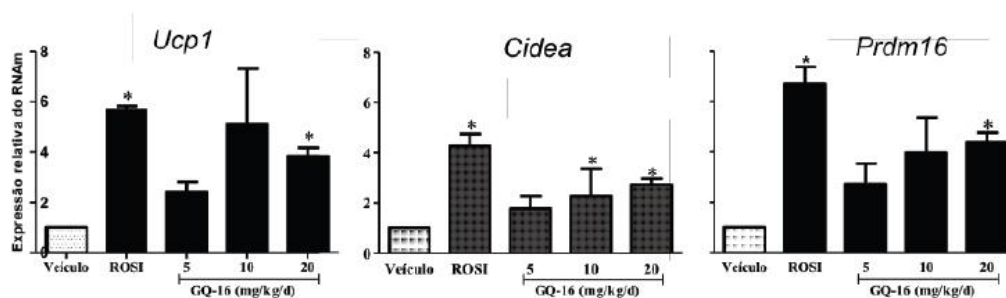


Figura 20. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo marrom interescapular. Níveis de RNAm de *Ucp-1*, *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou QG-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais per group.

No tecido adiposo branco epididimal (visceral), foi observado aumento da expressão do RNAm dos genes *Ucp1* e *Cidea* nos camundongos tratados com 20 mg/kg/d de GQ-16. Não houve modificação da expressão de *Prdm16* em resposta ao GQ-16. A expressão do RNAm de nenhum desses genes se modificou em resposta ao tratamento com RSG (Figura 21).

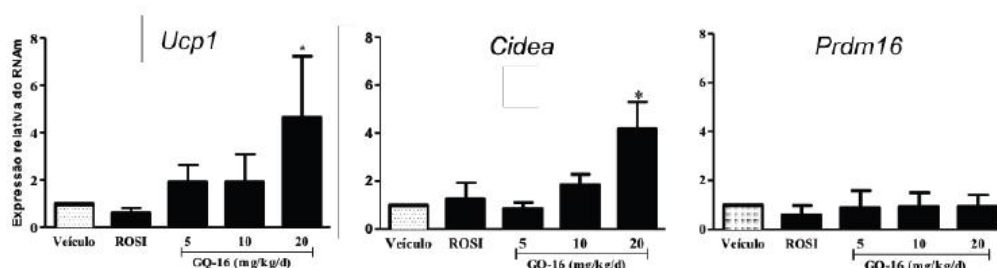


Figura 21. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco epididimal. Níveis de RNAm de *Ucp-1*, *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

No tecido adiposo inguinal (subcutâneo), foi observado aumento da expressão do RNAm do gene *Ucp1* em resposta ao tratamento com 5 mg/kg/d de GQ-16, porém redução da expressão em resposta à dose mais elevada, de 20 mg/kg/d. A expressão do RNAm de *Cidea* e *Prdm16*, diferentemente, diminuiu em resposta ao tratamento com RSG e GQ-16 (Figura 22).

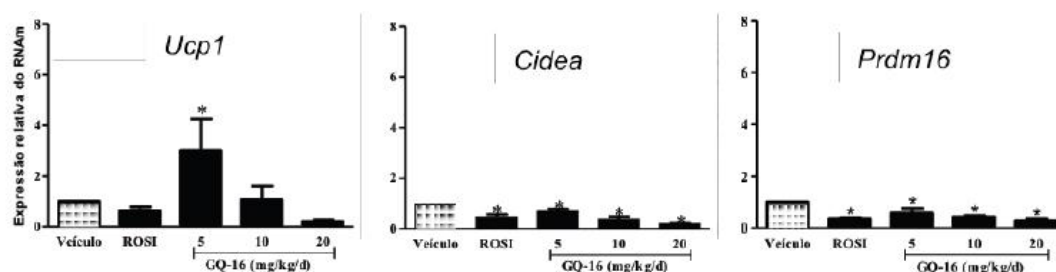


Figura 22. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco inguinal. Níveis de RNAm de *Ucp-1*, *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (5, 10 ou 20 m/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

5.3.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16

Nos camundongos tratados com 40 mg/kg/d de GQ-16 durante 2 semanas, foi observado aumento significativo da expressão do RNAm dos genes *Ucp1*, *Cidea* e *Prdm16* no tecido adiposo branco epididimal. Neste tecido, a expressão de *Ucp1* e *Cidea* não se modificou em resposta ao tratamento com RSG e a expressão de *Prdm16*, diminuiu (Figura 23).

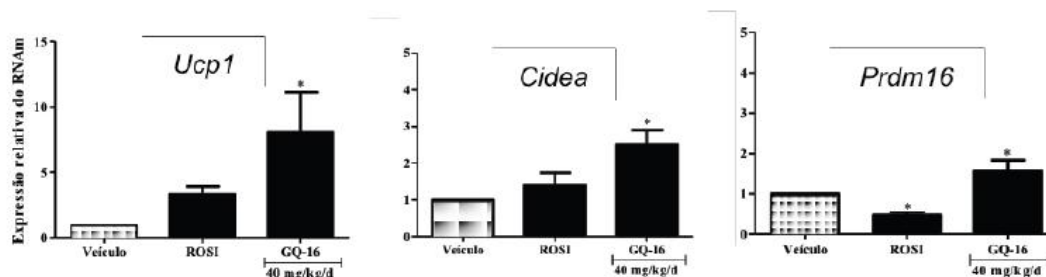


Figura 23. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco epididimal. Níveis de RNAm de *Ucp-1*, *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (40 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

No tecido adiposo branco inguinal, a expressão de *Ucp1*, *Cidea* e *Prdm16* não se modificou em resposta ao tratamento com GQ-16. A expressão de *Ucp1* diminuiu em resposta ao tratamento com RSG e a expressão de *Cidea* e *Prdm16* não se modificou (Figura 24).

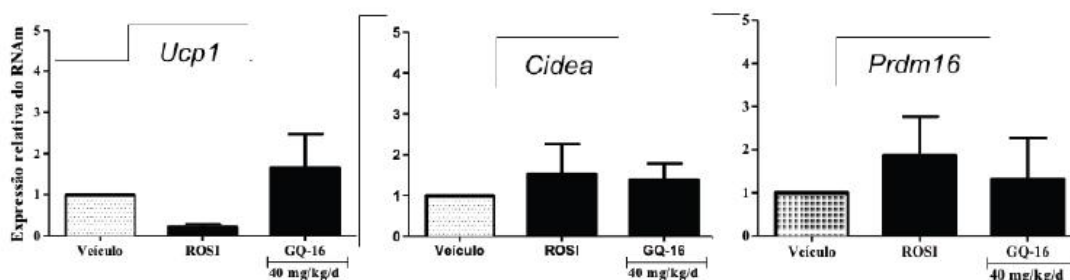


Figura 24. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco inguinal. Níveis de RNAm de *Ucp-1*, *Cidea* e *Prdm16* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (40 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

5.4 Efeitos do GQ-16 sobre a expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo

5.4.1 Estudo 1: tratamento com 5, 10 ou 20 mg/kg/d de GQ-16

O tratamento com GQ-16 nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg/d não modificou a expressão do RNAm seletivos do adipócito bege (*Cd40* e *Tmem26*) no tecido adiposo branco epididimal. A mesma resposta foi observada nos animais tratados com RSG (Figura 25).

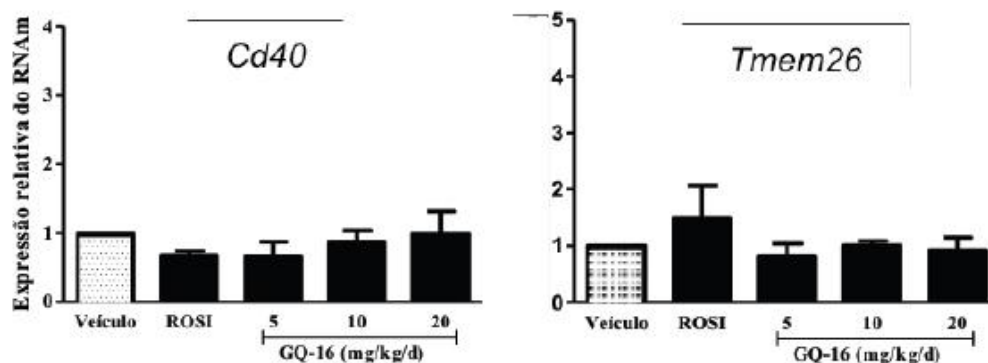


Figura 25. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco epididimal. Níveis de RNAm de *Cd40* e *Tmem26* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (5, 10 ou 20 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

No tecido adiposo branco inguinal, foi observado aumento dose-dependente da expressão de RNAm de *Cd40* e *Tmem26* em resposta ao tratamento com GQ-16, até a dose de 20 mg/kg/d. Também foi observado aumento em resposta ao tratamento com RSG (Figura 26).

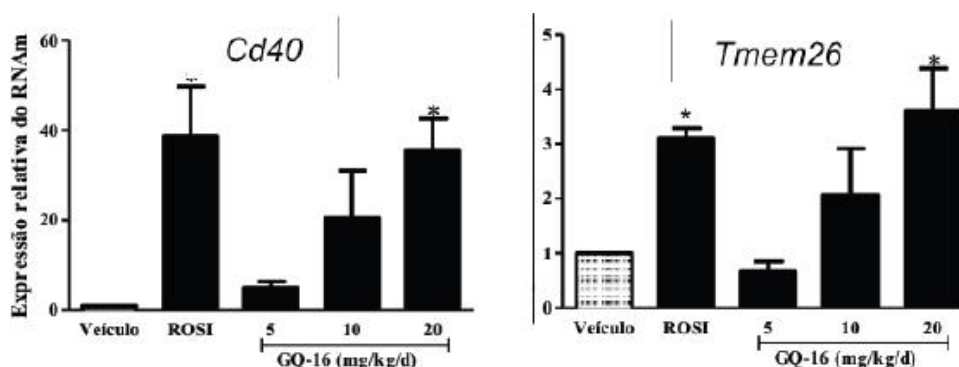


Figura 26. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco inguinal. Níveis de RNAm de *Cd40* e *Tmem26* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou GQ-16 (5, 10 ou 20 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

5.4.2 Estudo 2: tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16

Foi observada tendência de aumento da expressão do RNAm do *Cd40* em resposta ao tratamento com 40 mg/kg/d de GQ-16, embora não significativa, no tecido adiposo epididimal. A expressão de *Tmem26* não se modificou em resposta

ao tratamento com esta dose de GQ-16. Não houve modificação da expressão de *Cd40* ou *Tmem26* nos camundongos tratados com RSG (Figura 27).

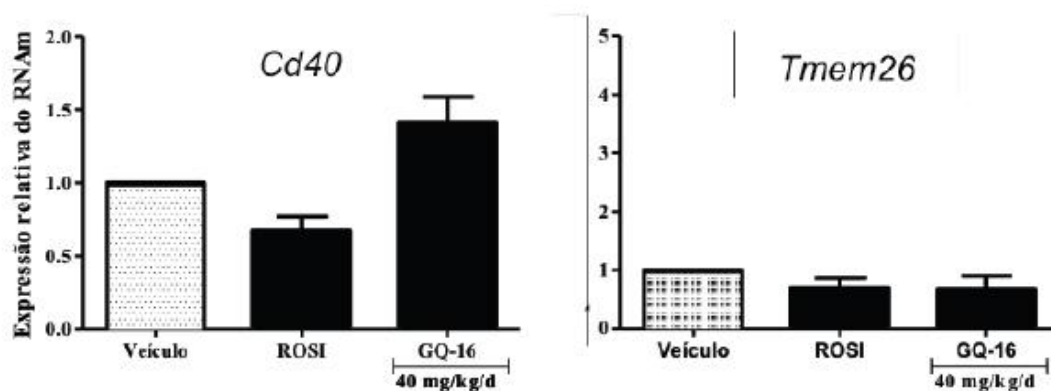


Figura 27. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco epididimal. Níveis de RNAm de *Cd40* e *Tmem26* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou QG-16 (40 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animals per group.

No tecido adiposo branco subcutâneo, houve tendência de aumento da expressão de *Cd40* em resposta ao tratamento com 40 mg/kg/d mas não ao tratamento com RSG, e tendência de aumento da expressão de *Tmem26* em resposta ao tratamento com RSG, mas não ao tratamento com GQ-16 (Figura 28).

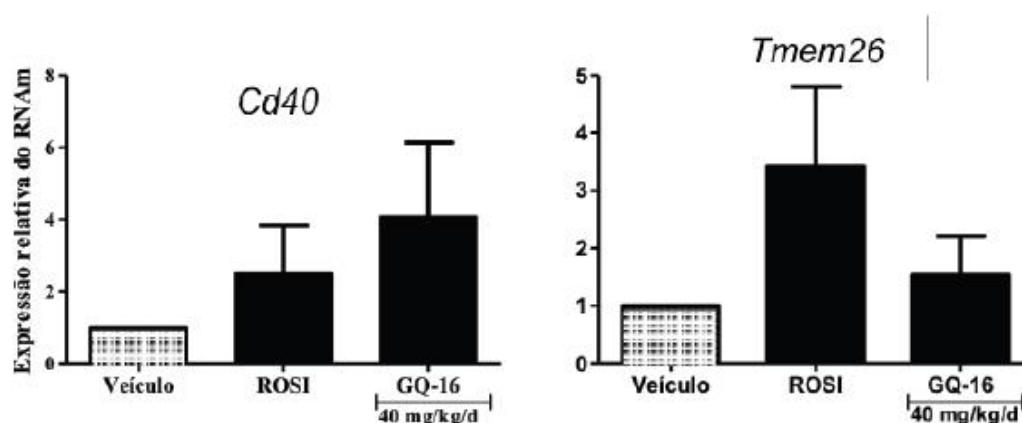


Figura 28. Expressão de genes seletivos do adipócito bege no tecido adiposo branco inguinal. Níveis de RNAm de *Cd40* e *Tmem26* nos camundongos alimentados com DHL, após duas semanas de tratamento com veículo, RSG (4 mg/kg/d) ou QG-16 (40 mg/kg/d). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo alimentado com DHL e tratado com veículo (One-way ANOVA). $n = \sim 4$ animais por grupo.

5.5 Efeitos do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo

Nos camundongos tratados com 40 mg/kg/d de GQ-16, foram avaliadas também características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular e do tecido adiposo branco epididimal e inguinal.

Foi observado aumento do acúmulo lipídico no tecido adiposo marrom interescapular em resposta à DHL, indicado pelo aumento de tamanho das gotículas lipídicas intracelulares. O tratamento com RSG ou GQ-16 reduziu esta acúmulo, porém a resposta ao GQ-16 foi mais acentuada (Figura 29).

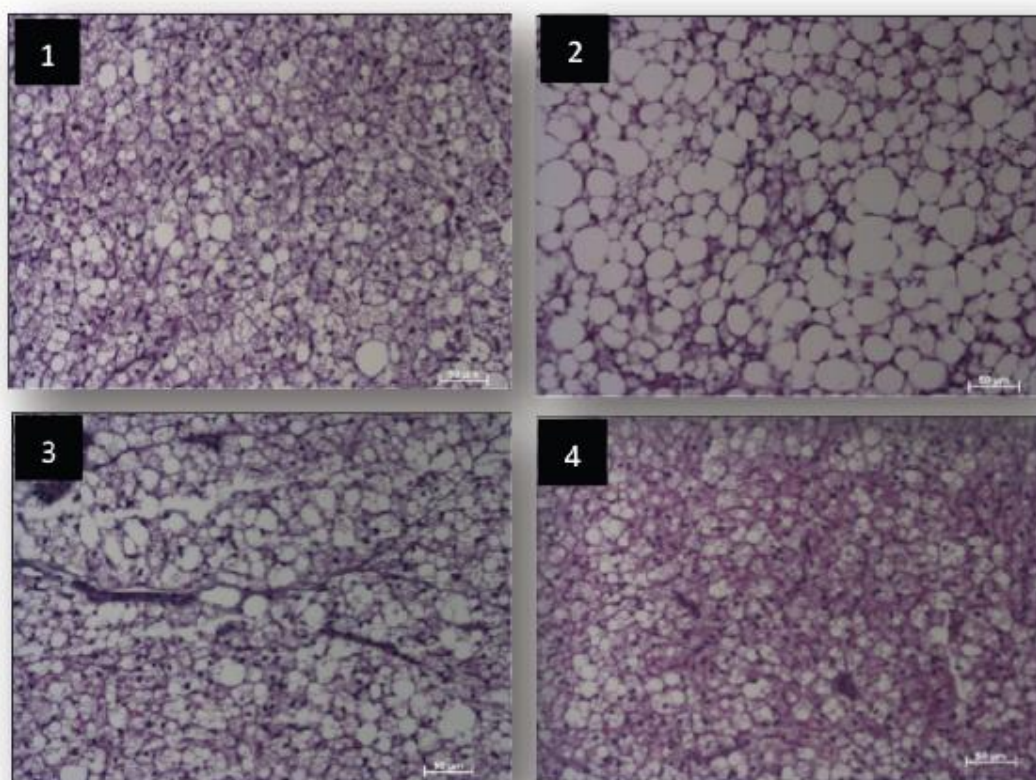


Figura 29. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular. O tratamento com GQ-16 na dose de 40 mg/kg/d, durante 14 dias, reduz o conteúdo lipídico no adipócito marrom (4). Tecido adiposo marrom interescapular corado com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo; 1 dieta controle, 2 DHL + veículo, 3 DHL + RSG (4 mg/kg/d), 4 DHL + GQ-16 (40 mg/kg/d). Imagens mostradas com aumento de 10 vezes. Escala de 50 μ m. N ~ 4 camundongos por grupo.

No tecido adiposo branco epididimal, 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. Os animais alimentados com DHL e tratados com GQ-16, no entanto, apresentaram redução do tamanho do adipócito neste depósito adiposo (Figura 30).

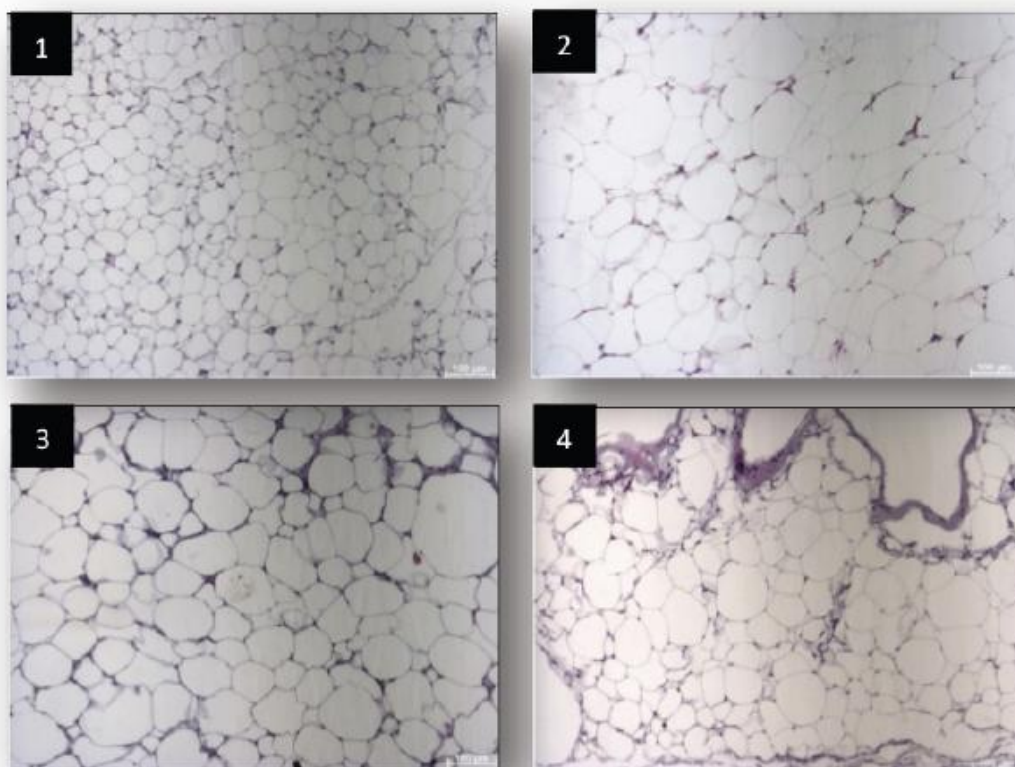


Figura 30. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo branco epididimal. O tratamento com GQ-16 na dose de 40 mg/kg/d, durante 14 dias, reduz o conteúdo lipídico no adipócito branco (4). Tecido adiposo branco epididimal corado com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo; 1 dieta controle, 2 DHL + veículo, 3 DHL + RSG (4 mg/kg/d), 4 DHL + GQ-16 (40 mg/kg/d). Imagens mostradas com aumento de 10 vezes. Escala de 100 μ m. N ~ 4 camundongos por grupo.

No tecido adiposo branco inguinal, foi verificado comportamento semelhante ao observado no tecido adiposo branco epididimal (Figura 31).

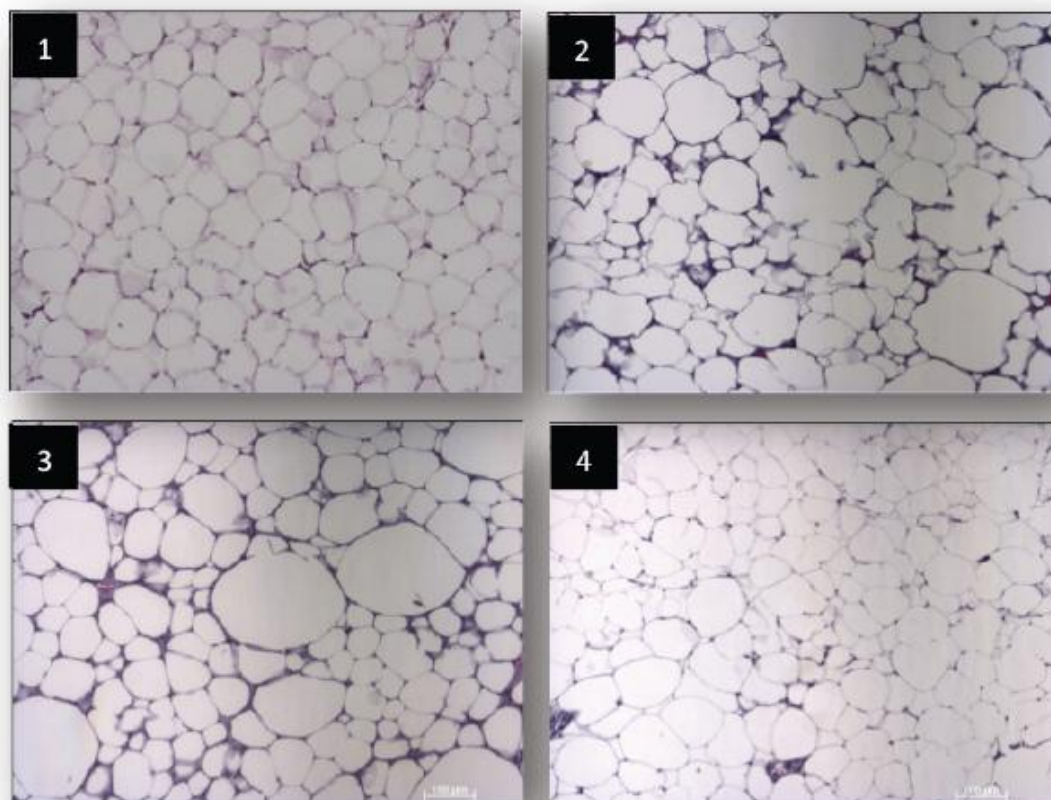


Figura 31. Efeito do GQ-16 sobre características histológicas do tecido adiposo branco inguinal. O tratamento com GQ-16 na dose de 40 mg/kg/d, durante 14 dias, reduz o conteúdo lipídico no adipócito branco (4). Tecido adiposo branco inguinal corado com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo; 1 dieta controle, 2 DHL + veículo, 3 DHL + RSG (4 mg/kg/d), 4 DHL + GQ-16 (40 mg/kg/d). Imagens mostradas com aumento de 10 vezes. Escala de 100 μ m. n ~ 4 camundongos por grupo.

6 DISCUSSÃO

Os agonistas completos de PPAR γ , como as TZDs pioglitazona e RSG, constituem estratégia efetiva para o tratamento da resistência insulínica associada ao DM2, embora sua utilização seja limitada por uma série de efeitos desfavoráveis, incluindo ganho de peso, retenção hídrica, perda de massa óssea e possivelmente, no caso da RSG, toxicidade cardiovascular ¹⁴. O interesse pelo PPAR γ como alvo farmacológico, no entanto, foi renovado nos últimos anos em razão da melhor compreensão a respeito dos mecanismos de ação das TZDs e também de vias moleculares reguladas pelo receptor e que estão envolvidas nos benefícios metabólicos resultantes de sua ativação. Recentemente, foi demonstrado que o efeito de agonistas completos e parciais do PPAR γ pode não ser somente relacionado à sua atividade agonista clássica, mas também à sua capacidade de bloquear a fosforilação da serina 273 do PPAR γ , mediada pela ciclina 5 dependente de quinase ^{46,49}. Outro benefício potencial dos agonistas de PPAR γ é a indução do aparecimento, no tecido adiposo branco, de adipócitos com fenótipo semelhante ao do adipócito marrom, ou o amarronzamento do tecido adiposo branco. Estes adipócitos, denominados adipócitos bege, apresentam capacidade plena de executar a termogênese ¹³. O amarronzamento do tecido adiposo branco, entretanto, parece requerer agonismo completo do PPAR γ ¹³, como o observado em resposta à ligação das TZDs ao receptor, e não foi observado em resposta à ligação de um agonista parcial. Neste estudo, foi verificado que o GQ-16, um agonista parcial de PPAR γ derivado de TZD ⁴⁵, induziu um padrão de expressão gênica no tecido adiposo branco semelhante ao do adipócito marrom.

O tratamento de camundongos obesos e hiperglicêmicos com GQ-16 (20 e 40 mg/kg/d) reduziu o ganho de peso e de massa adiposa visceral em resposta à DHL, reduziu a glicemia em jejum e aumentou a ingestão de energia. A observação de redução do ganho de peso simultaneamente ao aumento da ingestão de energia foi considerada sugestiva de aumento do gasto energético nos camundongos tratados com GQ-16. Considerando-se que o GQ-16 é um agonista seletivo de PPAR γ ⁴⁵ e que o PPAR γ apresenta expressão elevada no tecido adiposo ⁵⁰, este achado motivou a investigação da indução de amarronzamento do tecido adiposo branco em

resposta ao tratamento com GQ-16. Embora não tenha sido avaliado o gasto energético dos camundongos, foi observado que o tratamento com GQ-16 aumentou a expressão do RNAm dos genes *Ucp1* e *Cidea* no tecido adiposo branco epididimal (visceral), mas não no inguinal (subcutâneo). Este achado foi acompanhado de redução da massa adiposa epididimal e do tamanho do adipócito epididimal, e pode ser indicativo de aumento da lipólise e respiração desacoplada (termogênese) neste depósito adiposo. Isto, por sua vez, pode ter contribuído para a redução do ganho de peso. Em animais tratados com a dose mais elevada de GQ-16 (40 mg/kg/d), não é possível excluir que um possível aumento do gasto energético possa ter sido também mediado por aumento da atividade do tecido adiposo marrom. O grupo de camundongos tratado com esta dose de GQ-16 apresentou redução da massa de tecido adiposo marrom interescapular, além de aspecto mais escurecido deste depósito e redução do tamanho da gotícula lipídica no adipócito marrom. Estas são características que podem indicar aumento da atividade deste tecido ¹⁷.

O efeito dos agonistas completos de PPAR γ em promover características semelhantes às do adipócito marrom no tecido adiposo branco, como aumento da biogênese mitocondrial e da expressão da UCP1, foi descrito há mais de uma década por diferentes grupos de pesquisa ^{12,51-53}. Estudos mais recentes forneceram evidências inequívocas de que estas células compreendem um tipo celular distinto. Apresentam origens diferentes das do adipócito marrom ^{5,30}, assim como perfil de expressão gênica característico ⁵. Estes estudos também apontaram para os possíveis mecanismos envolvidos no amarronzamento do tecido adiposo branco em resposta à ativação do PPAR γ .

Foi mostrado que o amarronzamento do tecido adiposo branco em resposta a agonistas completos de PPAR γ ocorre preferencialmente no tecido adiposo branco subcutâneo e é em grande parte determinado por estabilização e aumento dos níveis de PRDM16 ¹³, um coregulador da transcrição implicado no desenvolvimento do adipócito marrom ²⁶ e também do bege ²⁴. Alguns destes estudos indicaram também que o amarronzamento do tecido adiposo branco está associado a aumento do consumo de oxigênio (indicador de termogênese) somente diante de estimulação β 3-adrenérgica, tanto em cultura ¹² quanto *in vivo* ⁵. Estes achados são consistentes com a observação de que as TZDs não resultam, por si sós, em aumento do gasto

energético⁵⁵. Embora induzam a expressão de um “programa genético” termogênico no tecido adiposo branco, que presumivelmente estaria associado a aumento do gasto energético e possivelmente perda de peso, o tratamento com TZDs está associado a aumento do peso¹⁴. Alguns agonistas parciais de PPAR γ , diferentemente, estão associados a redução de ganho de peso em modelos de obesidade⁵⁶⁻⁵⁸. Isso sugere a possibilidade de que seu efeito sobre o peso seja mediado por amarronzamento do tecido adiposo branco e aumento da termogênese. Entretanto, nenhum dos agonistas parciais de PPAR γ estudados até o momento em relação a este processo associou-se a aumento da expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco¹³. Em contraste com estes dados, nossos resultados indicam que o agonista parcial de PPAR γ GQ-16 aumenta a expressão de *Ucp1* e *Cidea* preferencialmente no tecido adiposo branco visceral. Destes resultados, surgem dois pontos de questionamento: o que explicaria a indução preferencial da expressão de *Ucp1* e *Cidea* no tecido adiposo branco visceral? O que explicaria o amarronzamento do tecido adiposo branco induzido por um agonista parcial de PPAR γ ?

O aparecimento de adipócitos bege no tecido adiposo branco varia entre diferentes linhagens de camundongos em resposta à ativação do PPAR γ ¹², assim como o que se observa em resposta à ativação simpática^{6,29}. É possível também que a resposta de diferentes depósitos de tecido adiposo aos efeitos amarronzadores dos agonistas de PPAR γ também seja diferente, de forma que em algumas linhagens de camundongos haja efeito preferencial sobre o tecido adiposo branco subcutâneo e, em outras, sobre o tecido adiposo branco visceral. De fato, estudos envolvendo diferentes linhagens de camundongos mostraram que embora na maioria delas os efeitos amarronzadores dos agonistas de PPAR γ ocorram no tecido adiposo branco subcutâneo, a indução da expressão de genes relacionados à termogênese também é observada no tecido adiposo branco visceral. Em camundongos obesos KKAy, as TZDs pioglitazona, troglitazona e NC-2100 induziram a expressão do RNAm do gene *Ucp1* no tecido adiposo branco visceral (mesentérico)⁵¹. Diferentemente, em camundongos C57Bl/6J *db/db*, o tratamento com RSG induziu a expressão do RNAm do gene *Ucp1* no tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal)⁵². Um efeito semelhante foi observado em camundongos

C57Bl/6J selvagens tratados com o agonista total de PPAR γ COOH ⁵². Camundongos FVB machos tratados com este mesmo agonista, COOH, apresentaram aumento da expressão do gene *Ucp1* no tecido adiposo branco visceral (mesentérico e epididimal) e também no subcutâneo ⁵⁹. No presente estudo, foi observado que camundongos Swiss machos com obesidade induzida por DHL apresentaram indução preferencial de genes relacionados à termogênese (*Ucp1* e *Cidea*) no tecido adiposo branco visceral (epididimal) em resposta ao tratamento com o derivado de TZD GQ-16. Além disto, nossos dados indicaram que nesses animais não houve indução da expressão destes genes em resposta à RSG no tecido adiposo branco visceral ou subcutâneo. Isto pode indicar que a linhagem de camundongos estudada, Swiss, seja menos propensa ao amarronzamento do tecido adiposo branco induzido pela RSG, ou que depósitos adiposos não analisados neste estudo, como o mesentérico, retroperitoneal ou subcutâneo anterior, responderiam ao efeito amarronzador da RSG.

Foi observada também indução da expressão dos genes seletivos do adipócito bege (*Tmem26* and *Cd40*) ⁵ no tecido adiposo branco subcutâneo, mas não no epididimal, em resposta ao GQ-16 e à RSG, embora os genes relacionados à termogênese tenham sido induzidos no tecido adiposo branco epididimal. Os genes seletivos do adipócito bege foram descritos recentemente em adipócitos diferenciados em cultura a partir da fração stromal vascular de depósitos adiposos inguinais (subcutâneos) de camundongos 129SVE ⁵. É possível que os adipócitos bege recrutados no tecido adiposo branco visceral em resposta aos agonistas do PPAR γ expressem baixos níveis destes marcadores, ou mesmo que estas células apresentem uma assinatura genética distinta.

A outra questão é como o GQ-16, um agonista parcial do PPAR γ , promoveria o amarronzamento do tecido adiposo branco, considerando que outros agonistas parciais já foram investigados com relação a este aspecto e não foi observado efeito. A indução do amarronzamento do tecido adiposo branco em resposta a agonistas totais mas não parciais do PPAR γ sugere que a conformação do LBD do PPAR γ ligado ao agonista total seja necessária para recrutar os adipócitos bege ¹³. Uma característica marcante de agonistas totais, como as TZDs, é de se ligar ao LBD do PPAR γ e estabilizar a hélice 12 ⁶⁰, ao passo que agonistas parciais tipicamente

modificam a conformação da hélice 3, sem modificar a conformação da hélice 12⁶¹. O GQ-16 é um agonista parcial de PPAR γ com modo de ligação singular ao LBD do PPAR γ , quando comparado a outros agonistas parciais. Embora não estabeleça nenhum contato direto com a hélice 12, é capaz de estabilizar sua conformação⁴⁵. Simulações de dinâmica molecular sugerem que esse efeito seja mediado por uma molécula de água, que promove uma interação indireta entre o GQ-16 e o LBD do PPAR γ ⁴⁵. A conformação estabilizada da hélice 12 no complexo PPAR γ :GQ-16 poderia explicar os efeitos amarronzadores do tecido adiposo branco em resposta ao tratamento com este agonista parcial.

Em resumo, nossos dados indicam que o agonista parcial de PPAR γ GQ-16 induz redução do ganho de peso e da massa adiposa visceral em resposta à DHL, apesar de aumentar o consumo de energia. Estes efeitos foram acompanhados da indução da expressão de genes relacionados à termogênese (*Ucp1* and *Cidea*) no tecido adiposo branco epididimal, sugerindo que o amarronzamento do tecido adiposo visceral tenha contribuído, pelo menos em parte, para a redução do ganho de peso. A importância do adipócito bege para a homeostase energética foi claramente demonstrada em roedores⁷, e os dados indicando que os depósitos de tecido adiposo previamente identificados como marrons no humano adulto sejam constituídos em grande parte por adipócitos bege indicam a possibilidade de traduzir os conhecimentos a respeito da biologia dos adipócitos bege dos roedores para os humanos. Neste contexto, os resultados do presente estudo sugerem que a ativação do PPAR γ por agonistas parciais, que não estão associados a efeitos desfavoráveis relacionados ao agonismo completo, possa ser uma estratégia efetiva para induzir amarronzamento do tecido adiposo branco e, assim, tratar a obesidade e o diabetes.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que, em camundongos Swiss machos:

- O tratamento com GQ-16 nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg/d, durante 2 semanas, reduziu o ganho de peso associado à DHL;
- O tratamento com GQ-16 nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg/d, durante 2 semanas, reduziu a hiperglicemia induzida por DHL;
- O tratamento com GQ-16 nas doses de 20 e 40 mg/kg/d, durante 2 semanas, aumentou o consumo de energia;
- O tratamento com GQ-16, nas doses de 20 e 40 mg/kg/d reduziu o ganho de massa adiposa branca epididimal em resposta à DHL;
- O tratamento com GQ-16 induziu aumento da expressão de genes relacionados à termogênese (*Ucp1*, *Cidea* e *Prdm16*) no tecido adiposo branco epididimal, de forma dose-dependente.
- O tratamento com GQ-16 na dose de 5 mg/kg/d induziu aumento da expressão do RNAm do gene *Ucp1* no tecido adiposo branco inguinal, porém não houve modificação em resposta às demais doses (10, 20 e 40 mg/kg/d) nem modificação da expressão do RNAm dos outros genes relacionados à termogênese analisados (*Cidea* e *Prdm16*).
- O tratamento com GQ-16 na dose de 20 mg/kg/d induziu a expressão do RNAm de genes seletivos do adipócito bege (*Cd40* e *Tmem26*) no tecido adiposo branco inguinal, porém não houve modificação da expressão destes genes em respostas às demais doses testadas, nem no tecido adiposo branco epididimal.
- O tratamento com GQ-16, na dose de 40 mg/kg/d, reduziu o acúmulo lipídico no tecido adiposo marrom interescapular e reduziu o tamanho do adipócito no tecido adiposo branco epididimal e inguinal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 6ª ed.* Bruxelas, Bélgica: International Diabetes Federation, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas> [acesso em 10 de novembro de 2014].
2. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009; Apr 9;360(15):1509-17.
3. Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. [Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.](#) *N Engl J Med.* 2009; Apr 9;360(15):1500-8.
4. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009; Apr 9;360(15):1518-25.
5. 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; Jul 20;150(2):366-76.
6. Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* 2007; Jan ;48(1):41-51.
7. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRMD16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell.* 2014; Jan 16;156(1-2):304-16.
8. [Lidell ME](#), Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013; Sep 10;19(5):631-4.
9. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. [Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat.](#) *Nat Med.* 2013;May;19(5):635-9.
10. [Jespersen NZ](#), [Larsen TJ](#), Peijs L, Daugaard S, Homoe P, Loft A, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 2013; May 7;17(5):798-805.
11. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. [Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells.](#) *PLoS One.* 2012; Nov 16;7(11):e49452.
12. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2010; Mar 5;285(10):7153-64.

13. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 2012; Mar 7;15(3):395-404.
14. 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; May;19(5):557-66.
15. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Ob Rev.* 2010; Jan;11(1):11-8.
16. Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise Review: Adipocyte Origins: Weighing Possibilities. *Stem Cells.* 2011; Jul;29(7):1034-40.
17. Cannon B, Nedegaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Phys Rev.* 2004; Jan;84(1):277-359.
18. Richard D, Picard F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci.* 2011; Jan 1;16():1233-60.
19. Enerback S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009; May 7;360(19):2021-3.
20. Celi FS. Brown adipose tissue - when it pays to be inefficient. *N Engl J Med.* 2009; Apr 9;360(15):1553-56.
21. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014; Jan 16; 156(1-2):20-44.
22. Seale P, Kajimura S, Spiegelman B. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function of mice and men. *Genes Dev.* 2009; Apr 1;23(7):788-97.
23. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedegaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009; Feb;9(2):203-9.
24. Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab.* 2010; Apr 7;11(4):257-62.
25. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013; Oct; 19(10):1252-63.
26. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nat Med.* 2008; Aug 21;14(8):961-7.
27. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *PNAS.* 2011; Jan 4;108(1):143-8.
28. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992; Dec;101():931-42.

29. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998; Jul 15;102(2):412-20..
30. Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* 2014; May 6;19(5):810-20.
31. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013; Dec 12;5(5):1196-203.
32. Ye L, Wu J, Cohen P, Kazak L, Khandekar MJ, Jedrychowski MP, et al. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *PNAS.* 2013; Jul 23;110(30):12480-5.
33. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee K, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; Dec;58(4):726-41.
34. Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2006; Mar;116(3):556-60.
35. Robinson-Rechavi M, G HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003; Feb 15;116();585-6.
36. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006; Mar;116(3):581-9.
37. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995; Jun 2;270(22):12953-6.
38. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000; Jun 1;14(11):1293-307.
39. 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; Sep 5;278(36):34268-76.
40. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, et al. Muscle specific PPAR γ deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* 2003; Dec; 9(12):1491-7.
41. Miles PD, Barak Y, He W, Evan RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest.* 2000; Feb; 105(3):287-92.
42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem.* 2001; Nov 2;276(44):41245-54.

43. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPAR γ modulation for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2007; Aug;1771(8):1094-107.
44. Rubenstrunk A, Hanf R, et al. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochim Biophys Acta* 2007 Aug;1771(8):1065-81. Epub 2007 Feb 24.
45. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. [GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor \$\gamma\$ \(PPAR \$\gamma\$ \) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain.](#) *J Biol Chem*. 2012;287(33):28169-79.
46. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature*. 2010; Jul 22;466(7305):451-6.
47. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8^a edição, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies, National Academy of Sciences, 2011.
48. Mourão RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*. 2005; Nov; 40(11):1129-33.
49. [Choi SS](#), [Kim ES](#), Koh M, Lee SJ, Lim D, Yang YR, et al. Novel non-agonist peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand UHC1 blocks PPAR γ phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and improves insulin sensitivity. *J Biol Chem*. 2014; Sep 19;289(38):26618-29.
50. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, et al. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse.](#) *PNAS*. 2004; Mar 30;101(13) 4543-7.
51. Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR- γ activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes*. 2000; May;49(5):759-67.
52. Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology*. 2004; Aug;145(8):3925-34.
53. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*. 2004; Nov;114(9):1281-9.
54. 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. *J Clin Invest*. 2011; Jan;121(1):96-105.
55. [Joosen AM](#), [Bakker AH](#), Gering MJ, Westerterp. The effect of the PPAR γ ligand

rosiglitazone on energy balance regulation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; May-Jun;22(3):204-10.

56. [Berger JP](#), [Petro AE](#), Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Mol Endocrinol.* 2003; Apr; 17(4):662-76.

57. Misra P, Chakrabarti R, Vikramadithyan RK, Bolusu G, Juluri S, Hiriyani J, et al. PAT5A: a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a potent antidiabetic thiazolidinedione yet weakly adipogenic. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; Aug; 306(2):763-71.

58. Kim KR, Lee JH, Kim SJ, Rhee SD, Jung WH, Yang SD, et al. KR-62980: a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist with weak adipogenic effects. *Biochem Pharmacol.* 2006; Aug 14;72(4):446-54.

59. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes.* 2007; Jul 56(7):1751-60.

60. Nolte RT, Wisely G, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokava R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature.* 1998; Sep 10;395(6698):137-3.

61. Bruning JB, Chalmers MJ, Prasad S, Busby SA, Kamenecka TM, He Y, et al. Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure.* 2007; Oct;15(10):1258-71.

**ANEXO I – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO
COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Brasília, 29 de março de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "Avaliação do potencial terapêutico do GO-16, um novo ligante sintético do PPAR-gama, em diferentes modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina", UnBDoc 27455/2011, sob responsabilidade da Michella Soares Coelho, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM