



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daiana Araujo de Santana Oliveira

**Efeitos da associação do agonista PPAR-alfa e inibidor do dipeptidil
peptidase 4 na indução de adipócitos bege no tecido adiposo branco
subcutâneo de camundongos obesos**

Rio de Janeiro

2021

Daiana Araujo de Santana Oliveira

**Efeitos da associação do agonista PPAR-alfa e inibidor do dipeptidil peptidase 4
na indução de adipócitos bege no tecido adiposo branco subcutâneo de
camundongos obesos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza-Mello

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Daiana Araujo de Santana.

Efeitos da associação do agonista PPAR-alfa e inibidor do dipeptidil peptidase 4 na indução de adipócitos bege no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos obesos / Daiana Araujo de Santana Oliveira. – 2021.

80 f.

Orientadora: Vanessa de Souza Mello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade – Metabolismo – Teses. 2. PPAR alfa – Teses. 3. Inibidores da Dipeptidil Peptidase 4 – Teses. 4. Adipócitos Bege - Teses. 5. Termogênese – Teses. 6. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Souza-Mello, Vanessa de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 577.25:616.399

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daiana Araujo de Santana Oliveira

**Efeitos da associação do agonista PPAR-alfa e inibidor do dipeptidil peptidase 4
na indução de adipócitos bege no tecido adiposo branco subcutâneo de
camundongos obesos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2021.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza-Mello (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Isabele Briguenti Sarmento
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

A minha família pelo apoio diário e todo amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, vocês são os meus maiores exemplo e cada conquista minha é por vocês. Vocês dedicaram a vida para mim e meu irmão e sempre disseram que a nossa maior herança seria os estudos. Obrigada por não me deixarem desistir dos meus sonhos e sempre apoiarem minhas escolhas. Eu amo vocês além dessa vida.

Ao meu irmão, por todo amor e amizade, você me deu força para seguir em frente e valorizar cada momento desta vida. Sou grata demais ao nosso companheirismo e por ter me dado a nossa Luísa.

A minha avó Maria Damiana, que mesmo não estando presente fisicamente, me direcionava em cada momento, principalmente nos mais difíceis. A senhora sempre será meu exemplo de força e perseverança.

As minhas tias e madrinha, Léa, Lúcia e Nice, por todo amor e incentivo, sou muito grata por ter vocês em todos os momentos da minha vida.

A minha prima Cristiane, eu não tenho palavras para descrever o quanto sou grata por tudo que você faz por mim e por toda nossa família. Você é a base da nossa união e a pessoa que eu mais confio nessa vida. Ser madrinha da Beatriz é um privilégio e dedico grande parte da minha conquista a você.

A minha prima Danielle, que se faz presente em todos os momentos com todo seu amor e me presenteou com o Victor e Giovanna, sempre farei de tudo para ser um exemplo aos seus filhos.

À toda minha família, por continuarmos seguindo todos os ensinamentos da Dona Maria Damiana. Amo vocês.

As minhas amigas da vida, Aghata e Paula, apesar de sermos tão diferentes nossa torcida e amor uma pela outra é incondicional. Obrigada por estarem sempre presente.

Aos meus amigos, Vinicius e Mariana, Vinicius por ser meu primeiro amigo da vida, por ter acompanhado cada conquista e por ter me apresentado Mariana, que se tornou meu par da vida, a quem sempre posso confiar.

A minha dupla Aline, foi um presente ter você junto comigo nessa jornada, sem dúvidas essa conquista é nossa. Compartilhamos todos os momentos do mestrado e isso deixou o caminho mais leve e feliz. Obrigada por tanto e continuaremos juntas na próxima etapa.

Às Vanessetes, Flávia, Carolline, Brenda, Camilla, Fabiane, Isabella e Fernanda, sem dúvidas nossa união é a chave das nossas conquistas. Sou muito grata por partilhar a vida científica com vocês.

Aos meus colegas de laboratório, pelos ensinamentos e por toda ajuda, nada seria possível sem vocês, em especial a Aline Penna que além de todo auxílio se tornou uma amiga para vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda por contribuir com o meu crescimento e com o desenvolvimento desse trabalho.

Ao corpo docente que integra o programa de pós-graduação, em especial a Prof^a. Dr^a. Sandra Barbosa que sempre está disposta a ajudar os alunos.

Aos técnicos e funcionários da UERJ por todo suporte oferecido.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Vanessa Souza-Mello, que me recebeu depois de um email e me acolheu com todo carinho para viver esse sonho, mesmo eu tendo vindo de um mundo completamente diferente. Obrigada por acreditar e tanto me ensinar ao longo dessa caminhada. Me estimula todos os dias a ser uma pessoa melhor em todos os aspectos da vida. Você é uma referência na minha vida e sou muito grata por ter me aceitado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

Simone de Beauvoir

RESUMO

OLIVEIRA, Daiana Araujo de Santana. *Efeitos da associação do agonista PPAR-alfa e Inibidor da Dipeptidil Peptidase 4 na indução de adipócitos bege no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos obesos*. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O consumo excessivo de gordura saturada na dieta causa um desequilíbrio na homeostase energética, que é uma das principais causas para o desenvolvimento da obesidade e, consequentemente, da disfunção adipocitária. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma-alfa (PPAR- α) desempenha um papel primordial no *browning* dos adipócitos brancos, assim como os inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4i) podem melhorar a termogênese. Este estudo procurou avaliar a associação do agonista PPAR- α (WY14643) e do DPP-4i (linagliptina) na remodelação subcutânea do tecido adiposo branco e indução da termogênese em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura. Quarenta camundongos C57BL/6 machos (três meses de idade) foram designados aleatoriamente para receber uma dieta de controle (C, 10% de energia como lipídios) ou uma dieta rica em gordura (HF, 50% de energia como lipídios) por doze semanas. Então, cada grupo foi subdividido em dois grupos para iniciar o tratamento que durou cinco semanas: C, CT (dieta C mais agonista PPAR- α e DPP-4i), HF, HFT (dieta HF mais agonista PPAR- α e DPP-4i). Os medicamentos foram misturados às dietas na dose de 2,5 mg/kg de massa corporal para WY14643 e 15 mg/kg de massa corporal para linagliptina. Os animais do grupo HF apresentaram excesso de peso, intolerância oral à glicose, hipertrofia adipocitária, acúmulo substancial de gordura intra-abdominal e subcutânea. Por outro lado, o tratamento foi capaz de normalizar estes parâmetros, além de aumentar a temperatura corporal, a presença de adipócitos multiloculares (bege) e a alta expressão dos genes marcadores termogênicos. Estas observações apontam para a ativação da cascata marrom no tecido adiposo branco subcutâneo concomitante com efeitos antiinflamatórios perceptíveis e alívio do estresse do retículo endoplasmático. Assim, a associação do agonista PPAR- α com o DPP-4i surge como um alvo promissor para o controle da obesidade através da indução de células bege e termogênese adaptativa.

Palavras-chave: Obesidade. PPAR- α . DPP4i. Adipócitos bege. Termogênese.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Daiana Araujo de Santana. *Effects of the association of the PPAR-alpha agonist and Dipeptidyl Peptidase 4 inhibitor on the induction of beige adipocytes in the subcutaneous white of obese mice*. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Excessive dietary intake of saturated fat causes an imbalance in energy homeostasis, which is one of the leading causes for the development of obesity and, consequently, adipocyte dysfunction. Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) plays a paramount role in the browning of white adipocytes, as well as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP-4i) can enhance thermogenesis. This study sought to evaluate the association of the PPAR-alpha agonist (WY14643) and DPP-4i (linagliptin) on the subcutaneous white adipose tissue remodeling and thermogenesis induction in mice fed a high-fat diet. Forty male C57BL/6 mice (three months old) were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% energy as lipids) or a high-fat diet (HF, 50% energy as lipids) for twelve weeks. Then, each group was subdivided into two groups to start the treatment that lasted five weeks: C, CT (C diet plus PPAR- α agonist and DPP-4i), HF, and HFT (HF diet plus PPAR- α agonist and DPP-4i). Drugs were mixed to the diets at a dose of 2.5 mg/kg body mass for WY14643 and 15 mg/kg body mass for linagliptin. The animals in the HF group showed overweight, oral glucose intolerance, adipocyte hypertrophy, substantial accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat. Conversely, the treatment was able to normalize these parameters, besides increasing the body temperature, the presence of multilocular adipocytes (beige), and the high expression of thermogenic markers genes. These observations point to the activation of the browning cascade in the subcutaneous white adipose tissue concomitant with noticeable anti-inflammatory effects and endoplasmic reticulum stress alleviation. Hence, the association of the PPAR- α agonist with DPP-4i emerges as a promising target for obesity control through the induction of beige cells and adaptive thermogenesis..

Keywords: Obesity. PPAR- α . DPP-4i. Beige adipocytes. Thermogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Obesidade e suas comorbidades.....	19
Figura 2 –	Eutrofia e Obesidade.....	21
Figura 3 –	Dieta normolipídica x dieta hiperlipídica.....	24
Quadro 1 –	Diferença entre os adipócitos brancos, marrons e beges.....	26
Figura 4 –	Representação esquemática dos adipócitos.....	27
Figura 5 –	Diferenciação em adipócitos brancos, bege e marrons.....	29
Figura 6 –	Resumo da cascata termogênica.....	31
Figura 7 –	Mecanismo de ação do PPAR.....	33
Figura 8 –	Inibição da DPP-4.....	37
Figura 9 –	Desenho experimental.....	40
Quadro 2 –	Detalhamento dos primers utilizados.....	45
Figura 10 –	Evolução da Massa Corporal e distribuição de gordura.....	48
Figura 11 –	Distribuição de gordura.....	49
Figura 12 –	Metabolismo de carboidratos: Curva glicêmica, área sob a curva, insulina plasmática e GLP-1 plasmático.....	51
Figura 13 –	Morfologia e estereologia do TABs e leptina.....	52
Figura 14 –	Imunofluorescência e termografia.....	53
Figura 15 –	Genes marcadores termogênicos.....	55
Figura 16 –	Genes marcadores da inflamação.....	56
Figura 17 –	Genes marcadores do estresse do reticulo endoplasmático.....	57
Figura 18 –	Genes marcadores da oxidação lipídica e metabolismo energético celular.....	58
Figura 19 –	Resumo gráfico dos resultados.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional das dietas experimentais.....	41
Tabela 2 –	Comportamento alimentar.....	48
Tabela 3 –	Termografia e calorimetria indireta.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos Graxos livres
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASC	Área sob a curva do TOTG
ATF2	Fator de ativação transcricional 2
ATF4	Fator de ativação transcricional 4
ATP	Adenosina trifosfato
BMP-7	Proteína morfogenética óssea 7
BMP-8	Proteína morfogenética óssea 8
C	Grupo alimentado com dieta controle
cDNA	DNA complementar
C/EBPs	Proteína ligadora de CCAAT
CHOP	Proteína homóloga C/EBP
CIDEA	Ativador de morte celular CIDE-A
CPT1	Carnitina palmitol transferase 1
CPT1B	Carnitina palmitol transferase 1 B
CT	Grupo alimentado com dieta controle tratado com PPAR- e DPP4I
DIO	Obesidade induzida por dieta
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase- 4
DPP4I	Inibidor da DPP-4
GADD45	Gene de parada de crescimento e dano ao DNA
GIP	Peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLUT	Transportador de glicose
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (High-fat)
HFT	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica tratado com PPAR- α e DPP4i

IMC	Índice de massa corporal
IL-6	Interleucina-6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MC	Massa Corporal
NEFA	Ácidos graxos não esterificados plasmáticos
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Domínio pirina da família NLR contendo 3
NRF1	Fator respiratório nuclear 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
P38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
PDK4	Piruvato desidrogenase lipoamida quinase isozima 4
PET	Tomografia por emissão de prótons
PGC1 α	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PKA	Proteína cinase A dependente de AMPc
PLIN1	Perilipina 1
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPAR α	Receptores ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR- β/δ	Receptores ativado por proliferadores de peroxissoma beta/delta
PPAR- γ	Receptores ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPERs	Elementos responsivos ao PPAR
PRDM16	Domínio PR contendo 16
QA	Densidade numérica de adipócitos por área
q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
QR	Quociente respiratório
RE	Reticulo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RNA _m	RNA mensageiro
R β 3A	Receptor beta-3 adrenérgico
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco

TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Tecido adiposo marrom
TFAM	Fator transcricional mitocondrial A
TLR4	Receptor toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
UCP1	Proteína desacopladora 1
VCO2	Volume de gás carbônico produzido
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VO2	Volume de oxigênio consumido
VV	Densidade de Volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1	Obesidade	18
1.2	Modelo experimental de obesidade: Dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6	21
1.3	Tecido adiposo	24
1.4	Adipogênese.....	27
1.5	Termogênese adaptativa no TABs.....	29
1.6	PPAR.....	32
1.6.1	<u>PPAR-α</u>.....	33
1.7	Inibição da DPP-4.....	34
1.7.1	<u>DPP-4</u>	34
1.7.2	<u>Incretinas</u>.....	35
1.7.3	<u>Linagliptina</u>.....	36
2	OBJETIVO.....	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Objetivos Específicos.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Animais e Dieta.....	39
3.2	Massa Corporal, ingestão alimentar e ingestão energética.....	41
3.3	Teste de tolerância oral à glicose.....	42
3.4	Calorimetria Indireta.....	42
3.5	Termografia.....	42
3.6	Eutanásia.....	43
3.7	Análise Plasmática.....	43
3.8	Microscopia de luz e estereologia.....	44
3.9	Imunofluorescência.....	44
3.10	PCR quantitativo em tempo real.....	45
3.11	Análise Estatística.....	46
4	RESULTADOS	47

4.1	Comportamento alimentar e Massa corporal.....	47
4.2	Distribuição de gordura.....	48
4.3	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG), insulina plasmática e GLP-1 plasmático.....	49
4.4	Morfologia do TABs e Leptina.....	51
4.5	Calorimetria indireta, imunofluorescência e termografia	52
4.6	PCR quantitativo em tempo real.....	54
4.6.1	<u>Expressão Gênica: Marcadores Termogênicos.....</u>	54
4.6.2	<u>Expressão Gênica: Marcadores inflamatórios.....</u>	55
4.6.3	<u>Expressão Gênica: Marcadores do estresse do RE.....</u>	56
4.6.4	<u>Expressão Gênica: Marcadores da oxidação lipídica e metabolismo energético celular.....</u>	57
5	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	78
	ANEXO B - Submissão do artigo de revisão (Minor revision European Journal of Nutrition).....	79
	ANEXO C - Submissão do artigo original (R1 Molecular and Cellular Endocrinology).....	80

INTRODUÇÃO

A crescente prevalência da obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento vem sendo considerada uma pandemia global (1), cuja presença aumenta o risco de comorbidades por doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, esteatose hepática e alguns tipos de câncer (2, 3). Entre os múltiplos fatores etiológicos da obesidade, destacam-se as mudanças do comportamento alimentar e estilo de vida, principalmente pelo maior consumo de alimentos processados associado ao sedentarismo (4, 5).

O consumo excessivo de gordura saturada promove desequilíbrio na homeostase energética e se correlaciona com o aumento da massa corporal (6, 7) e disfuncionalidade do tecido adiposo branco (TAB), resultando em modificações histológicas dos adipócitos (hipertrofia e hiperplasia), resistência à insulina, inflamação, redução da termogênese e secreção alterada de adipocinas (8).

Na última década, foram detectados adipócitos beges em locais correspondentes ao TAB (9, 10). Essas células são originadas pela diferenciação de células precursoras ou modificação de células brancas maduras (11). Apresentam genótipo de gordura branca, mas ao serem estimuladas assumem características multiloculares e atividade termogênica pela expressão elevada da proteína desacopladora-1 (UCP1), característicos dos adipócitos marrons (12).

Esse processo conhecido como *browning*, ocorre frequentemente no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs), está relacionado ao combate da obesidade e resistência à insulina provocadas por dieta hiperlipídica, uma vez que o aumento do gasto energético pela maior atividade termogênica reduz o acúmulo de gordura pela conversão da energia química em calor (13).

A disfunção do tecido adiposo na obesidade tem implicações na reação inflamatória. Recentemente, a ativação do TLR4 (receptor *toll-like* 4) prejudicou a termogênese adaptativa e inibiu o *browning* dos adipócitos brancos, além de aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que está associada ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e disfunção mitocondrial (14, 15).

A disfunção do tecido adiposo na obesidade tem implicações na reação inflamatória. Recentemente, a ativação do TLR4 (receptor *toll-like* 4) prejudicou a termogênese adaptativa e inibiu o *browning* dos adipócitos brancos, além de aumentar a liberação de citocinas pró-

inflamatórias, que está associada ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e disfunção mitocondrial (14, 15).

Neste contexto, os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs) são fatores de transcrição encontrados no citoplasma de grande importância para o controle de distúrbios metabólicos (16), pois seus genes alvos codificam proteínas imprescindíveis para diferenciação de adipócitos, oxidação lipídica, biogênese mitocondrial e desacoplamento de energia mitocondrial efetuado pela UCP1 (17).

A isoforma PPAR-alfa (PPAR- α) é essencial na regulação da homeostase lipídica através do metabolismo oxidativo, exercendo um papel crucial no processo de *browning* (18, 19). A ativação farmacológica do PPAR- α restaura a massa corporal, restabelece a sensibilidade à insulina e induz a formação de adipócitos bege (9, 20)

A dipeptidil peptidase- 4 (DPP-4) é uma adipocina com secreção excessiva na vigência da obesidade, correlacionando-se com a hipertrofia dos adipócitos e inflamação mediada por macrófagos no tecido adiposo (21, 22). A linagliptina é um inibidor da DPP-4 (DPP4i) que impede a rápida degradação das incretinas (23, 24), e recentemente induziu a termogênese adaptativa e polarização de macrófagos para o fenótipo M2 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (25).

Neste cenário, foi demonstrado que a associação do agonista PPAR- α e linagliptina exerceu efeitos benéficos sobre o eixo intestino-fígado, atenuando a esteatose hepática em animais alimentados com dieta rica em frutose (26). Este resultado pode implicar no favorecimento da termogênese por redução da disbiose, visto que alterações no eixo intestino-adiposo precedem alterações hepáticas oriundas da obesidade (27).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos da associação do agonista PPAR- α WY14643 com o DPP4i linagliptina sobre o remodelamento do tecido adiposo branco subcutâneo num modelo experimental de obesidade, com ênfase na indução de células adiposas beges e termogênese associada, sendo de caráter inovador, já que não há relatos na literatura dos efeitos da associação da ativação do PPAR- α com o DPP4i (linagliptina) na possível maximização do fenômeno “browning”.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica de etiologia multifatorial sendo considerada um desafio para saúde pública global (28), visto que sua prevalência vem aumentando drasticamente em países desenvolvidos e em desenvolvimento (4). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura decorrente da ingestão energética maior que o gasto de energia durante um longo período de tempo, promovendo um balanço energético positivo com efeitos deletérios a saúde (29).

O Sobrepeso e a obesidade estão relacionados a diversos fatores como genéticos, ambientais, sociais, sedentarismo e alimentação inadequada (30). O excesso de peso, enquanto pandemia, é decorrente principalmente da mudança do comportamento alimentar e estilo de vida, caracterizadas pelo consumo excessivo de gordura saturada e açúcares simples, associado com a inatividade física (5, 31).

As últimas décadas foram determinadas por mudanças no padrão dietético que levaram à chamada transição nutricional, onde alterações quantitativas e qualitativas da dieta culminaram no aumento de doenças crônicas não transmissíveis (2, 6). O aumento da ingestão energética, associado à redução no gasto, leva a um balanço energético positivo, fazendo com que o organismo, em desequilíbrio, estoque mais gordura. Consequentemente, promove o aumento da massa corporal (MC) total, que ao perdurar por um longo tempo resulta no desenvolvimento do sobrepeso e, posteriormente, da obesidade (32).

As novas práticas alimentares e sedentarismo resultaram em dados preocupantes de mais de 1,9 bilhões de pessoas com sobrepeso, sendo um terço desse grupo portador de obesidade, representando em média 13% da população mundial maior de 18 anos (33). Além disso, o maior risco de DM2, resistência à insulina (RI), dislipidemias e doenças cardiovasculares são atribuídos ao sobrepeso e obesidade (34).

No Brasil, a crescente prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta é igualmente alarmante. De acordo com dados do último Vigitel Brasil (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico), realizado em 2019 pelo Ministério da Saúde (35), o número de pessoas com obesidade apresentou um aumento de

72% desde 2006, representando atualmente 20,3% da população brasileira. A frequência de excesso de peso foi de 55,4%, correspondendo a mais da metade da população, sendo ligeiramente maior entre homens (57,8%) do que entre mulheres (53,9%). Essa pesquisa também apontou que 7,4% dos brasileiros são diabéticos e 24,5% hipertensos.

Diversos estudos mostraram que a presença da obesidade promove uma desregulação na homeostase corporal e desencadeia hipertrofia dos adipócitos brancos (9, 36). A obesidade, enquanto doença inflamatória, é caracterizada pela infiltração de macrófagos que apresentam um fenótipo pró-inflamatório (M1) no tecido adiposo (TA), os quais liberam quantidade excessiva de citocinas (37). Recentemente, foi demonstrado que o aumento de fatores secretados por macrófagos prejudicam a diferenciação de células adiposas em humanos (38).

O aumento da expressão de citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina (IL)-6, levam ao desenvolvimento de um estado inflamatório de baixo grau, induzindo de forma marcante o risco de comorbidades a ela associadas, tais como: RI, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), aterosclerose, doença cardiovascular, DM2, e Doença Hepática Gordurosa Não Alcolólica (DHGNA) (39). Essas desordens, quando associadas em um indivíduo, configuram a síndrome metabólica (SM) que tem como principal componente a obesidade (40). Na Figura 1, abaixo, observamos de forma esquematizada a obesidade e suas comorbidades associadas.

Figura 1 - A obesidade e suas comorbidades



Nota: O desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto de energia gera um balanço energético positivo, com acúmulo de gordura e obesidade. Essa desencadeia uma série de disfunções em diversos tecidos.

Fonte: A autora, 2021.

A leptina também estará aumentada na vigência da obesidade pelo aumento na massa adiposa, caracterizando a hiperleptinemia, a qual promove desregulação do eixo adipoinsular, promovendo perda da capacidade supressora da leptina sobre a secreção de insulina pela célula beta pancreática e conduzindo ao quadro de hiperinsulinemia e resistência à insulina (41, 42).

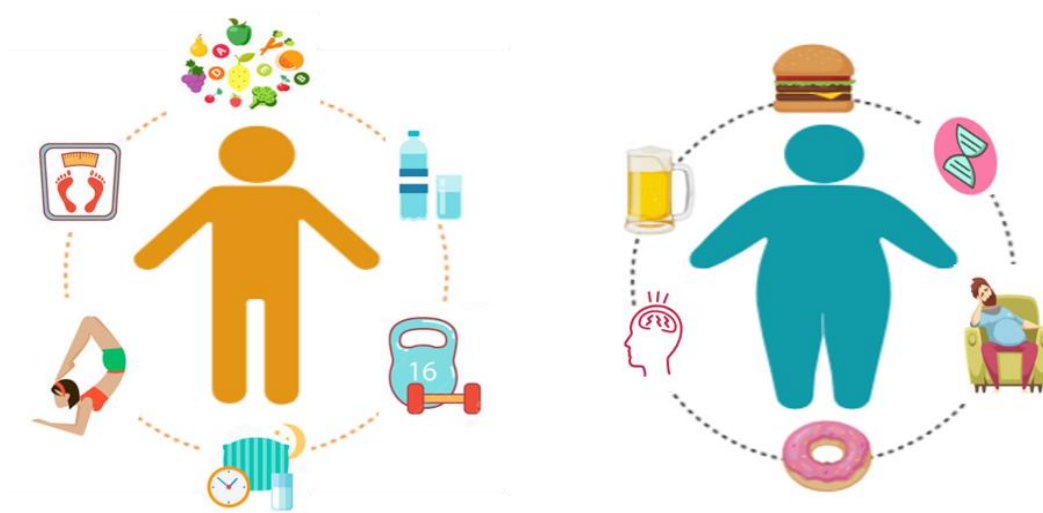
O consumo excessivo de gordura, antes visto como determinante para gênese de obesidade pela maior densidade energética, tem sido avaliado do ponto de vista qualitativo (7, 43). Dessa forma, o excesso de gordura saturada apresenta maior relação com o aumento de MC e comorbidades, enquanto ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa podem modular o gasto energético e reduzir a adiposidade (7, 44).

O Índice de Massa Corporal (IMC) ($\text{IMC} = \text{peso em kg} / \text{altura em m}^2$) é o parâmetro mais utilizado para diagnosticar e avaliar o grau de obesidade, sendo sua principal vantagem a possibilidade de ser interpretado em correlação com dados de referência nacionais dos níveis de adiposidade, morbidade e mortalidade em adultos (45). Entretanto, o IMC isolado não fornece informações sobre a composição corporal e respectiva contribuição de massa livre de gordura ou massa gorda para o peso corporal, sugerindo a utilização de indicadores adicionais para avaliar adiposidade central em pessoas com sobrepeso e obesidade (46).

A distribuição de gordura corporal também desempenha um importante papel no risco metabólico. O aumento de gordura intra-abdominal e visceral (obesidade central) proporciona um alto risco de alterações metabólicas, enquanto a elevação da gordura subcutânea (obesidade periférica) exerce pouco ou nenhum risco (47).

A redução da MC é o pilar do tratamento da obesidade e consequente redução das comorbidades associadas. As atuais estratégias de combate à obesidade e transtornos relacionados são classificadas em três categorias principais: mudanças de estilo de vida, terapia farmacológica e cirurgia bariátrica (48). A modificação do estilo de vida envolve uma combinação de mudanças comportamentais, dieta e atividade física (49, 50). A utilização de fármacos é uma estratégia para amenizar os efeitos deletérios causados pelas comorbidades (51). Na Figura 2, abaixo, observamos de forma esquematizada fatores que podem atenuar ou promover a obesidade.

Figura 2 - Eutrofia e Obesidade



Nota: Esquema representativo de fatores que podem atenuar a obesidade como uma alimentação adequada, atividade física e sono adequado. À direita, demonstramos fatores que podem promover a obesidade como alimentação baseada em bebidas açucaradas e *fast-food*, sedentarismo, estresse e genética.

Fonte: A autora, 2021.

O modelo experimental amplamente utilizado para estudos científicos em obesidade são os camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta hiperenergética (que mimetiza as dietas ocidentais), visto que desenvolvem obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão semelhante a de humanos. Esse modelo é conhecido como “obesidade induzida por dieta” (DIO) (52, 53)

1.2 Modelo experimental de obesidade: Dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6

Como já descrito anteriormente, o consumo excessivo de uma dieta rica em gordura saturada leva ao desenvolvimento da obesidade (7), acarretando o aumento dos níveis de ácidos graxos (AGs), com favorecimento da lipogênese, e maiores taxas de lipólise no TAB. Este excedente leva ao acúmulo de gordura ectópica, amplificando diversos efeitos deletérios, como dislipidemias, esteatose hepática, falha na sinalização da insulina, ativação da gliconeogênese e hiperglicemia (54). Dessa forma, este quadro está inversamente relacionado

com a sensibilidade à insulina, contribuindo para o declínio da função das células beta, um preditor da DM2 (40, 55).

O metabolismo de lipídios envolve várias vias que são interdependentes. O balanço entre a deposição e a mobilização de lipídios do tecido adiposo vai ser responsável por determinar o conteúdo de gordura corporal. Os AGs são as formas de energia mais comumente armazenadas e circulantes, e os triacilgliceróis (TAGS) são as formas mais comuns de armazenamento de ácidos graxos. Os AGs/TAGS podem ser provenientes de quatro fontes: lipogênese *de novo*, depósitos de TAGS citoplasmático, AGs derivados de triacilgliceróis de lipoproteínas remanescentes diretamente absorvidos pelo fígado, e ácidos graxos não esterificados plasmáticos (NEFA) liberados pelo tecido adiposo (56).

Camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura representam um valioso modelo experimental em trabalhos científicos de obesidade e DM2 (57). Estudos demonstram que essa cepa é capaz de se tornar obesa, resistente à insulina, intolerante à glicose e hipertensa em resposta ao consumo de uma dieta hiperlipídica. Por esse motivo, é considerado um excelente modelo da SM humana. Além disso, permanece magro e fisicamente normal quando restrito à ração com baixo teor de gordura (52, 58).

Roedores C57BL/6 apresentam uma maior eficiência alimentar, dessa forma o ganho de peso decorrente de uma dieta hiperlipídica não ocorre simplesmente como resultado da hiperfagia ou baixos níveis de atividade física. A adiposidade central que esses camundongos desenvolvem é acompanhada de alterações metabólicas que se manifestam antecipadamente. Nesse contexto, quatro semanas de dieta rica em gordura é o tempo necessário para esses animais desenvolverem hiperglicemia, tendo sua rápida progressão para o diabetes e obesidade. Por outro lado, a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos é totalmente manifestada com 16 semanas de indução dietética (52). O remodelamento do TAB parece ser uma característica marcante dessa espécie, uma vez que a apoptose dos adipócitos ocorre após 16 semanas de indução dietética e contribui para inflamação e resistência à insulina (59).

A capacidade dos camundongos C57BL/6 se adaptarem a resistência à insulina, melhorando a secreção desse hormônio é semelhante à adaptação dessa alteração metabólica observada em humanos (58). Contudo, existem diferenças importantes que limitam esse modelo experimental alimentado com dieta rica em gordura no estudo do diabetes (60). Enquanto camundongos com DIO apresentam um aumento 2-3 vezes no volume das células beta (61), na obesidade humana são relatados aumentos de 20-50% no volume das células beta (62).

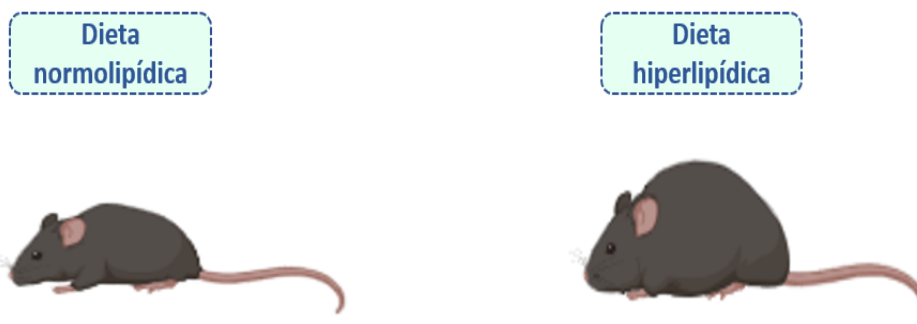
O consumo excessivo de gordura saturada na dieta promove desequilíbrio na homeostase energética, sendo essa uma das principais causas para o desenvolvimento da obesidade (63). A demanda constante de processamento e armazenamento de lipídios influencia o funcionamento dos adipócitos, incluindo hipertrofia, secreção alterada de adipocinas com predomínio das pró-inflamatórias, resistência à insulina, maior produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação de baixo grau e estresse do RE (64).

Estudos com animais demonstram que a ingestão contínua de uma dieta rica em gordura saturada promove danos metabólicos semelhantes aos humanos quando desenvolvem excesso de peso (65). Em camundongos, foi observado que a gordura e o colesterol atuam sinergicamente na indução de danos hepáticos, como esteatose hepática, redução dos níveis de adiponectina e inflamação no tecido adiposo. A citotoxicidade do colesterol livre é explicada pela indução de apoptose em macrófagos mediada por estresse do RE (66, 67).

A necrose dos adipócitos que ocorre na obesidade é causada pelo excessivo estresse do RE e hipóxia (68). Além disso, a ingestão crônica da dieta rica em gordura promove glicolipotoxicidade em camundongos induzidos à obesidade, visto que além de aumentar o acúmulo lipídico nos hepatócitos, também aumenta os níveis de glicose no sangue (69, 70).

Dietas ricas em gordura saturada conduzem a alterações na microbiota intestinal, pois alterações na dieta promovem disbiose e aumentam permeabilidade intestinal (71). Dessa forma, ocorre translocação de bactérias e toxinas produzidas por elas do lúmen intestinal para o sangue com consequências para termogênese adaptativa e metabolismo hepático (72, 73). No TA, altos níveis circulantes dessas toxinas reduz a formação de adipócitos bege, além de afetar o funcionamento do tecido adiposo marrom (TAM) (*whitening*) (15, 74). Na Figura 3, abaixo, observamos de forma esquematizada a diferença entre camundongos C57BL/6 alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica.

Figura 3 - Dieta normolipídica x dieta hiperlipídica



Nota: Esquema representativo de camundongo da linhagem C57BL/6 alimentados com diferentes tipos de dieta. A esquerda camundongo C57BL/6 alimentado com dieta normolipídica que permanece magro e fisicamente normal e a direita camundongo C57BL/6 alimentado com dieta hiperlipídica com DIO.

Fonte: A autora, 2021.

1.3 Tecido adiposo

O TA é um órgão essencial para manutenção do equilíbrio energético, sendo de grande importância na gênese da obesidade. Os Adipócitos são células altamente especializadas no desempenho de funções reguladoras na homeostasia. Dois tipos de TA, caracterizados por específicas localizações anatômicas, estruturas morfológicas e funções são tradicionalmente descritos em mamíferos: o TAB e o TAM (47, 75).

O TAB é o principal reservatório energético do organismo, estocando lipídios na forma de TAGS em grandes gotículas lipídicas nos adipócitos brancos. Em tempos de necessidade calórica, como por exemplo em período de privação alimentar, essa reserva energética será mobilizada. As lipases hidrolisam os TAGS liberando glicerol e AGs na corrente sanguínea para serem utilizados, processo denominado como lipólise (76).

Os adipócitos brancos maduros correspondem entre um e dois terços do total de células do TA, possuem uma única e macro gotícula lipídica ocupando a maior parte do volume celular (80-85%), com baixa densidade mitocondrial e com o núcleo deslocado para periferia com consequente achatamento. As células restantes desse tecido são parte da fração estromal vascular envolvendo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células mesenquimais e pré-adipócitos. O TAB se desenvolve em vários locais anatômicos sendo

dividido em depósitos viscerais (ao redor dos órgãos - mesentérico, retroperitoneal, perigonadal e omental) e depósitos subcutâneos (sob a pele e inguinal) (77, 78).

O TAB era descrito inicialmente apenas como um órgão armazenador de energia, entretanto desde a descoberta da leptina é reconhecido como um órgão metabolicamente ativo de natureza endócrina (79). Como um órgão endócrino extremamente ativo, o TA secreta uma grande variedade de hormônios, citocinas, fatores de crescimento e fatores vasoativos que conjuntamente são denominadas adipocinas e possuem funções secretoras de caráter autócrino, parácrino e endócrino em várias vias metabólicas (80).

O ganho de peso excessivo promove modificação histológica dos adipócitos, secreção alterada de adipocinas com perfil pró-inflamatório (TNF- α e a IL-6), diminuição da sensibilidade à insulina, e mudança no perfil das células imunes residentes no TA, o que leva a uma inflamação crônica de baixo grau (81).

A elevação da massa adiposa, ocorrida na obesidade, é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). O TABs é o maior depósito de gordura, sendo o local preferido de armazenamento do excesso de lipídio. A expansão de adipócitos maduros ocorre em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, a lipogênese. Por outro lado, o aumento do número de adipócitos depende da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, processo denominado adipogênese. Contudo, os adipócitos possuem uma capacidade limitada de expansão e quando seu crescimento atinge um grau máximo, com acúmulo acima do suportado pela célula, há recrutamento de novos adipócitos ou pode desencadear aumento dos AGs no plasma com acúmulo ectópico em outros órgãos, como fígado, coração e músculos, processo identificado como lipotoxicidade (82, 83).

O TAM possui como principal função a dissipação de energia em forma de calor, conhecida como termogênese, estando intimamente relacionado ao gasto energético (84). Foi inicialmente descrito pela sua função em mamíferos hibernantes e crianças, dada sua capacidade de liberação de calor para manutenção da temperatura corporal em resposta ao frio (12, 85).

Os adipócitos marrons são células poligonais de característica multilocular, pois possuem muitas gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, apresentam citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que produzem energia pela oxidação de ácidos e conferem a cor amarronzada ao tecido (10). O tecido também é intensamente vascularizado e innervado pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS). A localização clássica do TAM em humanos é na região interescapular;

podendo ser encontrado em sítios cervicais, paravertebrais e perirrenais em menor quantidade (12, 78, 86, 87).

Os adipócitos beges foram descritos recentemente como um novo tipo celular presente no TABs, originados a partir do escurecimento (*Browning*) dos adipócitos brancos, e possuem as propriedades e características oxidativas do TAM. São, portanto, células que constituem um tecido especializado no gasto energético, mediante variados estímulos. São originados a partir do estímulo adrenérgico, pela transdiferenciação de pré-adipócitos brancos ou da diferenciação a partir de pré-adipócitos beges, não possuindo precursor comum com os adipócitos marrons. Os adipócitos subcutâneos são mais propensos ao *browning* do que os adipócitos viscerais, pelo fato dos adipócitos subcutâneos serem predominantemente menores e possuírem um maior potencial de diferenciação (12, 88). São caracterizados por citoplasma abundante, com armazenamento multilocular, alta densidade mitocondrial, que permite a termogênese adaptativa após estímulo (75). O Quadro 1 a seguir resume as principais características dos diferentes tipos de adipócitos, e a Figura 4 esquematiza os adipócitos branco, marrom e bege.

Quadro 1 - Diferença entre os adipócitos brancos, marrons e beges

	Adipócito Branco	Adipócito Marrom	Adipócito Bege
Origem	Células tronco mesenquimais do TAB	Linhagem miogênica (Myf5+)	Transdiferenciação de células tronco mesenquimais do TAB
Função	Armazenamento lipídico	Dissipação de energia química.	Termogênese adaptativa
Gotícula lipídica	Unilocular	Multilocular	Multilocular
Densidade Mitocondrial	Baixa	Alta	Média
Localização em Humanos	Subcutânea ou ectópica	Interescapular, cervical, paravertebral, perirenal	Supraclavicular e subcutânea

Nota: Características dos diferentes tipos de tecido adiposo.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 4- Representação esquemática dos adipócitos



Nota: Esquema representativo dos três tipos de adipócitos, e suas configurações estruturais.
Fonte: A autora, 2021.

1.4 Adipogênese

O tecido adiposo, assim como músculo e osso, é de origem mesoderma. As células-tronco mesenquimais foram inicialmente identificadas na medula óssea humana pós-natal e têm sido utilizadas para modelar a diferenciação do mesoderma. Elas são células multipotentes capazes de se diferenciarem em várias linhagens celulares, como adipócitos, osteoblastos, condrócitos, mioblastos e tecido conjuntivo (47).

O TAM se desenvolve significativamente mais cedo que o TAB (durante a vida fetal), isso porque sua função é proteger o recém-nascido contra o frio. Em contraste, o desenvolvimento do TABs, embora comece ainda no útero materno, ocorre principalmente após o nascimento quando os adipócitos brancos que são especializados em armazenar lipídios são necessários para fornecer energia em períodos de jejum. Além disso, TAB e TAM têm diferentes origens e células progenitoras na adipogênese (75, 89).

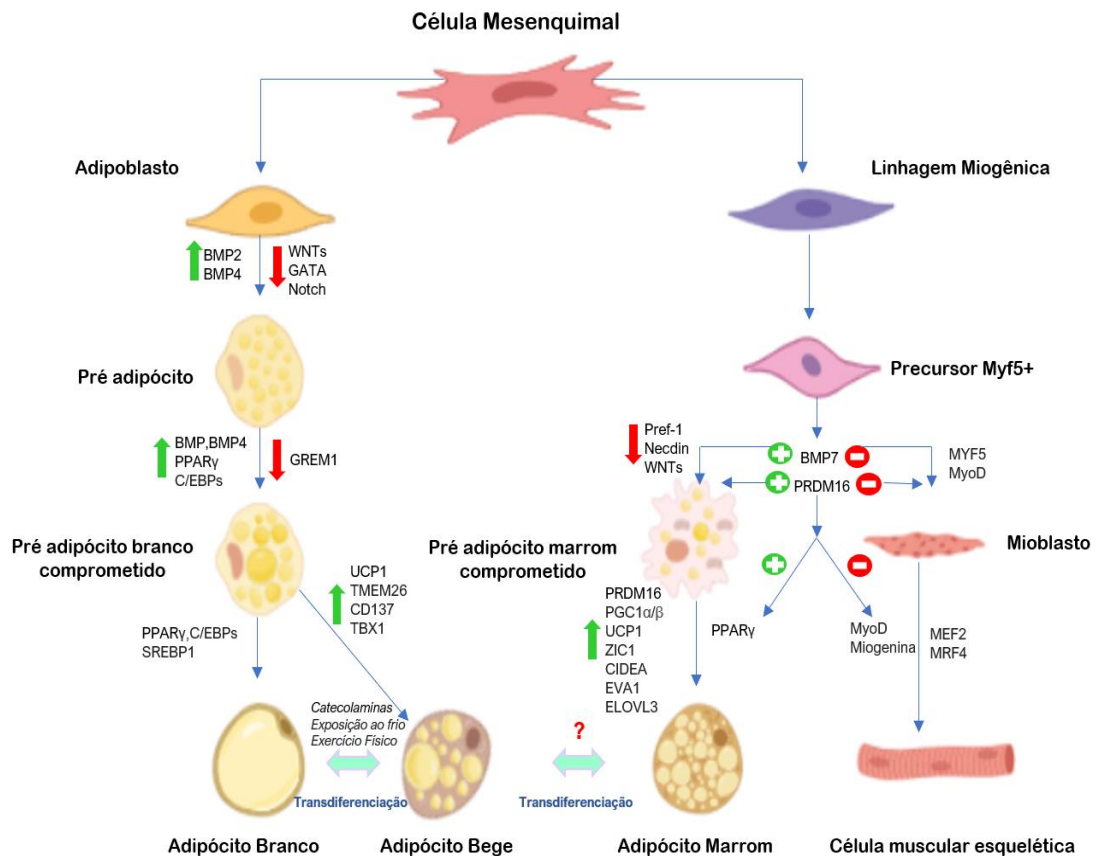
O processo de diferenciação dos adipócitos brancos ocorre em quatro estágios. O primeiro estágio refere-se aos precursores mesenquimais, os pré-adipócitos diferenciam-se dessas células. O próximo estágio é a expansão clonal das células, seguida da diferenciação terminal, na qual ocorre a ativação transcricional de genes específicos de adipócitos, como genes relacionados com o metabolismo de lipídios e de carboidratos. Por fim, origina-se o adipócito maduro, caracterizado pela ocorrência de grandes gotículas de lipídios revestidas pela proteína perilipina (PER), a qual controla o metabolismo de lipídios dos adipócitos, bem como pela expressão de diversos genes específicos, como o fator de transcrição Receptor

ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ), o hormônio leptina e o transportador de glicose (GLUT)-4. O processo de diferenciação de um adipócito depende da ativação de uma cascata de fatores de transcrição específicos, entre os quais se destacam o PPAR- γ e o C/EBPs (proteína ligadora de CCAAT), que desempenham papel fundamental na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (47, 75).

Em contraste com os adipócitos brancos, os adipócitos marrons são originários da linhagem miogênica de células progenitoras positivas para Myf5. A diferenciação de pré-adipócitos marrons em adipócitos marrons é controlada pela transformação de proteínas da família do fator de crescimento- β , como a proteína morfogenética óssea (BMP)-7 e a miostatina. Além disso, a sinalização Wnt é conhecida por suprimir a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos marrons. Na linhagem miogênica positiva para Myf5, o complexo transcricional proteína 16 contendo o domínio PR (PRDM16) e C/EBP- β induz a expressão de PPAR- γ e coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α), que subsequentemente induz a diferenciação de adipócitos marrons (75, 76, 90).

Evidências sugerem que os adipócitos beges derivam de adipócitos brancos maduros (baixa expressão do cluster de diferenciação 137 (CD137), Myf5-), que sob estímulos específicos adquirem um fenótipo semelhante ao marrom, ou ainda de um pré-adipócito bege (alta expressão do CD137, Myf5-), que se diferencia em uma célula multilocular capaz de realizar a termogênese. Esta última originada de uma linhagem diferente do TAB clássico (91, 92). Independente das diferentes origens observadas, os adipócitos beges apresentam a mesma função e morfologia, agindo na termogênese adaptativa após estímulo para seu surgimento (93). Na Figura 5, abaixo, observamos de forma esquematizada o processo de adipogênese.

Figura 5 - Diferenciação em adipócitos brancos, bege e marrons



Nota: Esquema representativo da Adipogênese. A integração de muitos fatores regula a adipogênese. Os adipócitos brancos originam-se da diferenciação de células precursoras mesenquimais. Os adipócitos marrons originam-se de um precursor distinto, o qual expressa o fator miogênico 5 (MYF5). Este precursor também pode dar origem às células musculares. Os adipócitos beiges originam-se pela transdiferenciação de pré-adipócitos brancos ou da diferenciação a partir de pré-adipócitos beiges

Fonte: A autora, 2021.

1.5 Termogênese adaptativa no TABs

A termogênese tem como principal função a manutenção da temperatura corporal adequada (em torno dos 37°C em humanos) em ambientes com baixas temperaturas. Este processo é resultado da liberação de energia química (ATP) em forma de energia térmica (calor). A termogênese adaptativa consiste na capacidade do organismo de gerar calor induzido por estímulos. Dentre fatores que estimulam a termogênese adaptativa temos, por exemplo: o frio, capaz de exigir a regulação da temperatura corporal e em casos mais extremos, induzir o tremor e favorecer a liberação de calor (*shivering thermogenesis*) (78); a dieta, que quando hiperenergética pode estimular o TAM no objetivo da manutenção da

temperatura corporal (12); agentes farmacológicos e nutracêuticos, como agonistas do PPAR- α e DPP-4i (9, 25, 94); e o exercício físico (95).

Estudos das décadas de 80 e 90, demonstraram que o TAB possuía plasticidade por terem apresentado alta proporção na potencialidade na expressão da UCP1 e outros marcadores termogênicos característicos do TAM no TABs de roedores, como PGC-1 α e PRDM16 (96). Contudo, o fenômeno de *browning* ganhou importância científica após identificação acidental de adipócitos termogênicos em pacientes submetidos à tomografia por emissão de prótons (PET). Esses adipócitos, observados na região supraclavicular, pareciam com adipócitos beges encontrados em modelos de camundongos. Antes desse achado, acreditava-se que a termogênese não poderia promover uma redução significativa de massa corporal em adultos (10, 97, 98).

O estímulo beta adrenérgico é essencial para iniciação da via termogênica, o receptor beta-3 adrenérgico (R β 3A) é o principal receptor envolvido na termogênese. Inicia-se, então, a cascata de reações que se seguem com o aumento de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), ativação da PKA (proteína cinase A dependente de AMPc) e indução da lipólise. Os ácidos graxos livres (AGL), por sua vez, ativam uma série de marcadores que levam à ativação da proteína efetora da termogênese, a proteína UCP1. Também como termogenina, a UCP1 encontra-se localizada na membrana mitocondrial interna e permite o retorno de prótons H⁺ à luz mitocondrial; dessa forma é capaz de impedir seu armazenamento sob a forma de ATP e permitir a dissipação da energia resultante em forma de calor. A transcrição de UCP1 está ligada a todas as isoformas de PPARs (18, 78, 95, 99, 100).

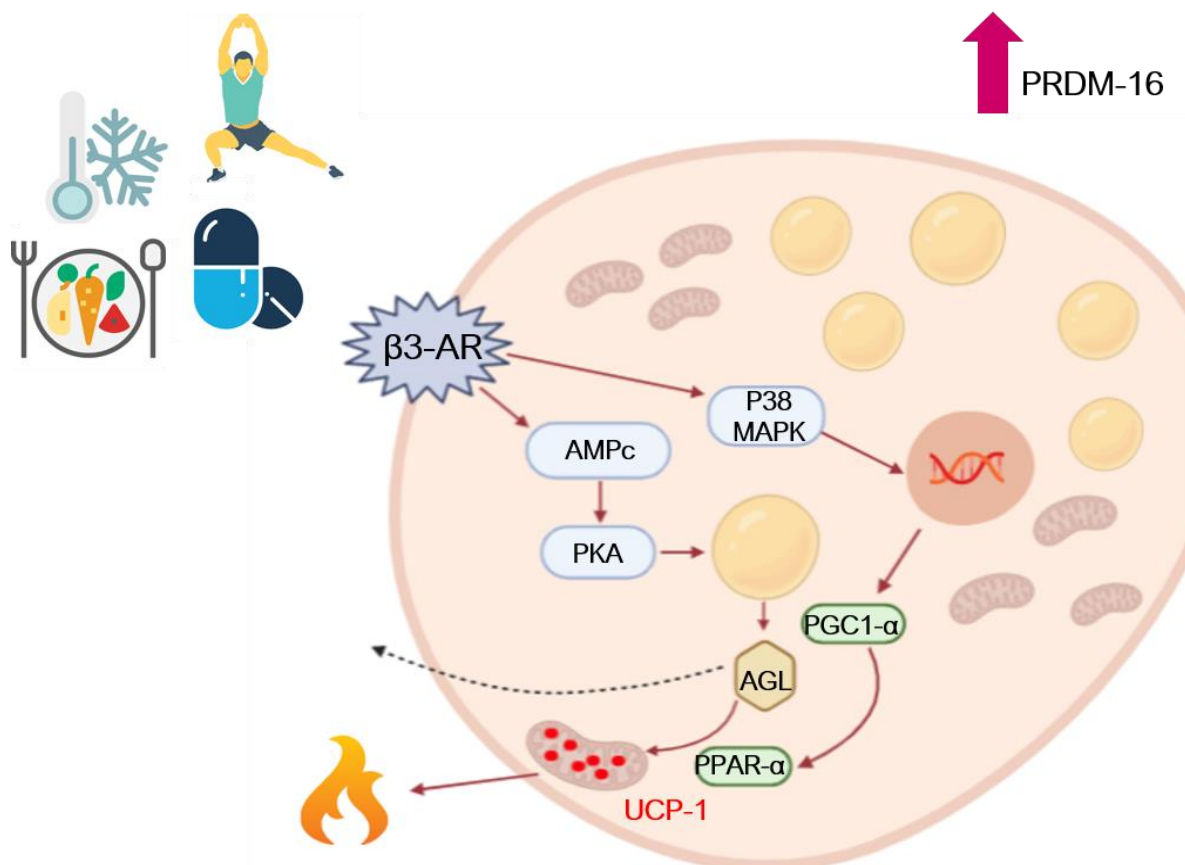
A atuação do PPAR- α na via termogênica ocorre pelo fato desse fator de transcrição ter marcadores termogênicos como alvo. Os agonistas PPAR- α podem ser usados como drogas anti-obesogênicas, com potenciais efeitos na termogênese e fenômeno de *browning*. PPAR- α tem como genes alvos a UCP1 e PGC1 α , considerado um marcador fundamental para a biogênese mitocondrial (94). Além disso, o PPAR- α é capaz de inibir a expressão gênica de agentes pró-inflamatórios através da supressão do NF- κ B (fator nuclear kappa B) (18).

O PRDM16 emerge com um fator de manutenção do fenótipo marrom: sem a presença desse marcador, células beges retornam ao fenótipo branco, assim como células marrons reduzem suas características termogênicas e podem ser induzidas à diferenciação em células musculares (101). O estímulo adrenérgico também ativa a p38 MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), que estimula o ATF-2 (fator de ativação transcricional), leva à expressão de PGC1 α . O PGC1 α é um fator chave da regulação da biogênese mitocondrial, ativador da

transcrição de PPARs e da UCP1. Através da ativação de NRF1 (Fator respiratório nuclear 1), e por conseguinte, de TFAM (fator transcrricional mitocondrial A), ocorre a replicação mitocondrial (95). O esquema da Figura 6 ilustra algumas vias de ativação da cascata termogênica.

A literatura descreve que a presença de 63g de adipócitos com atividade termogênica na região cervical de indivíduos adultos é capaz de evitar o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano (102). Logo, a descoberta de fármacos que induzam a formação de adipócitos beges e dessa maneira ativem a termogênese adaptativa são pertinentes para o controle do sobrepeso e/ou comorbidades associadas. Na Figura 6, abaixo, observamos de forma esquematizada um resumo da cascata termogênica.

Figura 6 - Resumo da cascata termogênica



Legenda: Receptor beta-3 adrenérgico (Rβ-3A); Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc); Proteína cinase A dependente de AMPc (PKA); Proteína cinase ativada por mitógeno (p38MAPK); Ácidos graxos livres (AGL); Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1-alfa); Receptor ativado por proliferação de peroxissoma alfa (PPAR-alfa) e Proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1).

Nota: Representação esquemática resumida de algumas vias da cascata termogênica, ativada por estímulos como exercício físico, medicamentos/nutraceuticos, dieta ou por baixas temperaturas.

Fonte: A autora, 2021.

1.6 PPAR

Os PPARs pertencem à família de receptores nucleares. Existem três isoformas já descritas na literatura: PPAR- α (alfa), PPAR- β/δ (beta/delta) e PPAR- γ (gama). Estão envolvidos na regulação da diferenciação celular, desenvolvimento e na regulação da expressão de genes do metabolismo de carboidratos e lipídios (103).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR, em que X pode ser α , β/δ ou γ) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes-alvo (104, 105).

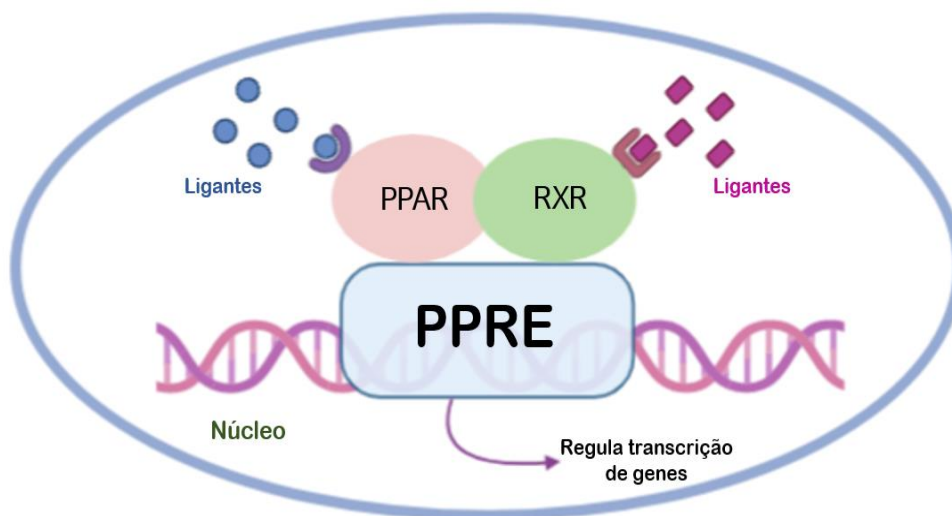
As principais atividades fisiológicas dos PPARs estão correlacionadas à transcrição dos seus genes alvo e, desta forma, regulam o metabolismo lipídico, a homeostase da glicose, diferenciação celular, obesidade e câncer. Além disso, os PPARs podem participar diretamente de respostas imunológicas e dos mecanismos de inflamação (106).

A diversidade de funções desempenhadas por esses receptores está relacionada à capacidade de acomodar diferentes tipos de ligantes em seu sítio de ligação. Dessa forma, as três isoformas são capazes de se ligar a um ligante endógeno como os AGs (107, 108). Após a interação do PPARs ao seu ligante, ocorre uma mudança conformacional no complexo que facilita um co-repressor para a troca complexa do co-ativador e a ativação transcricional dos genes alvo (109).

O PPAR- α é predominantemente expresso no fígado, músculo e coração e sua ativação, segundo estudos já realizados, sugere uma participação desse receptor no metabolismo lipídico. O PPAR- γ é expresso principalmente nos tecidos adiposo branco e marrom, sendo responsável, dentre outras funções, pela lipogênese. Enquanto, o PPAR- β/δ apresenta uma ampla distribuição corporal com diversas funções como a oxidação de ácidos graxos no músculo e regulação geral de energia (108).

A utilização de agonistas dos PPARs tem sido descrita na literatura com efeitos benéficos sobre a ingestão alimentar, massa corporal, localização da deposição de gordura e sobre o acúmulo ectópico de lipídios (fígado e pâncreas), geradas a partir da administração de diferentes dietas (110, 111). Na Figura 7 a seguir observamos o mecanismo de ação do PPAR.

Figura 7 - Mecanismo de ação do PPAR



Nota: Ligação do PPAR ao RXR e PPARE codificando a transcrição de genes alvo.
 Fonte: A autora, 2021.

1.6.1 PPAR- α

O PPAR- α , no ano de 1990, foi o primeiro receptor descoberto e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e gordura marrom (112, 113). Este receptor possui como ligantes naturais os ácidos graxos poli-insaturados e os leucotrienos, que são importantes mediadores inflamatórios; como ligantes farmacológicos, a família das drogas hipolipidêmicas (“fibratos”) é considerada um importante agonista PPAR- α (104).

A participação do PPAR- α na via termogênica passa pelo direcionamento dos AGLs, gerados após estímulo adrenérgico, para a via de β -oxidação, ao invés do direcionamento ao efluxo celular. Em condições normais, a maioria dos AGLs mobilizados através do estímulo β -adrenérgico acaba sendo liberado da célula, e acredita-se que essa mobilização tenha relação com a resposta inflamatória e com a redução da função celular a longo prazo. O estímulo crônico ao R β 3A regula positivamente a expressão de PPAR- α , o que resulta em capacidade de oxidação aumentada no interior dos adipócitos (18).

Já está bem elucidado na literatura que a ativação do PPAR- α atua diretamente sobre a β -oxidação hepática, estimulando a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que participam desse processo. Já foi visto que a expressão de CPT1 é extremamente aumentada

com a ativação desse receptor. Além disso, A ativação de PPAR- α tem relação com o aumento do HDL e diminuição do LDL e TAG plasmáticos. (114, 115).

Além do metabolismo de glicídico e lipídico, a isoforma PPAR- α também está envolvida nas vias de modulação da inflamação, regulando negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios e suprimindo a resposta inflamatória por supra regulação direta de genes com propriedades anti-inflamatórias. Neste contexto, foi demonstrado que o PPAR- α ativado por fibrato inibe a secreção da citocina IL-6. Em camundongos, a ativação do PPAR- α em células de Kupffer hepáticas ou macrófagos recrutados por monócitos resultou em efeitos anti-inflamatórios por meio da regulação negativa de citocinas pró inflamatórias (116).

Estudos recentes demonstraram que a restauração da expressão de PPAR- α pela administração de ativadores naturais suprimiram a lipogênese e neutralizaram a inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Dessa forma, a ativação desse fator de transcrição foi comprovada como uma abordagem promissora para combater a esteatose hepática. Além disso, a coativação e o aumento de PPAR- α , estimulado pela administração do PPAR- β pelo GW0742, aliviou o estresse do RE no fígado de camundongos alimentados com dieta rica em gordura saturada, pelo aumento da beta-oxidação e redução da lipogênese *de novo*, contribuindo para reversão da lipotoxicidade (63, 70).

A ativação farmacológica da isoforma alfa (PPAR- α) promove a redução da massa corporal, alívio da resistência à insulina, a formação de adipócitos bege e uma redução significativa da esteatose hepática por aumento da beta-oxidação mitocondrial. (9, 70, 94). Foi demonstrado anteriormente que tratamento com WY-14643 (agonista PPAR α) resultou em redução da massa gorda e promoveu aumento da oxidação lipídica, demonstrando que a ativação do PPAR- α desempenha um importante papel na regulação beta-adrenérgica da lipólise do tecido adiposo (117).

1.7 Inibição da DPP-4

1.7.1 DPP-4

A DPP-4 é uma glicoproteína transmembrana que cliva e inativa um grande número de quimiocinas e hormônios peptídicos envolvidos na regulação do sistema imunológico,

inferindo um papel para DPP-4 na patogênese da inflamação. Recentemente, essa enzima foi descrita como uma adipocina com ação autócrina e parácrina na resistência à insulina. A expressão de DPP-4 é substancialmente elevada na vigência da obesidade, correlacionando-se com a hipertrofia dos adipócitos, todos os parâmetros da SM e inflamação mediada por macrófagos no TA (21, 22).

A inibição da DPP-4 configura uma alternativa terapêutica para pacientes portadores de desequilíbrios na homeostase glicêmica, como resistentes à insulina e portadores de DM2, visto que possibilita um maior tempo de sinalização pancreática para liberação de insulina pós-prandial (118).

A DPP-4 é originalmente conhecida como marcador de superfície de células T CD26, amplamente expressa em muitas células, incluindo células imunes (119). A obesidade ativa o sistema imune inato com subsequente recrutamento de células imunes, como macrófagos e células T, para os tecidos metabólicos, levando ao desenvolvimento de resistência à insulina. O recrutamento e a polarização de macrófagos são fundamentais na inflamação induzida pela obesidade e na resistência à insulina (120). Nesse contexto, é possível que a ação da DPP-4 não se atenha apenas à regulação do efeito incretina, levando em consideração seu padrão de expressão e multiplicidade de funções e alvos (24).

1.7.2 Incretinas

As incretinas são hormônios produzidos pelo intestino que são liberados em resposta a ingestão de nutrientes, potencializando a secreção de insulina pós prandial. Esses hormônios apresentam níveis basais na ausência de alimentação e são dependentes de glicose para exercerem sua função. Dessa forma, são ineficazes em concentrações baixas de glicemia (121).

Os dois hormônios dessa classe melhor estudado são o GIP (peptídeo insulínico dependente de glicose) e GLP-1 (peptídeo 1 semelhante ao glucagon), que exercem sua ação insulínica por meio de receptores que são altamente expressos nas células beta pancreática. As incretinas são responsáveis por 60-65% da secreção de insulina pós-prandial, o chamado efeito da incretina. No entanto, possuem uma meia vida curta, pois são rapidamente degradadas pela enzima DPP-4 (23).

O GIP é um peptídeo secretado a partir de células K localizadas principalmente no duodeno e jejuno proximal. O GLP-1 é sintetizado e secretado por células L, encontradas em todo o intestino delgado e grosso, também é produzido no sistema nervoso central (SNC), predominantemente no tronco encefálico, de onde é transportado por todo o cérebro para provocar ações metabólicas, cardiovasculares e neuroprotetoras. A secreção basal de GLP-1 pelas células intestinais é rapidamente aumentada pela ingestão de nutrientes, incluindo carboidratos, gorduras e proteínas. No pâncreas, esse hormônio aumenta a insulina e inibe a secreção de glucagon de maneira dependente da glicose. Além disso, promove a síntese de insulina, confere sensibilidade à glicose às células beta e inibe a apoptose das células beta (23, 122, 123).

Em indivíduos saudáveis com tolerância oral normal à glicose, o GIP parece mediar o volume do efeito incretina. No entanto, a presença do DM2 está associada a uma redução da capacidade do intestino de secretar GLP-1. Dessa forma, esse hormônio é um composto útil para drogas hipoglicemiantes e, por esse motivo, o GLP-1 é fisiologicamente a incretina mais importante e uma variedade de inibidores da DPP4, que prolongam o efeito insulínico do GLP-1, estão sendo utilizados como drogas antidiabéticas (23).

1.7.3 Linagliptina

A Linagliptina é uma droga hipoglicemiante, seu mecanismo de ação passa pela inibição da enzima e da adipocina DPP-4, impedindo a rápida degradação das incretinas intestinais (como GIP e GLP-1). Esta droga atua no metabolismo dos carboidratos e é indicada para pacientes com DM2, sendo associada a melhoras significativas na hemoglobina glicosilada, glicemia de jejum e pós-prandial (124).

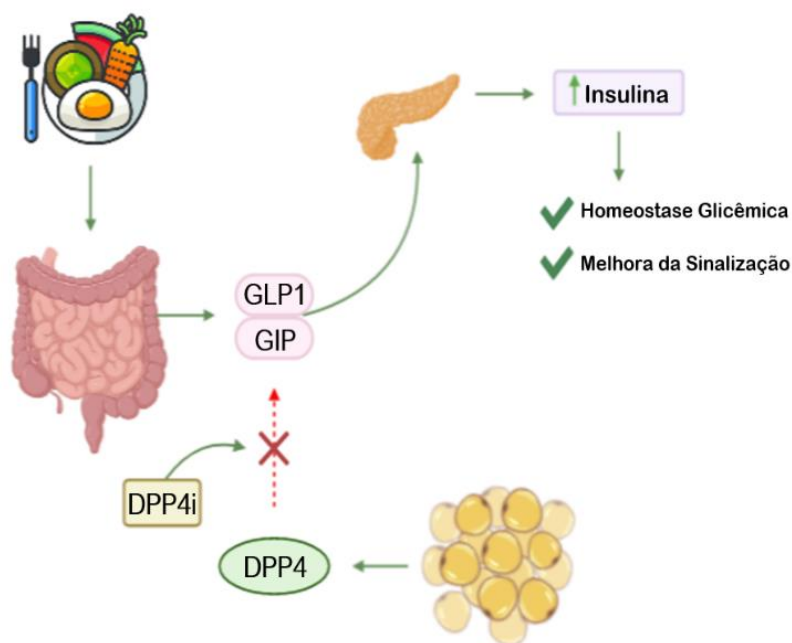
A inibição do DPP-4 promove um aumento da secreção pancreática de insulina pós-prandial devido à ação prolongada das incretinas. Portanto, o controle da glicose de pacientes resistentes à insulina pode ser melhorado. A ação da linagliptina é dependente da glicose e, portanto, apresenta baixo risco de eventos de hipoglicemia. A droga pode manter >80% da inibição de DPP-4 durante 24 h em humanos. A linagliptina é atualmente usada como monoterapia ou combinada com outras drogas em humanos visando a homeostase glicêmica, com potenciais benefícios cardiorrenais. Esta droga difere de outras gliptinas por ter uma

excreção predominante pelas fezes, permitindo a administração em pacientes com insuficiência renal sem ajuste de dose (124-126).

Em estudos experimentais com camundongos obesos, o tratamento com linagliptina promoveu redução da RI, mitigação da esteatose hepática e polarização de macrófagos para o fenótipo M2, favorecendo a secreção de adipocinas antiinflamatórias e a adiponectina, além de ativar fatores de transcrição envolvidos no metabolismo oxidativo de lipídios, como os PPARs (24, 127). Foi demonstrado, recentemente, que uma dose alta de linagliptina induziu a termogênese adaptativa e polarização de macrófagos para o fenótipo M2 em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (25). Macrófagos no estado de ativação M2 estão diretamente relacionados ao aumento da biogênese mitocondrial devido à inibição do NF- κ B e a consequente indução do PGC1- α (128, 129). Vale ressaltar que a biogênese mitocondrial é um fator chave para indução de adipócitos beges (130).

O uso de DPP4i como agente hipoglicemiante oral pode resultar em efeitos pleiotrópicos benéficos quando se trata dos comprometimentos metabólicos oriundos da obesidade (25). Na Figura 8 observamos de forma esquematizada a inibição da DPP-4.

Figura 8 - Inibição da DPP-4



Legenda: Dipeptidil peptidase 4 (DPP-4); Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) e Peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).

Nota: Esquema representativo da produção, ação e inibição pela DPP-4 das incretinas intestinais.

Fonte: A autora, 2021.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da combinação do agonista PPAR- α WY14643 e do DPP4i linagliptina sobre o remodelamento do tecido adiposo branco subcutâneo num modelo experimental de obesidade, com ênfase na indução de células adiposas beges e termogênese associada, alvos importantes para o tratamento da obesidade.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) avaliar os efeitos do excesso de lipídios sobre a MC, distribuição de gordura corporal, metabolismo lipídico e tolerância oral à glicose;
- b) examinar o efeito da dieta e do tratamento sobre a morfologia do TABs;
- c) determinar a expressão gênica de fatores implicados na termogênese adaptativa, biogênese mitocondrial, marcadores de adipócitos beges, metabolismo energético e estresse do retículo endoplasmático no TABs;
- d) utilizar a microscopia confocal a fim de caracterizar adipócitos beges ou focos de termogênese pela marcação da UCP1 no TABs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Os procedimentos realizados ocorreram de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996), além de seguirem as normas impostas no mundo e no Brasil e serem aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/022/2018.

Quarenta camundongos C57BL/6 machos foram obtidos do biotério central da Universidade Federal Fluminense (UFF) e mantidos no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC) em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $60 \pm 10\%$, ciclo claro-escuro 12:12h), com livre acesso à alimentação e à água, em caixas “*pathogen-free*” durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

Com três meses de idade, os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos nutricionais por 12 semanas: dieta rica em gordura (HF, $n=20$, 14% da energia advinda de proteínas; 50% de lipídios e 36% de carboidratos; energia total de 20.90 kJ/g), e dieta controle (C, $n=20$, 14% da energia advinda de proteínas, 10% de lipídios e 76% de carboidratos; energia total de 15.88 kJ/g). Todas as dietas foram produzidas pela empresa Prag soluções (Jaú-SP, Brasil) de acordo com as recomendações da AIN-93M para roedores (131).

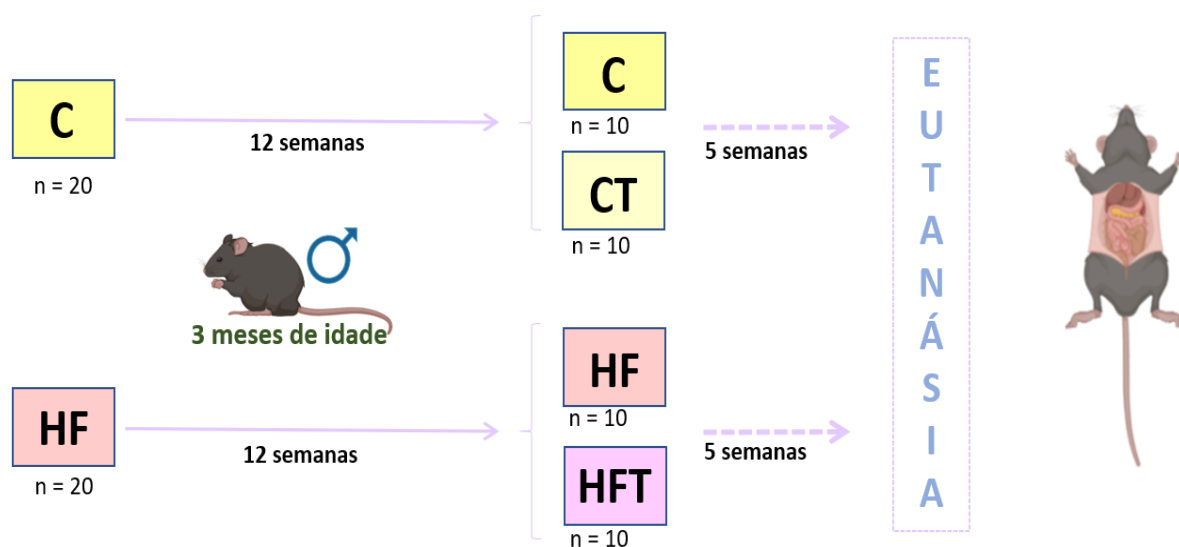
Após as primeiras 12 semanas de indução a obesidade, um tratamento de cinco semanas foi iniciado, com os seguintes grupos divididos aleatoriamente:

- a) **C** ($n = 10$), dieta controle ao longo de todo experimento, não tratado;
- b) **CT** ($n = 10$), dieta controle, tratado com agonista PPAR-alfa (WY14643, Cayman Chemical, Michigan, EUA) + linagliptina (Trayenta, Boehringer Ingelheim, Alemanha);
- c) **HF** ($n = 10$), dieta rica em gordura ao longo de todo experimento, não tratado;

d) **HFT** (N=10), dieta rica em gordura, tratado com agonista PPAR-alfa + linagliptina.

Ambos os medicamentos foram incorporados nas dietas na dose de 2,5 mg/kg de MC para o WY14643 e 15 mg/kg de MC para a linagliptina (94, 127). Na Figura 9, abaixo, observamos de forma esquematizada o desenho experimental.

Figura 9 - Desenho experimental



Legenda: Controle (C); Controle Tratado com agonista PPAR-alfa + linagliptina (CT); Hiperlipídico (HF) e Hiperlipídico Tratado com agonista PPAR-alfa + linagliptina (HFT).

Nota: Esquema representativo dos grupos experimentais.

Fonte: A autora, 2021.

É importante ressaltar que o conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas eram idênticos e estavam de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (131) para o período de manutenção dos animais a partir dos três meses de idade. As dietas experimentais encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais

Nutrientes	Dietas	
	Controle	HF
Caseína	140,0	175,0
Amido de milho	620,7	347,7
Sacarose	100,0	100,0
Banha de porco	---	238,0
Frutose	---	---
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	5000
Carboidrato (% , energia)	76	36
Frutose (% , energia)	---	---
Proteína (% , energia)	14	14
Lipídios (% , energia)	10	50

Nota: Composição nutricional das dietas controle e *high Fat*.
 Fonte: A autora, 2021.

3.2 Massa Corporal, ingestão alimentar e ingestão energética

Durante todo o período experimental, a MC dos animais foi mensurada semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). A ingestão alimentar média foi obtida diariamente durante todo o protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi realizada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias é convertido para quilojoules, medida universal de energia.

3.3 Teste de tolerância oral á glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado nos camundongos na semana anterior à eutanásia. Os animais ficaram em jejum durante o período de 6 horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril – 0,9% NaCl) na dosagem de 2g/kg MC. O sangue dos animais foi obtido por ordenha da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após à sobrecarga de glicose para a verificação dos níveis glicêmicos com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). O tempo zero (0) foi utilizado para o cálculo da glicose em jejum. A área sob a curva (ASC) foi calculada usando a ferramenta trapezoide do programa GraphPad Prism versão 8.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 Calorimetria indireta

Uma semana antes do sacrifício, os animais seguiram um protocolo de 48 horas (com livre acesso à dieta e à água) no sistema de Oxylet (Panlab/ Harvard, Barcelona, Spain), sendo as primeiras 24 horas descartadas como tempo de aclimação (132). Este sistema monitora o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2) e a taxa de troca respiratória, tendo os dados coletados a cada três minutos. O quociente respiratório (QR) foi calculado pela razão entre a VCO_2 e o consumo de oxigênio VO_2 .

3.5 Termografia

Com auxílio da câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA), foi possível aferir a temperatura corporal dos animais. As imagens foram captadas em temperatura ambiente, com animais conscientes (sem utilização de sedativos), na 16ª semana de experimento.

3.6 Eutanásia

Após 17 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos a jejum de seis horas e, após administração de heparina, foram anestesiados com cetamina, 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg. Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do átrio direito; as quais foram destinadas à centrifugação (3.500rpm, por 15 minutos) e congelamento (-80°C) para posterior análise bioquímica. O TABs da região inguinal (localizado entre a parte inferior da caixa torácica e o meio do membro inferior) foi cuidadosamente dissecado, teve sua massa aferida em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H) e fixado em formalina de Millonig (para técnica de microscopia de luz) ou congelado (-80°C, para análises moleculares). Além disso, para avaliar a distribuição da gordura, os compartimentos, retroperitoneal (ligada à parede posterior do abdômen e aos rins e ureteres) e epididimária (ligada ao epidídimo, na porção inferior do abdômen) foram cuidadosamente dissecados e pesados e corresponderam a gordura intra-abdominal.

3.7 Análise plasmática

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120g por 15 minutos) e estocado em freezer -80°C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de GLP-1, insulina e leptina foram analisados em duplicata com kits de ensaio imunoenzimático comercialmente disponíveis (Multi-species GLP-1 ELISA Kit Cat. #EZGLP1T-36K; Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. #EZRMI-13K e Rat/Mouse Leptin ELISA kit Cat. #EZML-82K, Millipore, Missouri, USA), usando o equipamento Fluostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Alemanha).

3.8 Microscopia de luz e estereologia

Após dissecação e pesagem, o TABs dos animais foi fixado durante 48 horas em formalina de Millonig (formaldeído a 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2), desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast plus® (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Os fragmentos de tecido foram cortados com 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina, seguindo protocolos previamente estabelecidos para o tecido em questão. Foram realizadas imagens digitais em campos microscópicos aleatórios e não consecutivos, com microscópio Olympus BX51 e câmera acoplada (Infinity 15c, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada), através do software Image-Pro Plus (versão 7.0 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Campos aleatórios foram fotografados para estimar a área da seccional média dos adipócitos: densidade de volume (Vv) de adipócitos dividida pelo dobro da densidade numérica de adipócitos por área (QA) (133). Um sistema teste de 16 pontos, composto pelo software STEPanizer, foi usado para estimar Vv de adipócitos (pontos que atingem os adipócitos divididos pelo número total de pontos dentro do sistema de teste). Inversamente, a estimativa de QA foi realizada considerando o número de adipócitos dentro de uma área de teste (exceto os adipócitos que tocam as linhas proibidas) dividido pela área do sistema de teste, calculado após a calibração do STEPanizer (134).

3.9 Imunofluorescência

Após a remoção da parafina, recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6.0 a 60°C), e bloqueio de ligações não específicas (2% de glicina e 5% de albumina de soro bovino em solução salina tampão fosfato), lâminas de TABs com 5 µm de espessura foram incubadas com anticorpo primário anti-UCP1 (1:50 CSB-PA025554ESR2HU, Cusabio Technology LLC, Houston, TX, EUA) durante a noite, seguido de incubação com o anticorpo secundário conjugado com o Alexa Fluor 488 (Rabbit anti-Mouse IgG H+L, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O SlowFade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) foi usado para montar as lâminas para manter a fluorescência até análises no microscópio de fluorescência (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy - Modelo C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

3.10 PCR quantitativo em tempo real

Uma alíquota de 50mg do TABs coletado foi transferido para microtubos autoclavados contendo solução de lise para que o RNAm fosse extraído e isolado. A quantidade de RNA foi determinada usando espectroscopia Nanovue (GE Life Sciences) e a primeira cadeia de cDNA foi sintetizada a partir do RNAm das amostras. A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando um ciclador StepOne plus e a mistura SYBR Green (Invitrogen). Os primers foram projetados usando o software online Primer3web versão 4.0.0 e estão descritos no Quadro 2.

O gene da beta-actina foi usado como um controle endógeno para normalizar a expressão do gene selecionado. As eficiências de RT-qPCR para o gene alvo e o controle endógeno foram aproximadamente iguais e foram calculadas a partir de uma série de diluições de cDNA. A razão de expressão relativa do RNAm (RQ) foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em que $2\Delta Ct$ expressa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno. Ao longo do texto, os genes serão descritos com a primeira letra maiúscula e em itálico e as proteínas com siglas em letras maiúsculas, conforme padronizado internacionalmente (135).

Quadro 2 - Detalhamento dos primers utilizados

Primers	Forward	Reverse
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Beta-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Chop</i>	CTGCCTTTTACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Cidea</i>	CTCGGCTGTCTCAATGTCAA	GGAAGTGTCCCGTCATCTGT
<i>Cpt1b</i>	GGCTGCCGTGGGACATT	TGCCTTGGCTACTTGGTACGA
<i>Dpp4</i>	TGGTACACGGATGAAGACCA	GAA ATGGCTCATGTGGGA AT
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTTCGTCACCAGCACACAGT
<i>Nlpr3</i>	ATGCTGCTTCGACATCTCCT	GTTTCTGGAGGTTGCAGAGC
<i>Pdk4</i>	CACCACATGCTCTTCGAACCTCT	AAGGAAGGACGGTTTTCTTGA
<i>Pgc1-a</i>	GTCAACAGCAAAAGCCACAA	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT
<i>Plin1</i>	ACGACCAGACAGACACAGAG	GGCTGTAACCTCTCTGAGCA
<i>Ppar-a</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
<i>Prdm16</i>	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
<i>β3ar</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	TTAGCCACAACGAACACTCG

Fonte: A autora, 2021.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão e analisados por teste t com correção de Welch nas primeiras doze semanas (dois grupos: C e HF) e por ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste Dunnett T3 no período de tratamento (quatro grupos: C, CT, HF e HFT), pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos (136). Em todos os casos, foi utilizado o índice de significância com $P < 0,05$ (GraphPadPrism, versão 8.3, CA, EUA).

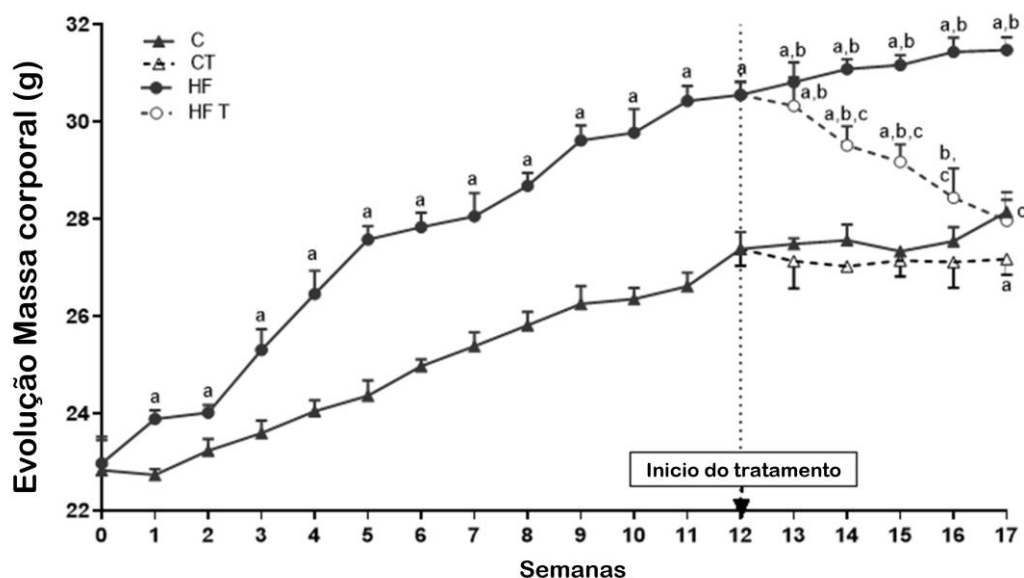
4 RESULTADOS

4.1 Comportamento alimentar e massa corporal

A maior densidade energética da dieta HF provocou ganho de MC e aumento da gordura distribuída em diferentes compartimentos. Os grupos C e HF iniciaram o experimento sem diferença significativa em relação à MC (semana 0). Após uma semana de ingestão da dieta hiperlipídica, o grupo HF apresentou MC mais alta do que o grupo C (+5,06%, $P < 0,0001$, Figura 10), que aumentou de forma constante durante as semanas restantes de indução à obesidade (+11,57%, $P < 0,0001$, semana 12, Figura 10). Este comportamento continuou até o final do protocolo experimental (+11,86%, $P < 0,0001$, Figura 10). O tratamento começou afetar a MC entre os grupos HFT e HF na segunda semana de administração, quando o grupo HFT apresentou redução significativa na massa corporal em comparação ao grupo HF (-5,05%, $P = 0,0010$, Figura 10). Na última semana de tratamento, o grupo HFT apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo HF (-11,15%, $P < 0,0001$, Figura 10), além de não apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo C. Na 17ª semana o grupo CT apresentou redução significativa da massa corporal quando comparado ao grupo C (-3,45%, $P = 0,0055$, Figura 10).

Além disso, não houve diferença quanto à ingestão alimentar entre os grupos durante todo o experimento (Tabela 2). No entanto, os animais alimentados com dieta HF apresentaram maior ingestão de energia do que os alimentados com dieta C (+31,73% $P < 0,0001$ para HF vs. C; +30,52%, $P < 0,0001$ para HFT vs. CT, Tabela 2), como era esperado devido à alta densidade energética da dieta HF. Estas observações excluem a necessidade de grupos de alimentação *pair-feeding* para isolar os efeitos da redução do consumo de energia sobre os resultados analisados.

Figura 10- Evolução da massa corporal



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Evolução da massa corporal conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média ± DP, $n = 10$ por grupo). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: $a \neq C$; $b \neq CT$; $c \neq HF$.

Fonte: A autora, 2021.

Tabela 2 - Comportamento Alimentar

Dados	C	CT	HF	HFT
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	3.07 ± 0.03	3.08 ± 0.03	3.08 ± 0.01	3.06 ± 0.02
Ingestão energética (kJ/dia/animal)	48.80 ± 0.59	49.07 ± 0.44	$64.29 \pm 0.30^{a,b}$	$64.04 \pm 0.59^{a,b}$

Nota: Valores representados como média ± DP, $n=5$ por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq CT$; $c \neq HF$. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3.

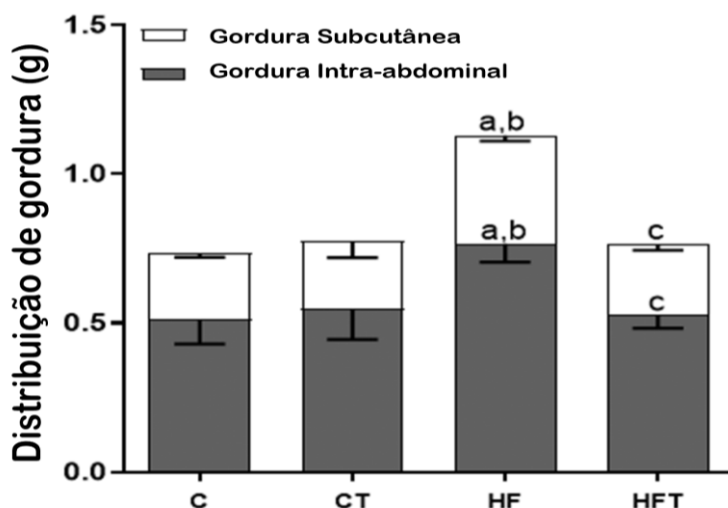
Fonte: A autora, 2021.

4.2 Distribuição de gordura

A distribuição de gordura entre os diferentes compartimentos mostrou que o grupo HF apresentou maior acúmulo de gordura intra-abdominal que o grupo C (+49,72%, $P = 0,0048$, Figura 11), enquanto o grupo HFT teve uma redução expressiva do acúmulo de gordura intra-

abdominal quando comparado ao grupo HF (-31,02%, $P = 0,0013$, Figura 11), assemelhando-se aos valores dos grupos C e CT. Estes dados mostram que o tratamento proposto foi eficaz em reduzir esse depósito adiposo, mesmo com a continuação da ingestão excessiva de gordura saturada na dieta HF pelo grupo HFT. Com relação à gordura subcutânea, o grupo HF apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo C (+63,32%, $P < 0,0001$, Figura 11), enquanto o tratamento reduziu significativamente o acúmulo de gordura subcutânea (-35,24%, para HFT vs HF, $P < 0,0001$, Figura 11). Ambos os grupos tratados (CT e HFT) não apresentaram diferença para o grupo C.

Figura 11- Distribuição de gordura



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Distribuição de gordura conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média $\pm$ DP, $n = 5$ por grupo). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: a $\neq$ C; b $\neq$ CT; c $\neq$ HF.

Fonte: A autora, 2021.

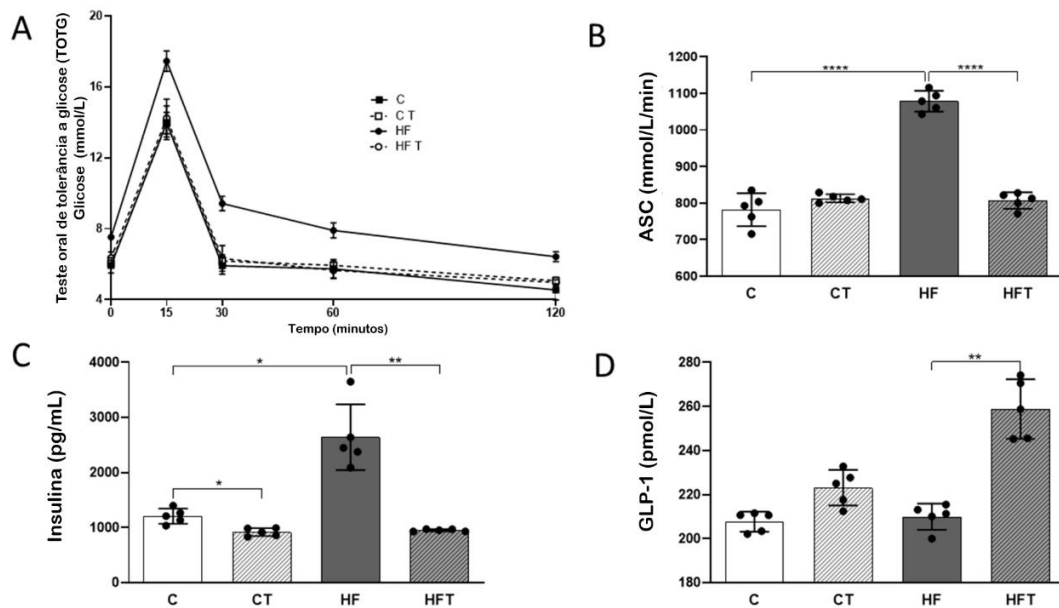
4.3 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG), insulina plasmática e GLP-1 plasmático

O grupo HF apresentou uma maior glicemia de jejum do que o grupo C (+26,72%, $P = 0,0023$, Figura 12A). O tratamento reduziu a glicemia no grupo HFT quando comparado ao grupo HF (-13,13%, $P = 0,0034$, Figura 12A), sugerindo um resgate completo deste parâmetro, pois os valores glicêmicos do HFT não diferiram dos grupos C e CT.

A análise da ASC revelou que a dieta HF produziu a intolerância oral à glicose pelo aumento dos valores da ASC no grupo HF quando comparado ao grupo C (+45,69%, $P < 0,0001$, Figura 12B). O tratamento mitigou a intolerância oral à glicose, causando uma redução significativa da ASC no grupo HFT (-26,09%, $P < 0,0001$, Figura 12B), além de uma semelhança com C e CT (Figura 12B). Esta observação implica que o tratamento reverteu a intolerância à glicose oral no grupo HFT.

Corroborando com os resultados do TOTG, o grupo HF mostrou hiperinsulinemia (+118,63%, $P = 0,0272$, Figura 12C), enquanto ambos os grupos tratados tiveram uma redução significativa dos níveis de insulina quando comparados as suas contrapartes não tratadas (-24,05%, $P = 0,0275$ para o CT e -63,97%, $P = 0,0138$ para o HFT, Figura 12C). Em contraste com os resultados de insulina, o grupo HFT mostrou concentrações elevadas de GLP-1 em comparação com o grupo HF (+23,29%, $P < 0,0001$, Figura 12D), sugerindo que o tratamento aumentou eficientemente o tempo de ação dessa incretina em camundongos alimentados com HF.

Figura 12 - Metabolismo de carboidratos: Curva glicêmica, área sob a curva, insulina plasmática e GLP-1 plasmático



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Curva de teste de tolerância à glicose oral (A); área sob a curva (B); concentrações de insulina plasmática (C); concentrações de GLP-1 plasmática (D). Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média $\pm$ DP, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

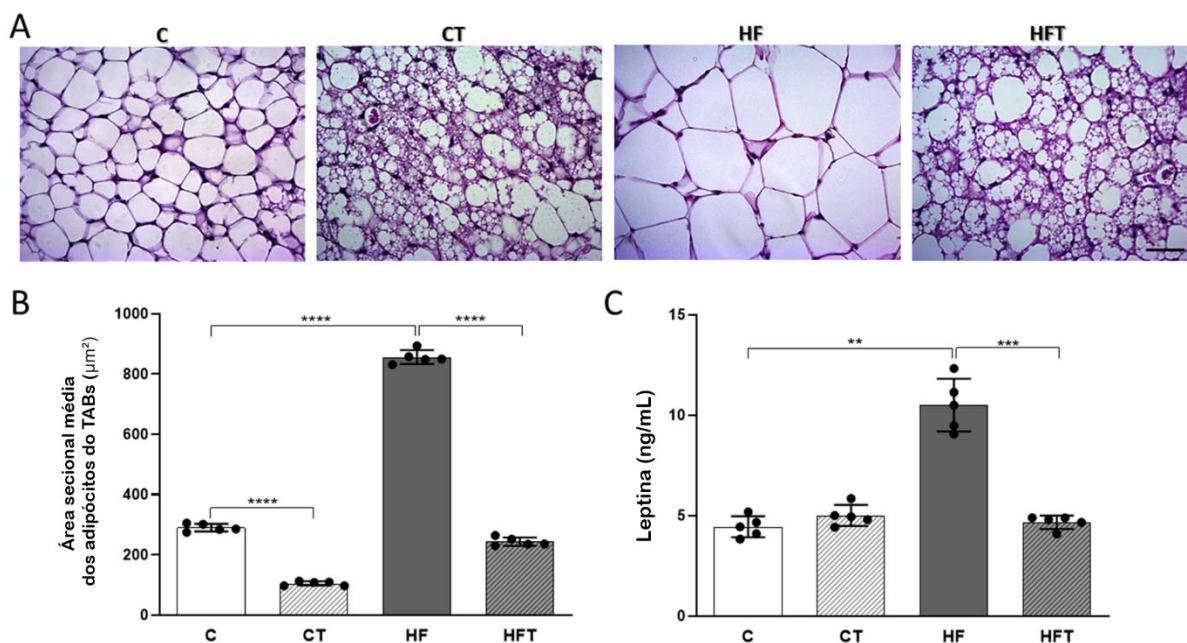
Fonte: A autora, 2021.

4.4 Morfologia do TABs e Leptina

As fotomicrografias mostram adipócitos uniloculares no grupo C em contraste com os adipócitos uniloculares hipertrofiados no grupo HF (Figura 13A). Ambos os grupos tratados (CT e HFT) mostraram adipócitos uniloculares de tamanho normal entre os adipócitos multiloculares, caracterizando o *browning* do TABs (Figura 13A). A estereologia apoiou os achados histológicos, já que o grupo HF mostrou uma área seccional média de adipócitos maior do que o grupo C (+195,04%, $P < 0,0001$, Figura 13B), indicando hipertrofia e confirmando a indução da obesidade. Entretanto, os animais tratados apresentaram uma área seccional média de adipócitos menor do que suas contrapartes não tratadas (-63,84%, $P < 0,0001$, para CT vs C; e -71,56%, $P < 0,0001$ para HFT vs HF, Figura 13B).

As concentrações de leptina plasmática reforçam os achados morfológicos e estereológicos. O grupo HF mostrou hiperleptinemia (+136,11%, $P=0,0010$, para HF vs. C, Figura 13C), enquanto o tratamento causou uma redução significativa nas concentrações de leptina (-55,52%, $P=0,0010$ para HFT vs. HF, Figura 13C). Os grupos C e CT não diferiram.

Figura 13 - Morfologia e estereologia do TABs e leptina



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Histologia TABs (A); área transversal de adipócitos do TABs (B); concentrações de leptina plasmática (C). Fotomicrografias de tecido adiposo subcutâneo branco corado com hematoxilina-eosina, mostrando adipócitos hipertrofiados no grupo HF e adipócitos brancos de tamanho normal entrelaçados com adipócitos beges nos grupos CT e HFT, barra de escala = 50 μm. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média ± DP, $n=5$). As diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: a ≠ C; b ≠ CT; c ≠ HF.

Fonte: A autora, 2021.

4.5 Calorimetria indireta, imunofluorescência e termografia

O ensaio de calorimetria indireta revelou que o grupo HF apresentou um aumento significativo do QR em comparação ao grupo C (+8,33%, $P=0,0009$, Tabela 3), enquanto o grupo HFT apresentou diminuição significativa da taxa quando comparado ao grupo HF (-9,89%, $P<0,0001$, Tabela 3), sem diferença com os grupos C e CT.

A imunofluorescência para UCP1, a proteína que está intimamente relacionada à atividade termogênica, revelou expressão proteica positiva em ambos os grupos tratados, confirmando a presença de adipócitos beges funcionais nos grupos CT e HFT (Figura 14A). Além disso, a temperatura corporal média aumentou significativamente após o tratamento (+2,65%; $P=0,0033$ para CT vs. C; e +1,37%; $P=0,0365$ para HFT vs. HF, Tabela 3 e Figura 14B), implicando no aumento da termogênese e na liberação de energia como calor.

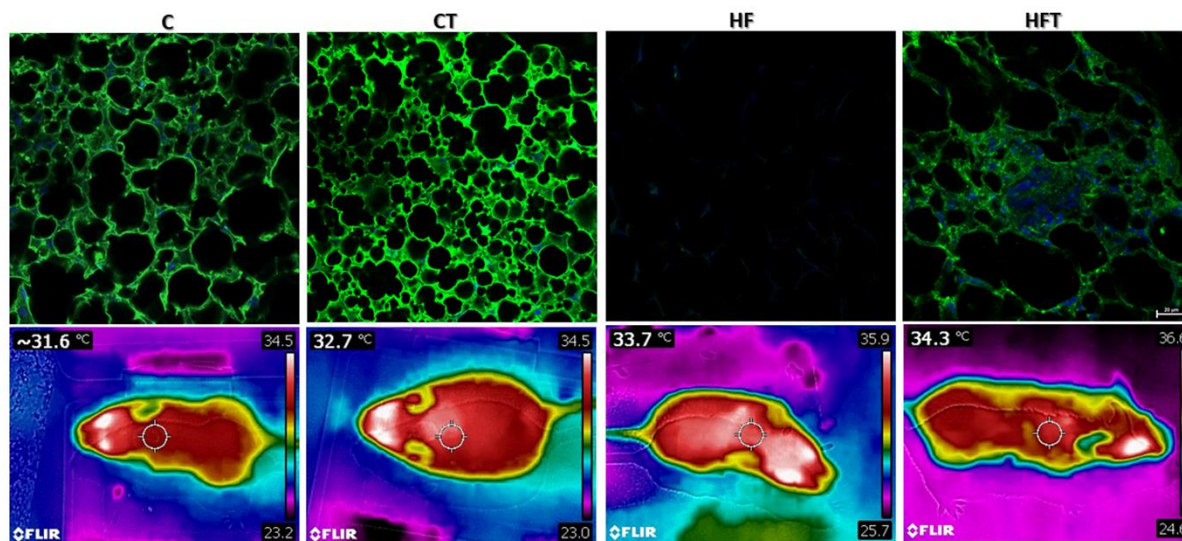
Tabela 3- Termografia e calorimetria indireta

Dados	C	CT	HF	HFT
Temperatura corporal (°C)	31.70 ± 0.27	32.54 ± 0.27 ^a	33.64 ± 0.11 ^{a,b}	34.10 ± 0.23 ^{a,b,c}
Quociente respiratório (CO ₂ /O ₂)	0.84 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.91 ± 0.15 ^{a,b}	0.82 ± 0.18 ^c

Nota: Valores representados como média ± DP, n=5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P<0,05$): a ≠ C; b ≠ CT; c ≠ HF. Conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 14 - Imunofluorescência e termografia



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Imunofluorescência UCP1 com fotos representativas do padrão do grupo (painel superior) e termografia infravermelha (painel inferior). As áreas UCP1 positivas aparecem em verde, mostrando imunoreações positivas tanto para os grupos tratados como a ausência de expressão UCP1 no grupo HF (painel superior). A termografia infravermelha mostrou aumento da temperatura corporal nos grupos tratados (painel inferior). Ambos os resultados sugerem aumento da termogênese após o tratamento.

Fonte: A autora, 2021.

4.6 PCR quantitativo em tempo real

4.6.1 Expressão Gênica: Marcadores Termogênicos

A expressão relativa do RNAm de *Ppar- α* , um fator de transcrição que tem marcadores termogênicos como genes-alvo, foi menor no grupo HF que no grupo C (-50,16%, $P=0,0102$, Figura 14A) e maior em ambos os grupos tratados que em suas contrapartes não tratadas (+189,30% no CT vs. C, $P=0,0015$, +296,27% no HFT vs. HF, $P<0,0130$, Figura 15A.)

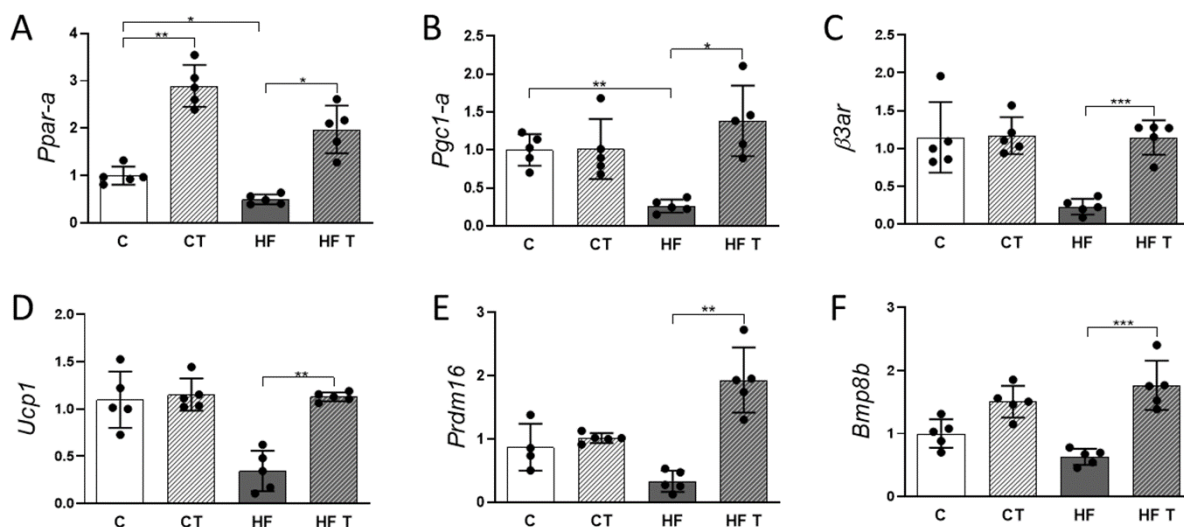
O regulador de biogênese mitocondrial *Pgc1- α* apresentou expressão reduzida no grupo HF quando comparado ao grupo C (-73,86%, $P=0,0035$, Figura 15B) e aumentada no grupo HFT quando comparado com o grupo HF (+429,84%, $P=0,0257$, Figura 15B). É importante ressaltar que o grupo HFT não diferiu do grupo C, assim como o grupo CT.

Da mesma forma, a expressão relativa do RNAm de *$\beta 3$ -ar* também aumentou no HFT em comparação com o grupo HF (+396,10%, $P=0,0009$, Figura 15C), implicando que o tratamento ativou a termogênese através do estímulo beta-adrenérgico.

A expressão relativa de *Ucp-1*, responsável pela dissipação de calor na cadeia respiratória mitocondrial, corrobora com os dados anteriores, tendo sua expressão reduzida no grupo HF quando comparada ao grupo C (-68,58%, $P=0,0128$, Figura 15D), e aumentada no grupo HFT quando comparada ao grupo HF (+227,25%, $P=0,0058$, Figura 15D).

O *Prdm16*, gene essencial para manutenção do fenótipo bege no TABs, teve a expressão mais alta no grupo HFT que nos grupos HF e C (+478,35%, $P=0,0056$ e +121,92%, $P=0,0436$, respectivamente, Figura 15E). O grupo CT e sua contraparte não tratada apresentaram diferenças significativas. Com relação à *Bmp8b*, uma batocina envolvida na regulação da termogênese e do equilíbrio energético, também não apresentou diferença significativa entre o grupo C e CT, tendo sua expressão elevada no grupo HFT quando comparado ao grupo HF (+117,50%, $P<0,0076$, Figura 15F).

Figura 15 - Genes marcadores termogênicos



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Expressão gênica de *Ppar-a* (A), *Pgc1-a* (B), *β3ar* (C), *Ucp1* (D), *Prdm16* (E) e *Bmp8b* (F), conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média ± DP, n = 5). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2021.

4.6.2 Expressão Gênica: Marcadores Inflamatórios

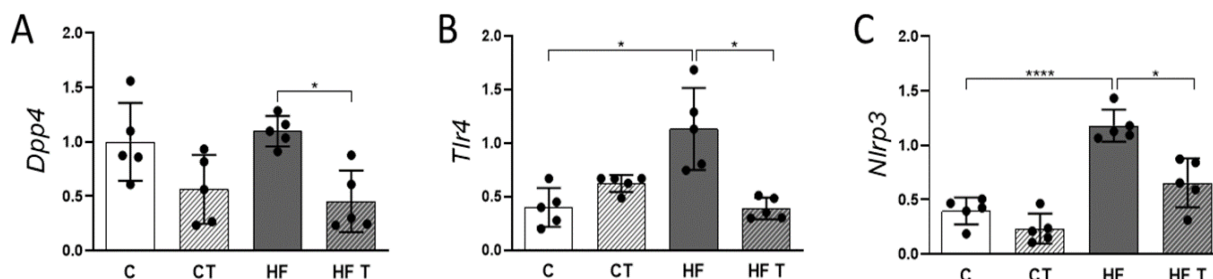
A expressão relativa do RNAm do *Dpp4*, um adipocina pró-inflamatória e alvo de linagliptina, não diferiu entre os grupos C e HF. Entretanto, o tratamento causou uma redução significativa na expressão no grupo HFT quando comparado ao grupo HF (-58,67%, $P = 0,0185$, Figura 16A).

O *Tlr4*, um receptor pró-inflamatório, mostrou maior expressão no grupo HF que no grupo C (+183,46%, $P = 0,0398$, Figura 15B). No entanto, o tratamento provocou uma redução da expressão do *Tlr4* no grupo HFT em comparação com o grupo HF (-65,58%, $P = 0,0390$, Figura 16B), o que sugere uma termogênese melhorada. Além disso, o grupo HFT não diferiu do grupo C.

Da mesma forma, a expressão de *NLRP3*, um inflamassoma que leva ao processamento e secreção de citocinas pró inflamatórias, apresentou maior expressão no grupo HF que no grupo C (+197,20%, $P < 0,0001$, Figura 16C). Por outro lado, o grupo HFT teve uma redução acentuada na expressão de *Nlrp3* quando comparado ao grupo HF (-

44,47%, $P=0,0168$, Figura 16C). Estes dados indicam que a obesidade causou inflamação local no TABs e o tratamento reverteu esta condição adversa.

Figura 16 - Genes marcadores da inflamação



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Expressão gênica de *Dpp4* (A), *Tlr4* (B), *Nlrp3* (C), conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média $\pm$ DP, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2021.

4.6.3 Expressão Gênica: Marcadores do estresse do RE

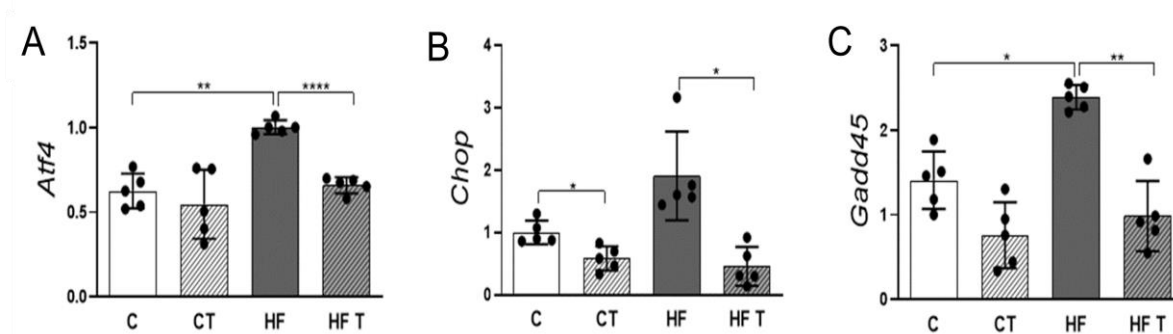
A Expressão *Atf4*, um fator de transcrição que regula vários genes envolvidos na resposta às proteínas desdobradas (UPR) como resultado ao estresse do RE, foi maior no grupo HF quando comparada ao grupo C (+60,90%, $P=0,0020$, Figura 17A). Em contraste, o grupo HFT apresentou expressão reduzida de *Atf4* quando comparada ao grupo HF (-34,22%, $P < 0,0001$, Figura 17A). Os grupos C e CT não apresentaram diferenças significativas entre eles.

Chop, um fator de transcrição que está envolvido na mediação da apoptose, apresentou a expressão aumentada no grupo HF em comparação ao grupo C (+90,50%, $P = 0,0146$, Figura 17B), enquanto os grupos CT e HFT mostraram expressão reduzida em relação aos seus homólogos (-41,94, $P = 0,0419$, para o CT vs. C; e - 76,08%, $P = 0,0002$, para o grupo no HFT vs. HF, Figura 17B).

Da mesma forma, *Gadd45* mostrou expressão mais alta no grupo HF do que no grupo C (+ 69,69%, $P = 0,0090$, Figura 17C), paralelamente a valores mais baixos no HFT do que no grupo HF (-58,80%, $P=0,0039$, Figura 17C). Estas descobertas reforçam os efeitos

benéficos da ativação do PPAR-alfa associada à inibição da DPP4 sobre a função do RE, atenuando a expressão dos genes ligados à UPR e apoptose.

Figura 17 - Genes marcadores da inflamação e estresse do retículo endoplasmático



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Expressão gênica de *Atf4* (A), *Chop* (B) e *Gadd45* (C), conforme determinado pelo *one-way* ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média $\pm$ DP, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

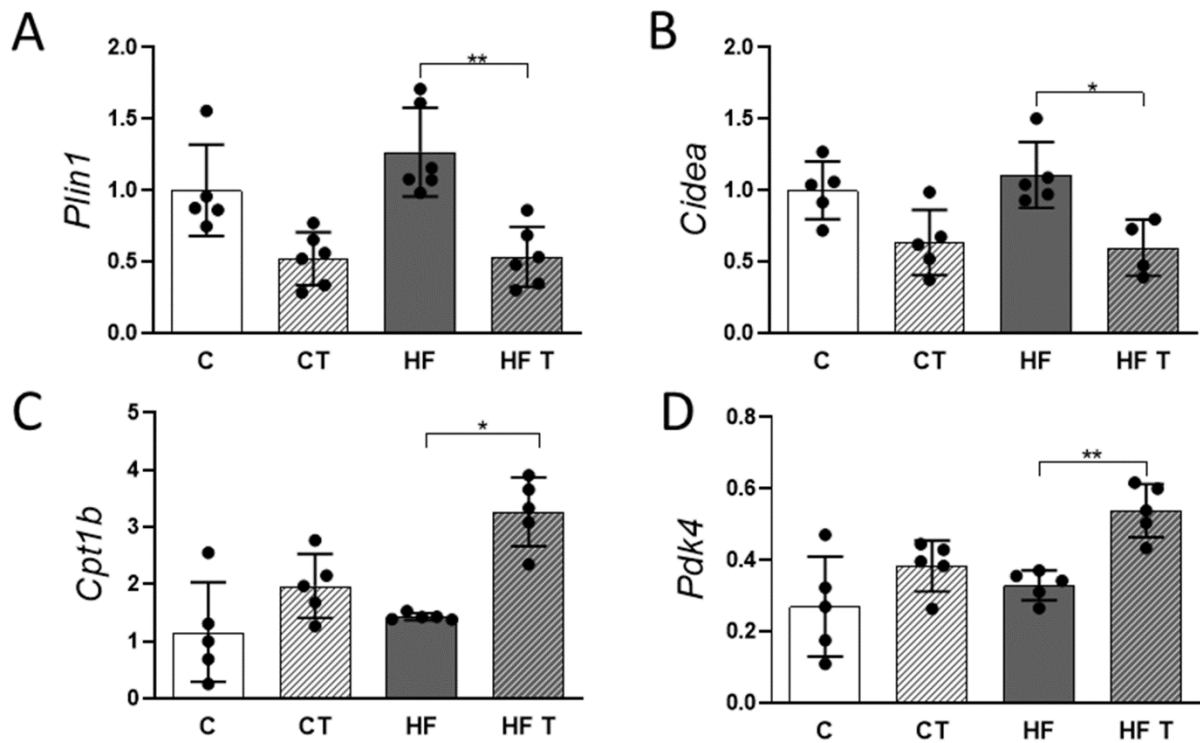
Fonte: A autora, 2021.

4.6.4 Expressão Gênica: Marcadores da oxidação lipídica e metabolismo energético celular

Cidea, cuja expressão se correlaciona com o acúmulo de gordura dentro do TAB, mostrou menor expressão nos grupos tratados. Entretanto, somente o HFT teve uma redução significativa em relação ao grupo HF (-45,95%, $P = 0,0444$, Figura 18B). Da mesma forma, *Plin1*, relacionado à instabilidade das gotas lipídicas, mostrou uma expressão significativamente menor no grupo HFT em comparação com o grupo HF (-57,86%, $P = 0,0054$, Figura 18A).

A expressão relativa do *Cpt1b*, responsável pela beta-oxidação no TAB, melhorou no grupo HFT quando comparado ao grupo HF (+127,84%, $P = 0,0106$, Figura 18C). Além disso, a expressão do gene *Pdk4* aumentou no grupo HFT em comparação com o grupo HF (+63,75, $P = 0,0076$, Figura 18D). Estes achados sugerem que o lipídio foi o combustível preferencial para a termogênese induzida pelo tratamento.

Figura 18- Genes marcadores da oxidação lipídica e metabolismo energético celular



Legenda: Dieta controle (C); dieta de controle mais combinação de WY14643 e linagliptina (CT); dieta rica em gordura (HF); dieta rica em gordura mais combinação de WY14643 e linagliptina.

Nota: Expressão gênica de *Plin1* (A), *Cidea* (B), *Cpt1b* (C) e *Pdk4* (D), conforme determinado pelo one-way ANOVA com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste Dunnett T3 (média $\pm$ DP, $n = 5$). As diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas a seguir: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2021.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a dieta de HF durante 17 semanas causou excesso de peso, hipertrofia de adipócitos, resistência à insulina, aumento de marcadores pró-inflamatórios e estresse do RE, causando baixa expressão de UCP1. Por outro lado, os animais tratados com a combinação de agonista PPAR α e DPP4i se beneficiaram de normalização da MC, tolerância à glicose, tamanho de adipócitos, além de efeitos anti-inflamatórios e alívio do estresse do RE. Estes resultados positivos propiciaram a indução de adipócitos beges UCP1+ e aumentaram a termogênese, confirmando o *browning* do TABs

A alta densidade energética da dieta HF, proveniente do alto teor de ácidos graxos saturados, implicou no aumento da MC e distribuição de gordura dos compartimentos subcutâneo e intra-abdominal dos animais HF, como relatado anteriormente (25, 74, 137). O TAB sofre hipertrofia e hiperplasia, mas esta última é limitada, e o acúmulo de lipídios ectópicos ocorre a longo prazo (88). O tratamento isolado com PPAR- α (9, 74, 94) ou linagliptina (138) resultou na redução de MC anteriormente, assim como sua combinação fez no presente estudo. Este efeito pode ser explicado pelo tratamento, uma vez que a ingestão de alimentos dos grupos tratados não diferiu de suas contrapartes. O tratamento resultou na atenuação da resistência à insulina e mudanças morfológicas no TABs, induzindo a presença de adipócitos multiloculares bege UCP1+ com atividade termogênica e levando à diminuição da MC pelo aumento da dissipação de energia como calor (95).

Os animais do grupo HF apresentaram um eixo adipoinsular modificado, com hiperinsulinemia e hiperleptinemia (139). Este cenário está de acordo com o aumento da área seccional média dos adipócitos e com o mau desempenho no TOTG, com a maior ASC e intolerância oral à glicose. Inversamente, o tratamento restaurou a função do eixo adipoinsular, normalizando as concentrações plasmáticas de insulina e leptina, refletindo em adipócitos de tamanho normal (140). Estes efeitos combinaram as propriedades anti-inflamatórias e termogênicas do PPAR- α (9) com o aumento do efeito incretina pela linagliptina (122). A DPP4i estende a ação das incretinas, aqui detectada pelo aumento das concentrações plasmáticas de GLP-1. A GLP-1 potencializa a secreção de insulina estimulada pela glicose concomitantemente com a inibição do glucagon, suprimindo a gliconeogênese e a produção de glicose hepática (23, 122). O agonista PPAR- α está associado à concentrações elevadas de GLP-1 (26), o que permite a hipótese de que sua combinação com a linagliptina DPP4i é uma abordagem promissora para tratar a obesidade, maximizando os efeitos

sensibilizadores da insulina e anti-inflamatórios de ambos os agentes (24, 141, 142), resultando em aumento da termogênese.

Neste contexto, os grupos tratados apresentaram um aumento da temperatura corporal, sugerindo a dissipação de energia como calor. Com relação ao combustível preferido da termogênese, a ativação do PPAR- α desencadeia a beta-oxidação (36), demonstrada aqui pelo aumento de *Cpt1b* no grupo HFT. Além disso, a linagliptina parece ativar o PPAR- α como um efeito pleiotrópico, que pode maximizar o uso de lipídios mitocondriais para termogênese (25, 94). Portanto, pode-se argumentar que a ingestão excessiva de lipídios seguiu o caminho da via termogênica em vez de ser armazenada (86).

Junto com estes dados metabólicos, a imunofluorescência confirmou os adipócitos multiloculares observados nos grupos tratados como UCP1+. A via termogênica depende da estimulação adrenérgica para ser iniciada, visto que para ocorrência da termogênese adaptativa é necessária estimulação simpática, e da UCP1, que atua como um canal alternativo ao retorno de gradiente de prótons do espaço intermembranas mitocondrial, desacoplando a utilização de energia da síntese ATP e liberando energia como calor em seu lugar (95, 143). O tratamento causou hiper regulação de $\beta 3$ -ar e *Ucp1* em animais alimentados com HF, além de aumento de *Bmp8b*, implicando uma maior reatividade termogênica no TABs ao estímulo adrenérgico (144). Vale ressaltar que a temperatura utilizada no presente estudo não é capaz de induzir o *browning* do próprio TABs, de modo que apenas temperaturas inferiores a 4° C são capazes de induzir a formação de adipócitos beges (145) e que o fenômeno do *browning* é reversível, sendo necessário o aumento da expressão *Prdm16* para manter o fenótipo bege (13). O tratamento produziu a expressão mais pronunciada do gene *Prdm16* no grupo HFT. Assim, estas observações asseguram que não somente o tratamento induziu adipócitos beges, mas também que estes adipócitos eram competentes para termogênese (10).

Com relação ao metabolismo celular, o TAB de camundongos obesos e resistentes à insulina se beneficia da hiper-regulação de *Pdk4* (146), pois significa inibição da absorção de glicose pelas células (147). Assim, a alta expressão do *Pdk4* indica a utilização de lipídios como combustível para o adipócito bege no grupo HFT. A via do *Pdk4* no tecido adiposo dos roedores alimentados com HF não é como os roedores magros (148). O aumento da estimulação adrenérgica e da ativação de PPAR-alfa pelo WY14643 pode induzir *Pdk4* no TAB e pode surgir como um indicador do *browning* no TABs (148, 149). De acordo com a preferência pelos lipídios como combustível para a termogênese, os animais HFT mostraram uma desregulação de *Plin1* e *Cidea*, implicando em gotas de lipídios mais estáveis (150) e

menores (151, 152) dentro dos adipócitos beges observados. Estas observações sugerem que a sobrecarga lipídica da dieta HF supriu o metabolismo celular no TABs.

Os mecanismos de ação propostos atribuídos ao agonista PPAR- α para a indução do fenômeno *browning* compreendem um metabolismo lipídico favorecido pela hiper-regulação da *Ucp1*, um gene alvo PPAR- α , além de beta-oxidação e biogênese mitocondrial melhorada (153, 154). O *Pgc1a*, um marcador essencial de biogênese mitocondrial, também é fundamental para ativar a transcrição *Ucp1* (95, 145). A combinação do agonista PPAR- α com o DPP4i normalizou a expressão de *Pgc1a* no grupo HFT, que mostrou valores similares aos grupos C e CT. Este resultado indica o aumento da biogênese mitocondrial no grupo HFT, uma estratégia viável para combater a obesidade, sustentando a nova fisiologia do adipócito que favorece a termogênese em detrimento da lipogênese (155, 156).

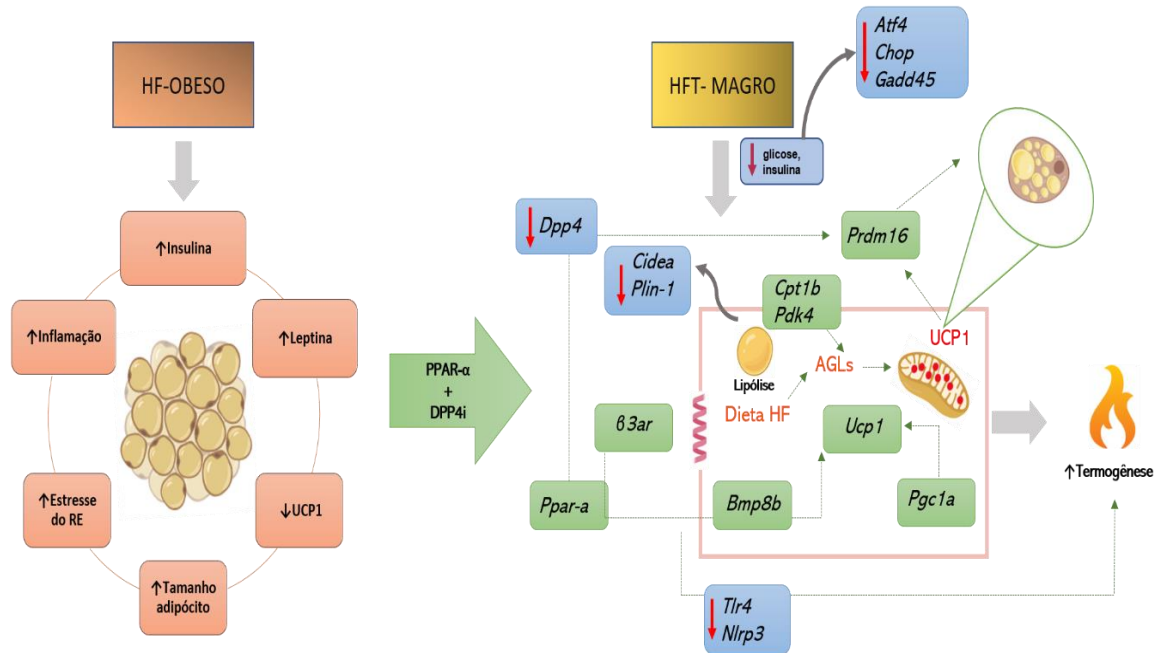
A ação de linagliptina engloba o aumento das concentrações de GLP-1 no plasma pela inibição da DPP-4 (38). A DPP-4 é o sítio catalítico do CD26 e também é reconhecido como uma adipocina, cujos níveis aumentam com a hipertrofia de adipócitos (21, 119). O aumento do tamanho dos adipócitos compreende a infiltração e acumulação de macrófagos M1, configurando um estado inflamatório de baixo grau que se correlaciona com comorbidades de obesidade (157). O DPP4i linagliptina neutraliza a inflamação desencadeando a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 (propriedades anti-inflamatórias), provocando a beta-oxidação e a hiper-regulação do *Pgc1a* (24, 25). Além disso, a inibição da DPP4 exerce efeitos anti-inflamatórios através da supressão do TLR4 nos macrófagos (158), além do aumento da sinalização de insulina e óxido nítrico (159, 160). Recentemente, a linagliptina mostrou efeitos cardioprotetores atenuando a expressão do TLR4 e do inflamassoma (161). Estas observações ressaltam os efeitos anti-inflamatórios aditivos que poderiam resultar de uma combinação de linagliptina com outro agente para tratar DM2 e doenças cardiovasculares decorrentes da obesidade.

Neste contexto, a associação da linagliptina com um agonista PPAR- α é promissora, pois ambos os mecanismos de ação podem se sobrepor e interagir. Recentemente, camundongos alimentados com uma dieta rica em frutose e tratados com WY14643 mostraram concentrações aumentadas de GLP-1 (26), implicando que os efeitos anti-inflamatórios de PPAR- α também podem desencadear a inibição da DPP-4 (141, 142). Por outro lado, a inibição da DPP-4 por uma alta dose de linagliptina provocou o *browning* no TABs através da indução do PPAR- α (25), já que este fator de transcrição tem muitos marcadores termogênicos como genes alvo (153). Portanto, os resultados atuais endossam esta combinação como adequada para tratar a obesidade neste modelo experimental,

combinando as mais altas expressões de *Ppar-a* e GLP-1 paralelas às menores expressões de *Dpp4* e *Tlr4* no TABs.

A indução de *Tlr4* pela dieta HF bloqueia o *browning* do TABs através do comprometimento da função mitocondrial e da ativação do inflamassoma, o que diminui a *Ucp1* de forma parácrina (15). Além disso, o consumo crônico da dieta HF causa glicolipotoxicidade, pois causa acúmulo de lipídios ectópicos (lipotoxicidade) concomitante com hiperglicemia (glicotoxicidade) (70). Estas condições estão subjacentes ao estresse do RE, pois esta organela utiliza a glicose como combustível primário. O estresse do RE, por sua vez, agrava a inflamação e sinaliza para a apoptose celular (64). Quando a homeostase do RE é comprometida, a UPR é ativada como uma tentativa de combater o estresse do RE (162). Aqui, a ingestão crônica de dieta HF causou inflamação através do *Tlr4* e *Nlrp3*, seguida pelo aumento dos genes relacionados à UPR. *Atf4* é um fator de transcrição que regula outros genes UPR como *Chop* (163), que detém o ciclo celular pela transcrição de *Gadd45* (164). A super-regulação do *Atf4*, *Chop*, e *Gadd45* no grupo HF, visando proteger os adipócitos dos efeitos tóxicos da UPR (165), concorda com os achados de um estudo anterior com uma dieta HF (40% de energia como gordura) por 12 semanas (166). Por outro lado, o tratamento conseguiu suprimir os genes relacionados à UPR, aliviando o estresse do RE, o que resulta na melhor sensibilidade à insulina e biogênese mitocondrial, favorecendo o fenótipo bege no TABs. A Figura 19 resume os principais resultados do presente estudo.

Figura 19 - Resumo gráfico dos resultados



Nota: Resumo gráfico. A dieta de HF causou hipertrofia dos adipócitos associada à liberação de adipocinas pró-inflamatórias e resistência à insulina, prejudicando o retículo endoplasmático e a função mitocondrial, com baixa expressão de UCP1. Por outro lado, a conjugação do agonismo PPAR-alfa com a inibição da DPP-4 combateu a inflamação e o estresse do RE, resultando em adipócitos de tamanho normal e sensíveis à insulina, favorecendo a formação de adipócitos beges que utilizam a ingestão excessiva de lipídios como combustível para a termogênese, causando a normalização da massa corporal.

Fonte: A autora, 2021.

CONCLUSÃO

A combinação de ativação do PPAR- α com a inibição da DPP-4 normalizou MC, tolerância oral à glicose, concentrações de insulina e leptina, produzindo adipócitos brancos de tamanho normal entremeados com adipócitos beges UCP1+ no TABs de camundongos alimentados com HF dieta. Ambos os agentes farmacológicos provocam efeitos anti-inflamatórios que resultam no alívio do estresse do RE, além de biogênese mitocondrial e aumento da termogênese, via que provavelmente utiliza os lipídios alimentares excessivos como combustível para liberar energia como calor. Os resultados aqui reunidos apontam para o favorecimento do fenômeno *browning* no TABs após esta promissora combinação terapêutica para combater a obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Bhurosy T, Jeewon R. Overweight and obesity epidemic in developing countries: a problem with diet, physical activity, or socioeconomic status? *The Scientific World Journal*. 2014;2014:964236.
2. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673-89.
3. Niswender K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2010;12(4):267-87.
4. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9793):804-14.
5. Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2015;66 Suppl 2:7-12.
6. Kapoor SK, Anand K. Nutritional transition: a public health challenge in developing countries. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 2002;56(11):804-5.
7. Raatz SK, Conrad Z, Johnson LK, Picklo MJ, Jahns L. Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. *Nutrients*. 2017;9(5):438.
8. Magdalon J, Festuccia WT. Regulation of adiposity by mTORC1 %J *Einstein (São Paulo)*. 2017;15:507-11.
9. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015;402:86-94.
10. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*. 2007;293(2):E444-52.
11. Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Molecular Metabolism*. 2016;5(5):352-65.
12. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & Development*. 2013;27(3):234-50.

13. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 2014;156(1-2):304-16.
14. Okla M, Wang W, Kang I, Pashaj A, Carr T, Chung S. Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) attenuates adaptive thermogenesis via endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(44):26476-90.
15. Okla M, Zaher W, Alfayez M, Chung S. Inhibitory Effects of Toll-Like Receptor 4, NLRP3 Inflammasome, and Interleukin-1 β on White Adipocyte Browning. *Inflammation*. 2018;41(2):626-42.
16. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(8):1012-9.
17. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2012;23(7):351-63.
18. Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2005;289(4): E617-26.
19. Seale P. Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. *Diabetes*. 2015;64(7):2369-75.
20. Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(50):43112-22.
21. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011;60(7):1917-25.
22. Sell H, Blüher M, Klöting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care*. 2013;36(12):4083-90.
23. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metabolism*. 2013;17(6):819-37.
24. Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Nagata N, Xu L, Mukaida N, et al. DPP-4 Inhibition by Linagliptin Attenuates Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance by Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Diabetes*. 2016;65(10):2966-79.
25. de Oliveira Correia BR, Rachid TL, de Oliveira Glauser JS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. High dose of linagliptin induces thermogenic beige adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Endocrine*. 2019;65(2):252-62.

26. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Martins FF, Daleprane JB, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linaglipin. *The Journal of Endocrinology*. 2020;247(1):11-24.
27. Poekes L, Legry V, Schakman O, Detrembleur C, Bol A, Horsmans Y, et al. Defective adaptive thermogenesis contributes to metabolic syndrome and liver steatosis in obese mice. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2017;131(4):285-96.
28. Aasheim ET, Sovik TT. Global trends in body-mass index. *Lancet*. 2011;377(9781):1916-7; author reply 7-8.
29. World Health Organization. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. 2000.
30. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
31. Astrup A, Brand-Miller J. Diet composition and obesity. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9821):1100; author reply -1.
32. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:1229-37.
33. World Health Organization. Obesity and Overweight. Fact sheet 9 june 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 05 ago. de 2021.
34. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9491):1059-62.
35. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico 2019 (Vigitel 2019): estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. 2020:137. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf. Acesso em: 10 jan. de 2021.
36. Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PloS One*. 2013;8(5):e64258.
37. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(10):772-83.

38. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;341(2):507-14.
39. Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*. 2015;48(13-14):923-30.
40. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
41. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinsular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *The Journal of Endocrinology*. 2001;170(2):323-32.
42. Gray SL, Donald C, Jetha A, Covey SD, Kieffer TJ. Hyperinsulinemia Precedes Insulin Resistance in Mice Lacking Pancreatic β -Cell Leptin Signaling. *Endocrinology*. 2010;151(9):4178-86.
43. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorssoni T, Riserus U, Uusitupa M, et al. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food & Nutrition Research*. 2014;58.
44. Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, Soares MJ, O'Dea K. The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *International journal of obesity and related metabolic disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002;26(6):814-21.
45. Lo K, Wong M, Khalechelvam P, Tam W. Waist-to-height ratio, body mass index and waist circumference for screening paediatric cardio-metabolic risk factors: a meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2016;17(12):1258-75.
46. Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Archives of Disease Childhood*. 2006;91(7):612-7.
47. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
48. Haslam D. Weight management in obesity - past and present. *International Journal of Clinical Practice*. 2016;70(3):206-17.
49. Klein S, Sheard NF, Pi-Sunyer X, Daly A, Wylie-Rosett J, Kulkarni K, et al. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies: a statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *Diabetes Care*. 2004;27(8):2067-73.
50. Wadden TA, McGuckin BG, Rothman RA, Sargent SL. Lifestyle modification in the management of obesity. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2003;7(4):452-63.

51. Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *European Journal of Clinical Investigation*. 2007;37(1):8-17.
52. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*. 2004;81(2):243-8.
53. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 1995;44(5):645-51.
54. De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19(29):5239-49.
55. Souza-Mello V, Gregorio BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas*. 2011;40(5):715-22.
56. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Bloc'h JL, Siliart B, et al. Liver Lipid Metabolism. 2008;92(3):272-83.
57. Siersbæk MS, Ditzel N, Hejbøl EK, Præstholm SM, Markussen LK, Avolio F, et al. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14052.
58. Omar B, Pacini G, Ahrén B. Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models. *Nutrients*. 2012;4(10):1367-81.
59. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56(12):2910-8.
60. Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia*. 2005;48(7):1350-8.
61. Ahrén J, Ahrén B, Wierup N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets*. 2010;2(6):353-6.
62. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2008;10 Suppl 4:32-42.
63. Silva-Veiga FM, Rachid TL, de Oliveira L, Graus-Nunes F, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018;474:227-37.

64. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation Research*. 2010;107(5):579-91.
65. Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2012;28(2):212-9.
66. Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013;57(1):81-92.
67. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature Cell Biology*. 2003;5(9):781-92.
68. Gabriel TL, Mirzaian M, Hooibrink B, Ottenhoff R, van Roomen C, Aerts J, et al. Induction of Sphk1 activity in obese adipose tissue macrophages promotes survival. *PloS One*. 2017;12(7):e0182075.
69. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2016;65(8):1049-61.
70. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie*. 2017;140:106-16.
71. Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaff MJ, Wehkamp J, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *The Journal of Nutrition*. 2017;147(5):770-80.
72. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2016;13(7):412-25.
73. Xiao H, Kang S. The Role of the Gut Microbiome in Energy Balance With a Focus on the Gut-Adipose Tissue Axis. *Frontiers in Genetics*. 2020;11:297.
74. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2020;78:110791.
75. Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2014;6(1):33-42.
76. Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS letters*. 2010;584(15):3250-9.

77. Lanthier N, Leclercq IA. Adipose tissues as endocrine target organs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2014;28(4):545-58.
78. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2017;31(1).
79. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
80. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and Metabolism*. 2015;309(8):E691-714.
81. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metabolism*. 2013;17(6):851-9.
82. DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *International Journal of Clinical Practice Supplement*. 2004(143):9-21.
83. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2015;26(4):193-200.
84. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1801(3):372-6.
85. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*. 2004;84(1):277-359.
86. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
87. Betz MJ, Enerback S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*. 2015;64(7):2352-60.
88. Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):27-35.
89. Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Annals of Medicine*. 2011;43(2):104-15.
90. Lin JZ, Farmer SR. Morphogenetics in brown, beige and white fat development. *Adipocyte*. 2016;5(2):130-5.
91. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1842(3):340-51.

92. Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metabolism*. 2014;19(5):810-20.
93. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
94. Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential actions of PPAR- α and PPAR- β/δ on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. *PloS One*. 2018;13(1):e0191365.
95. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013;62(6):1774-82.
96. Loncar D, Afzelius BA, Cannon B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*. 1988;101(2-3):199-209.
97. 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;7(11):e49452.
98. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360(15):1509-17.
99. Ricquier D, Miroux B, Larose M, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F. Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24 Suppl 2:S86-8.
100. Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*. 2017;134:3-8.
101. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961-7.
102. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360(15):1518-25.
103. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends in Pharmacological Science*. 2005;26(5):244-51.
104. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*. 1999;354(9173):141-8.
105. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*. 2002;53:409-35.
106. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology and Therapy*. 2006;110(3):371-85.

107. Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*. 2006;90(2):269-95.
108. Harrington WW, Cristy SB, Joan GW, Naphtali OM, Jane GB, David CL, et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Research*. 2007;2007:97125.
109. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1771(8):926-35.
110. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *European Journal of Pharmacology*. 2006;536(1-2):182-91.
111. Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition*. 2009;25(7-8):818-27.
112. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993;32(21):5598-604.
113. Braissant O, Foulfelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
114. Brady PS, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR. Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs. *Biochemical Journal*. 1989;260(1):93-100.
115. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovascular Diabetology*. 2005;4:14.
116. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Stael B, et al. Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocrine Reviews*. 2018;39(5):760-802.
117. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, Marinho Tde S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. *Life Sciences*. 2015;127:73-81.
118. Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care*. 2007;30(6):1335-43.
119. Yaron A, Naider F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1993;28(1):31-81.

120. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
121. Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2016;4(6):525-36.
122. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9548):1696-705.
123. Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiology & Behavior*. 2012;106(3):387-93.
124. Eckhardt M, Langkopf E, Mark M, Tadayyon M, Thomas L, Nar H, et al. 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50(26):6450-3.
125. Del Prato S, Barnett AH, Huisman H, Neubacher D, Woerle HJ, Dugi KA. Effect of linagliptin monotherapy on glycaemic control and markers of β -cell function in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2011;13(3):258-67.
126. McGill JB. Linagliptin for type 2 diabetes mellitus: a review of the pivotal clinical trials. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2012;3(4):113-24.
127. Kern M, Klötting N, Niessen HG, Thomas L, Stiller D, Mark M, et al. Linagliptin improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *PloS One*. 2012;7(6):e38744.
128. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-84.
129. Namgaladze D, Lips S, Leiker TJ, Murphy RC, Ekroos K, Ferreiros N, et al. Inhibition of macrophage fatty acid β -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia*. 2014;57(5):1067-77.
130. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(1):61-8.
131. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.

132. Penna-de-Carvalho A, Graus-Nunes F, Rabelo-Andrade J, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Enhanced pan-peroxisome proliferator-activated receptor gene and protein expression in adipose tissue of diet-induced obese mice treated with telmisartan. *Experimental Physiology*. 2014;99(12):1663-78.
133. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2003;75(4):469-86.
134. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *Journal of Microscopy*. 2011;243(1):47-59.
135. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene*. 1994;147(2):157-60.
136. Dunnett CW. Pairwise Multiple Comparisons in the Unequal Variance Case. *Journal of the American Statistical Association*. 1980;75(372):796-800.
137. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e39837.
138. Okuyama T, Shirakawa J, Tajima K, Ino Y, Vethe H, Togashi Y, et al. Linagliptin Ameliorates Hepatic Steatosis via Non-Canonical Mechanisms in Mice Treated with a Dual Inhibitor of Insulin Receptor and IGF-1 Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21).
139. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *American journal of physiology Endocrinology and Metabolism*. 2000;278(1):E1-e14.
140. Gray SL, Donald C, Jetha A, Covey SD, Kieffer TJ. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling. *Endocrinology*. 2010;151(9):4178-86.
141. Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Brooling J, Ghatora K, Farrell GC. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14,643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27(2):341-50.
142. Takahashi H, Sanada K, Nagai H, Li Y, Aoki Y, Ara T, et al. Over-expression of PPAR α in obese mice adipose tissue improves insulin sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;493(1):108-14.
143. Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*. 2017;134:3-8.
144. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012;149(4):871-85.

145. Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie*. 2017;134:127-37.
146. Wan Z, Frier BC, Williams DB, Wright DC. Epinephrine induces PDK4 mRNA expression in adipose tissue from obese, insulin resistant rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(2):453-6.
147. White UA, Coulter AA, Miles TK, Stephens JM. The STAT5A-mediated induction of pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression by prolactin or growth hormone in adipocytes. *Diabetes*. 2007;56(6):1623-9.
148. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition and Metabolism (London)*. 2014;11(1):10.
149. Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes*. 2002;51(2):276-83.
150. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Journal of Cell Biology*. 2003;161(6):1093-103.
151. Chen FJ, Yin Y, Chua BT, Li P. CIDE family proteins control lipid homeostasis and the development of metabolic diseases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2020;21(1):94-105.
152. Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1831(5):924-33.
153. Hondares E, Rosell M, Diaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(50):43112-22.
154. Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(2):1486-93.
155. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *International Journal of Obesity (2005)*. 2005;29 Suppl 1:S5-9.
156. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, et al. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(35):33370-6.

157. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016;12(1):15-28.
158. Hiromura M, Nohtomi K, Mori Y, Kataoka H, Sugano M, Ohnuma K, et al. Caveolin-1, a binding protein of CD26, is essential for the anti-inflammatory effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on human and mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;495(1):223-9.
159. Aroor AR, Manrique-Acevedo C, DeMarco VG. The role of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors in management of cardiovascular disease in diabetes; focus on linagliptin. *Cardiovascular Diabetology*. 2018;17(1):59.
160. Sato N, Nakamura Y, Yamadera S, Inagaki M, Kenmotsu S, Saito H, et al. Linagliptin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Concentration-Dependently And -Independently. *Journal of Inflammation Research*. 2019;12:285-91.
161. Birnbaum Y, Tran D, Bajaj M, Ye Y. DPP-4 inhibition by linagliptin prevents cardiac dysfunction and inflammation by targeting the Nlrp3/ASC inflammasome. *Basic Research in Cardiology*. 2019;114(5):35.
162. Zhao M, Zang B, Cheng M, Ma Y, Yang Y, Yang N. Differential responses of hepatic endoplasmic reticulum stress and inflammation in diet-induced obese rats with high-fat diet rich in lard oil or soybean oil. *PloS One*. 2013;8(11):e78620.
163. Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM, et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Molecular Biology of the Cell*. 2016;27(9):1536-51.
164. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11(4):381-9.
165. Galligan JJ, Smathers RL, Shearn CT, Fritz KS, Backos DS, Jiang H, et al. Oxidative Stress and the ER Stress Response in a Murine Model for Early-Stage Alcoholic Liver Disease. *Journal of Toxicology*. 2012;2012:207594.
166. Luo Y, Burrington CM, Graff EC, Zhang J, Judd RL, Suksaranjit P, et al. Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *American journal of physiology Endocrinology and Metabolism*. 2016;310(6):E418-39.

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag
Instituto de Biologia
Roberto Alcântara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco de camundongos obesos: polarização de macrófagos, biogênese mitocondrial e termogênese adaptativa", registrada com o nº 022/2018, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/05/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	40
Peso/idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 24 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>
ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO B – Submissão do artigo de revisão (Minor revision European Journal of Nutrition)



Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

EJON: Submission Confirmation for EJON-D-20-00853R1

2 mensagens

Editorial Office (EJON) <em@editorialmanager.com>
Responder a: "Editorial Office (EJON)" <eurjnutr@gmail.com>
Para: Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

16 de janeiro de 2021 20:54

Ref.: Ms. No. EJON-D-20-00853R1
Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas

Dear Prof. Souza-Mello,

European Journal of Nutrition has received your revised submission.

You may check the status of your manuscript by accessing the Journal's website.

Your username is: souza-mellov

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/ejon/>.

Thank you very much.

Kind regards,
Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition

ANEXO C – Submissão do artigo original (R1 Molecular and Cellular Endocrinology)



Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

Your Submission

2 mensagens

Carolyn M. Klinge <cm@editorialmanager.com>
Responder a: "Carolyn M. Klinge" <carolyn.klinge@louisville.edu>
Para: Vanessa Souza-Mello <souzamello.uerj@gmail.com>

19 de dezembro de 2020 13:38

Ms. Ref. No.: MCE-D-20-00898
Title: Anti-obesity effects of PPAR-alpha agonist and DPP-4 inhibitor association: focus on beige adipocytes induction
Molecular and Cellular Endocrinology

Dear Professor Vanessa Souza-Mello,

Two Reviewers with expertise in the subject area have now commented on your manuscript. You will see that they considered this study lacking in novelty, missing important controls, including separate arms for the PPARa agonist and DPP4-inhibitor alone. They suggested additional experiments are needed to support Fig. 9. They have included comments and questions regarding statements in the text and Figures in need of clarification. Additional reviewers' comments and questions must be carefully addressed and will require further experiments. Given the extent of new experiments needed, and the COVID-19 pandemic, I have provided an additional month for the revision, but you may email me if further time is needed to accomplish the work. The final decision, which will require re-review, will be based on your response to the comments and criticisms of the reviewers. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to reconsider my decision.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

To submit a revision, please go to <https://www.editorialmanager.com/mce/> and login as an Author.
Your username is: souzamello.uerj@gmail.com
If you need to retrieve password details, please go to:
<https://www.editorialmanager.com/mce/!asp?i=374204&I=XM7TR1UI>

NOTE: Upon submitting your revised manuscript, please upload the source files for your article. For additional details regarding acceptable file formats, please refer to the Guide for Authors at: <http://www.elsevier.com/journals/molecular-and-cellular-endocrinology/0303-7207/guide-for-authors>