



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Byanca Ramos de Oliveira Correia

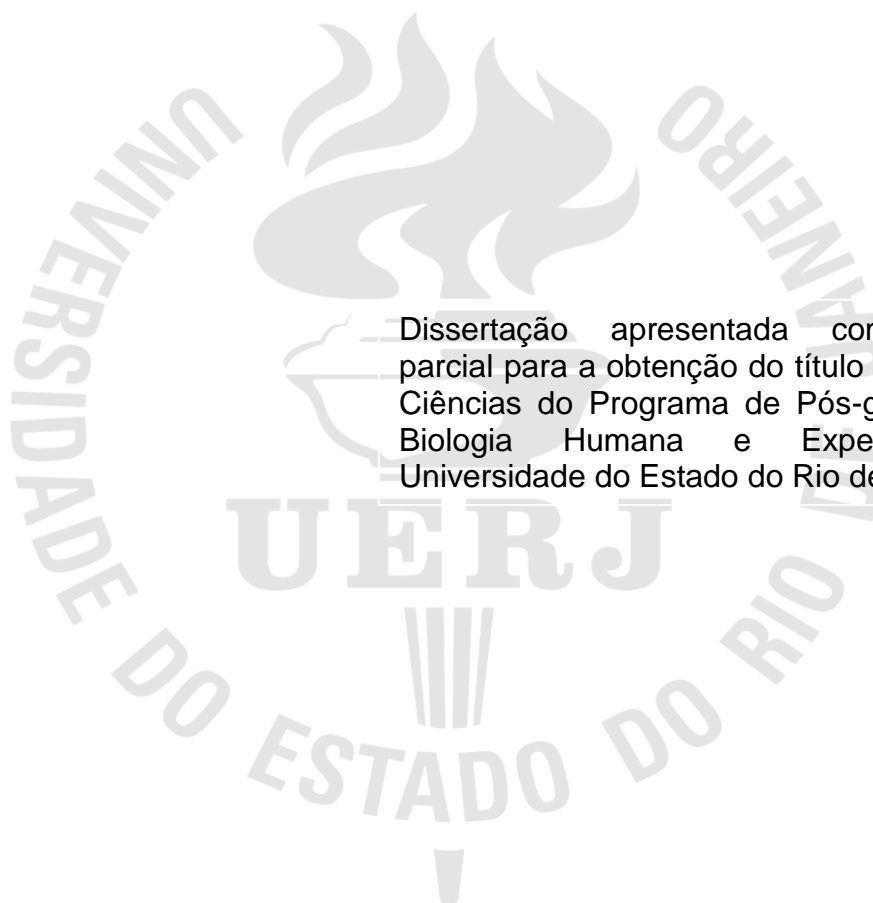
**Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos obesos: *browning* e termogênese associada**

Rio de Janeiro

2019

Byanca Ramos de Oliveira Correia

**Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos  
obesos: *browning* e termogênese associada**



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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Vanessa Souza-Mello

Rio de Janeiro

2019

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

C824 Correia, Byanca Ramos de Oliveira.  
Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos obesos: browning e termogênese associada / Byanca Ramos de Oliveira Correia. – 2019.  
68 f.

Orientadora: Vanessa de Souza Mello.

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

1. Obesidade- Teses. 2. Tecido adiposo branco - Teses. 3. Termogênese – Teses. 4. Linagliptina. I. Mello, Vanessa de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. III. Título.

CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB/7 – 6382

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

---

Assinatura

---

Data

Byanca Ramos de Oliveira Correia

**Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos  
obesos: *browning* e termogênese associada**

Dissertação apresentada como requisito parcial à 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 22 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dra Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dra Isabele Bringhenti Sarmento

Universidade Federal de Juiz de Fora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Júlio Beltrame Delaprane

Instituto de Nutrição - UERJ

Rio de Janeiro

2019

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e avó;  
Ao meu amor, Pedro.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Angela e Sérgio, por me permitirem viver todos os meus sonhos. Sem vocês toda e qualquer realização seria impossível. Vocês são parte de mim, e me guiaram até aqui. Obrigada pela vida!

À minha avó Ivone, que se fez sempre presente me dando amor, força e sendo o meu exemplo de força.

Ao Pedro, meu companheiro e amor. Obrigada por todo apoio, incentivo, por todos os abraços e carinhos que me confortaram ao longo desse processo. Seu amor tornou tudo mais leve, e seguirá sendo nosso alicerce.

A todos os meus amigos: de ensino médio, que me acompanham há mais de 10 anos, e dos quais tenho muito orgulho; aos amigos de faculdade, que puderam partilhar dessa experiência próximos a mim, especialmente Ana Luiza Almeida, Thaylla Núñez, Daniel Martins e Kelly Branco; às amigas Thaís Feitosa e Ana Carolina Girardi, que a vida me trouxe e que foram muito pacientes e tolerantes com meus sumiços temporários.

Aos companheiros do LMMC, que tornaram a jornada muito proveitosa: minhas colegas de turma Janaína Guimarães, Raquel Rosário, Tamiris Ingrid Petito e Renata Tarevnic; Tamiris Rachid, quem compartilhei um bom tempo de conversas e experimentos e foi fundamental em todo processo; Flávia Veiga, Francielle Graus, Felipe Oliveira, com os quais pude compartilhar não só a orientadora, mas também momentos felizes fora do ambiente de trabalho; Thatiany Marinho e Fabiane Martins, que sempre foram solícitas e excelentes em seus trabalhos, dando forças para a grande equipe. Saio realizada e com novos amigos.

Às técnicas Aline Penna e Michelle Soares por toda assistência e boa vontade.

Às alunas de Iniciação Científica Aline Barcellos, Aline Santana, Letícia Oliveira e Jade Glauser, que foram excelentes aprendizes e certamente contribuíram muito para toda realização.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa de Souza-Mello, por me abrir às portas para o mundo científico, por ser minha inspiração e meu maior exemplo de profissional.

Ao LMMC, que representado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, me proporcionou uma grande e feliz oportunidade; agradeço também aos demais professores que integraram o Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental e contribuíram para minha formação.

E finalmente, à CAPES e demais agências de fomento à pesquisa científica, que puderam tornar esse trabalho possível.

Isso de querer  
ser exatamente aquilo  
que a gente é  
ainda vai  
nos levar além.

*Paulo Leminski*

## RESUMO

CORREIA, Byanca Ramos de Oliveira. *Efeitos da linagliptina no tecido adiposo branco subcutâneo de camundongos obesos: browning e termogênese associada*. 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Objetivo: O presente estudo buscou investigar o remodelamento do tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) em modelo experimental de indução ao sobrepeso após o tratamento com linagliptina (DPP-4i), com ênfase na atividade termogênica e indução do fenômeno do *browning*. Métodos: Quarenta camundongos machos (C57BL/6) foram aleatoriamente divididos para receber dieta controle (C, 10% da energia sob a forma de lipídios, n=20) ou dieta hiperlipídica (HF, 50% da energia sob a forma de lipídios, n=20), por dez semanas. Em seguida, os grupos foram redivididos em quatro novos grupos, para iniciar as cinco semanas de tratamento: C, C-L (controle com linagliptina), HF e HF-L (hiperlipídica com linagliptina). O medicamento foi adicionado à dieta, na dosagem de 30mg/kg de massa corporal (MC) dos animais. Foram colhidos dados de comportamento alimentar, calorimetria indireta, termográficos, e foram feitos ensaios de tolerância oral à glicose, dosagem de insulina plasmática, microscopia de luz e imunofluorescência e expressão gênica. Resultados: Animais HF apresentaram sobrepeso, intolerância oral à glicose e maior área seccional média dos adipócitos. O tratamento com linagliptina foi capaz de normalizar a MC, restaurar a tolerância à glicose e o diâmetro dos adipócitos. Os resultados combinam com a observação de adipócitos multiloculares positivos para UCP1 no TABs de animais tratados. Ambos os grupos tratados (C-L e HF-L) apresentaram expressão elevada de genes termogênicos, que se relacionam com o aumento da temperatura corporal (TC). O menor quociente respiratório encontrado indica que a termogênese ocorrida utilizou lipídios como fonte de energia. Conclusão: A redução de MC, o aumento da TC e a presença de células beges positivas para UCP1 indicam ativação da cascata de *browning* no TABs dos animais tratados com linagliptina, que então, pode ativar a via termogênica como efeito pleiotrópico e pode ter potencial translacional.

Palavras-chave: Linagliptina. Tecido adiposo branco subcutâneo. *Browning*. Obesidade. Termogênese.

## ABSTRACT

CORREIA, Byanca Ramos de Oliveira. *Linagliptin effects on subcutaneous white adipose tissue of diet-induced obese mice: browning and associated thermogenesis*. 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

**Aim:** The present study aimed to investigate linagliptin (DPP-4i) remodeling effects on subcutaneous white adipose tissue (sWAT), regarding thermogenesis and browning induction, on a murine diet-induced obesity model. **Methods:** Forty adult animals (C57BL/6) were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% lipids as energy, n=20) or a high-fat diet (HF, 50% lipids as energy, n=20) for ten weeks. After, each group was re-divided to begin the five-week treatment, totalizing four experimental groups: C, C-L (C plus linagliptin, 30mg/kg body mass), HF and HF-L (HF plus linagliptin 30mg/kg BM). The drug was mixed with diet. Data from food behavior, indirect calorimetry and thermography were collected and oral glucose tolerance test, plasmatic levels of insulin, light and immunofluorescence microscopy and gene expression were evaluated. **Results:** HF animals showed overweight, glucose intolerance, and greater cross-sectional area of adipocytes. The treatment with linagliptin was able to normalize the body mass (BM), restore the glucose tolerance and the cross-sectional area of adipocytes. These observations comply with the observation of UCP1 positive multilocular adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue (sWAT) of treated animals. Both treated groups (C-L and HF-L) showed high expression of thermogenic genes, which agree with the enhanced body temperature (BT) and the lower respiratory exchange ratio (RER), implying enhanced thermogenesis with the use of lipids as fuel. **Conclusion:** The reduced BM, the enhanced BT and the presence of positive UCP1 beige cells in the sWAT point to the activation of the browning cascade on the sWAT of linagliptin-treated mice, and hence, linagliptin could induce the thermogenic pathway as a pleiotropic effect that can have translational potential.

**Keywords:** Linagliptin. Subcutaneous white adipose tissue. Browning. Obesity. Thermogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Obesidade: causas e consequências.....	19
Figura 2 -	Representação esquemática dos tecidos adiposos.....	22
Figura 3 -	Cascata termogênica.....	25
Figura 4 -	Incretinas intestinais.....	27
Figura 5 -	Desenho Experimental.....	31
Figura 6 -	Evolução da Massa corporal dos animais nos períodos pré e pós-tratamento.....	39
Figura 7 -	Distribuição de tecido adiposo branco.....	40
Figura 8 -	Fotomicrografias do TABs.....	41
Figura 9 -	Curva glicêmica do TOTG na fase de tratamento.....	43
Figura 10 -	Imagens termográficas e Imunomarcção para UCP1.....	46
Figura 11 -	Níveis de RNA mensageiro para PPAR-alfa.....	47
Figura 12 -	Níveis de RNA mensageiro para PGC1-alfa.....	48
Figura 13 -	Níveis de RNA mensageiro para PRDM16.....	49
Figura 14 -	Níveis de RNA mensageiro para Receptor beta-3 adrenérgico.....	50
Figura 15 -	Níveis de RNA mensageiro para UCP1.....	51
Figura 16 -	Efeitos da linagliptina no modelo experimental proposto.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferenças entre adipócitos brancos, marrons e beges.....	21
Tabela 2 -	Seqüência de <i>Primers</i> utilizados no <i>RT-qPCR</i> .....	37
Tabela 3 -	Comportamento Alimentar.....	38
Tabela 4 -	Gordura Corporal.....	40
Tabela 5 -	Área seccional média dos adipócitos do TABs.....	42
Tabela 6 -	ASC do TOTG e insulina plasmática.....	44
Tabela 7 -	Parâmetros metabólicos.....	45
Tabela 8 -	Resultados do ANOVA de duas vias.....	53

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASC	Área sob a curva do TOTG
ATF-2	Fator de ativação transcricional
ATP	Adenosina trifosfato
BE	Balanço energético
C	Grupo alimentado com dieta controle
cDNA	DNA complementar
C-L	Grupo alimentado com dieta controle e tratado com Linagliptina
DMT2	Diabetes Mellitus do tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
DPP-4i	Inibidor da Dipeptidil peptidase 4
GIP	Peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica ( <i>High-fat</i> )
HF-L	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica ( <i>High-fat</i> ) e tratado com Linagliptina
IL-6	Interleucina 6
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NRF1	Fator respiratório nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
PGC1- $\alpha$	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PKA	Proteína cinase A dependente de AMPc
PPAR	Receptor ativado por proliferação de peroxissoma
PPAR- $\alpha$	Receptores ativado por proliferador de peroxissoma alfa
PRDM16	Proteína 16 contendo o domínio PR
Q <sub>A</sub>	Quantidade por área
QR	Quociente respiratório/ Taxa de troca respiratória

RI	Resistência à Insulina
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
<i>RT-qPCR</i>	PCR quantitativo em tempo real
R $\beta$ -3A	Receptor beta-3 adrenérgico
SM	Síndrome metabólica
SNS	Sistema nervoso simpático
TAB	Tecido adiposo branco
TAB <sub>s</sub>	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Tecido adiposo marrom
TFAM	Fator transcricional mitocondrial A
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UCP1	Proteína desacopladora mitocondrial 1
VCO <sub>2</sub>	Volume de gás carbônico produzido
VO <sub>2</sub>	Volume de oxigênio consumido
V <sub>v</sub>	Densidade de volume

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>Obesidade</b> .....	17
1.2	<b>Tecido adiposo</b> .....	19
1.3	<b>Termogênese adaptativa no TABs</b> .....	22
1.4	<b>Inibidores da DPP4</b> .....	25
1.4.1	<u>Incretinas intestinais e DPP-4</u> .....	25
1.4.2	<u>Linagliptina</u> .....	27
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	29
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	29
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	30
3.2	<b>Comportamento alimentar e Massa Corporal (MC)</b> .....	32
3.3	<b>Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)</b> .....	32
3.4	<b>Calorimetria indireta</b> .....	32
3.5	<b>Termografia</b> .....	33
3.6	<b>Eutanásia</b> .....	33
3.7	<b>Insulina plasmática</b> .....	34
3.8	<b>Microscopia de luz e estereologia</b> .....	34
3.9	<b>Imunofluorescência</b> .....	35
3.10	<b>PCR quantitativo em tempo real</b> .....	35
3.11	<b>Análise de dados</b> .....	36
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Comportamento alimentar e Massa Corporal (MC)</b> .....	38
4.2	<b>Índice de adiposidade e distribuição de gordura</b> .....	39
4.3	<b>Morfologia do TABs e estereologia</b> .....	41
4.4	<b>Metabolismo de carboidratos</b> .....	42
4.5	<b>Calorimetria indireta, termografia e imunofluorescência</b> .....	44
4.6	<b>Expressão gênica</b> .....	47
4.7	<b>ANOVA de duas vias</b> .....	51
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54

	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A -</b>	<b>Comitê de ética.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO B -</b>	<b>Artigo submetido.....</b>	<b>68</b>

## INTRODUÇÃO

A obesidade atingiu proporções epidêmicas a nível mundial, principalmente em função da alta oferta de alimentos com alta densidade energética, combinados com hábitos mais sedentários da população (Hruby e Hu, 2015). O tecido adiposo branco (TAB) passa a sofrer hipertrofia e hiperplasia no período crônico de balanço energético (BE) positivo, o que favorece o estabelecimento da resistência à insulina (RI) e inflamação (Gustafson *et al.*, 2015). Essas mudanças tornam o indivíduo obeso mais suscetível à quadros crônicos e silenciosos a longo prazo, como o diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) (Gustafson e Smith, 2015).

O conceito de que o TAB funciona apenas como um reservatório lipídico, e portanto energético, sofreu alteração recente (Ahima, 2006). Já se sabe que ele atua como um órgão endócrino, capaz de secretar adipocinas envolvidas em diversas vias metabólicas de forma autócrina, parácrina ou endócrina (Rodriguez *et al.*, 2015). Além disso, a plasticidade do TAB em relação a um terceiro tipo de adipócito, o adipócito bege, o tornou um alvo viável para o controle da obesidade por meio da termogênese aumentada (Wu *et al.*, 2013).

Adipócitos beges exibem um citoplasma abundante, rico em mitocôndrias, onde a termogênese ocorre e produz calor ao invés de gerar adenosina trifosfato (ATP), resultando num BE negativo (Nedergaard e Cannon, 2014). O fenômeno do *browning* (indução de células beges) é mais frequente no TAB subcutâneo (TABs) e se estima que a presença de 63g de tecido adiposo bege é capaz de evitar o armazenamento de 4kg de gordura, por ano, em humanos (Virtanen *et al.*, 2009). Alguns indutores do *browning* são medicamentos que ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ) (Rachid *et al.*, 2015; Rachid *et al.*, 2018), o bloqueador do receptor de angiotensina Losartana (Graus-Nunes *et al.*, 2017), nutracêuticos que estimulam a via termogênica, como a canela (Kwan *et al.*, 2017) e a crisina (Choi e Yun, 2016), além de baixas temperaturas e exercício físico (Ricquier *et al.*, 2000; Spiegelman, 2013).

A enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) vem sendo descrita como uma adipocina, com produção excessiva em quadros de obesidade, caracterizando a RI em um tecido altamente hipertrofiado (Lamers *et al.*, 2011; Sell *et al.*, 2013). Logo, o uso frequente de inibidores da DPP-4 (DPP-4i) como hipoglicemiantes orais pode

resultar em efeitos pleiotrópicos benéficos quando o assunto são as comorbidades associadas à obesidade.

Em camundongos induzidos à obesidade, o tratamento com sitagliptina (DPP-4i) reduziu a esteatose hepática, resultando na preservação do pâncreas endócrino e em adipócitos brancos de menor diâmetro e sensíveis à insulina (Souza-Mello *et al.*, 2010). Ademais, a linagliptina (DPP-4i) foi recentemente ligada ao aumento da expressão do co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1- $\alpha$ ) devido à polarização de macrófagos no estado de ativação M2 (Zhuge *et al.*, 2016). Considerando que o PGC1-alfa é o fator chave da biogênese mitocondrial, um evento fundamental no fenômeno do *browning* (Jeremic *et al.*, 2017), o estudo foi conduzido no intuito de investigar a ação da linagliptina sobre a indução do *browning* e a termogênese num modelo murino de indução ao sobrepeso através de dieta.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença inflamatória crônica que vem apresentando prevalência crescente na população mundial, tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos, afetando adultos e crianças (Swinburn *et al.*, 2011). O sobrepeso e a obesidade possuem caráter multifatorial, podendo estar relacionados a fatores endógenos, como a hereditariedade, ou exógenos, como fatores ambientais, hábitos alimentares inadequados e sedentarismo (Hruby e Hu, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 2015 e 2016, aproximadamente dois bilhões de indivíduos adultos possuíam sobrepeso, sendo um terço desse grupo portador de obesidade - esse valor representa cerca de 13% da população mundial acima de 18 anos (Seidell e Halberstadt, 2015). No Brasil, segundo levantamento feito em 2017 pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2017), aproximadamente um quinto da população brasileira (18,5%) está obesa, e 54% da população residente das capitais apresenta sobrepeso.

O índice de massa corporal (IMC) é usado como critério classificatório para estabelecimento da obesidade, e é calculado pela razão entre massa corporal (kg) e estatura ao quadrado ( $m^2$ ), sem considerar a composição corporal. Segundo a OMS, em humanos adultos (maiores de 20 anos), quando o IMC está entre 18,50 e 24,99  $kg/m^2$  o indivíduo encontra-se dentro da faixa de normalidade; entre 25,00 e 29,99  $kg/m^2$  apresenta sobrepeso e quando a razão está acima de 30,00  $kg/m^2$  já se considera o quadro de obesidade estabelecido, ainda sendo subdividido nos graus I (30,00 – 34,99  $kg/m^2$ ), II (35,00 – 39,99  $kg/m^2$ ) e III ( $\geq 40,00$   $kg/m^2$ ) (2000). A medida da circunferência abdominal também é considerada um parâmetro importante, uma vez que indica o acúmulo de gordura visceral (adjacente aos órgãos abdominais), e está associada a desregulações metabólicas e à predisposição ao risco cardiovascular (Hu, 2007; Alberti *et al.*, 2009). O valor de referência para a circunferência abdominal varia de acordo com as diferentes etnias e gêneros sendo considerada ideal, por exemplo, abaixo de 94cm em homens e de 80cm em mulheres da Europa e abaixo de 102 e 88cm, respectivamente, para homens e

mulheres, de acordo com a ATP III (*National Cholesterol Education Adult Treatment Panel III*) (Hruby e Hu, 2015; Rodriguez-Ortiz *et al.*, 2016) .

A doença tem seu início a partir do estabelecimento de um BE positivo crônico, caracterizado por um aumento na quantidade de energia ingerida frente à quantidade de energia gasta (2000). Dessa forma, o excesso de energia ingerida tende a ser armazenado pelo organismo sob a forma de triacilgliceróis (TAG). Dentre as principais causas para o fenômeno ter quase triplicado nas últimas quatro décadas, estão a grande oferta e disponibilidade de alimentos com alta densidade energética (ricos em gordura, ultraprocessados, cada vez mais palatáveis e financeiramente mais acessíveis) e o estilo de vida moderno, que aumentou os níveis de sedentarismo de forma geral (nas diversas formas de trabalho, nas mudanças em meios de transporte e atividades de lazer, em todos os fenômenos de urbanização) (Swinburn *et al.*, 2011; Hruby e Hu, 2015).

O acúmulo de gordura durante o balanço energético positivo cursa com a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos do TAB, que é acompanhada por uma desregulação da homeostase sistêmica, visto que o TAB apresenta, além da capacidade de armazenamento, função endócrina ativa (Rodriguez *et al.*, 2015; Jeremic *et al.*, 2017). A inflamação crônica de baixo grau que o tecido adiposo hipertrofiado apresenta favorece o estabelecimento da RI e, conseqüentemente, de diversas outras comorbidades silenciosas, como doenças cardiovasculares (associadas ao aumento da infiltração de fatores da coagulação no TAB) e diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2), dentre outras que alteram a qualidade de vida, reduzem a expectativa de vida, podem incapacitar o indivíduo ou até levar à morte (Ahima, 2006; Swinburn *et al.*, 2011; Grover *et al.*, 2015; Gustafson *et al.*, 2015).

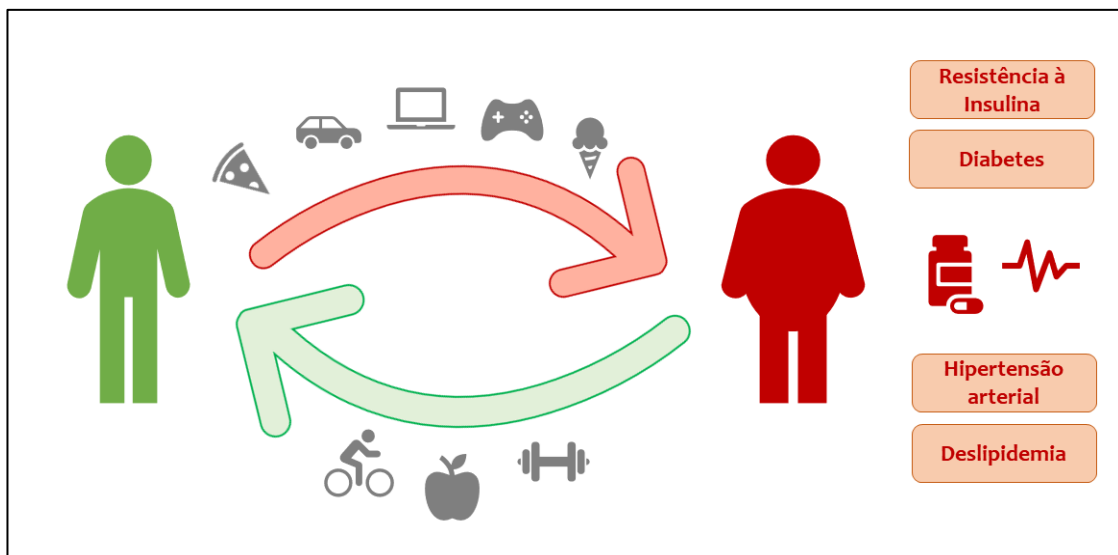
A associação das desordens relacionadas à obesidade e à RI caracteriza a Síndrome metabólica (SM) (Yudkin, 2007), combinando intolerância à glicose, hipertensão arterial, DMT2 e/ou dislipidemia. A SM representa uma questão de saúde pública importante, dada sua alta prevalência e altos custos envolvidos no tratamento por parte dos governos (Schmidt *et al.*, 2011).

Para o tratamento da obesidade, e conseqüente redução dos riscos de doenças associadas, é importante que se reduza a massa corporal. As variáveis da alimentação, com a redução do aporte calórico, e introdução da prática de atividade física, para aumento do gasto energético, são importantes no processo (Stanford *et al.*, 2015), como esquematiza a Figura 1. Ainda nesse contexto, alguns fármacos e

nutracêuticos podem ser alternativas para o estímulo ao próprio tecido adiposo branco para redução do acúmulo lipídico, através do fenômeno da termogênese (Rachid *et al.*, 2015; Choi e Yun, 2016; Bargut *et al.*, 2017; Graus-Nunes *et al.*, 2017; Kwan *et al.*, 2017) .

O modelo experimental mais adequado para estudos em obesidade e síndrome metabólica em geral é dos camundongos da linhagem C57BL/6, que quando alimentados com dieta hiperenergética (que mimetiza as dietas ocidentais), desenvolvem obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão semelhante a de humanos (Collins *et al.*, 2004).

Figura 1 – Obesidade: causas e consequências



Legenda: Esquema representativo de fatores que podem causar a obesidade, fatores que podem atenuá-la e comorbidades associadas ao acúmulo excessivo de gordura corporal, que quando associadas, constituem a síndrome metabólica (SM).

Fonte: A autora, 2019.

## 1.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo branco, descrito antes da descoberta da leptina (Zhang *et al.*, 1994) apenas como reservatório energético, participa de diversas reações de regulação sistêmica. Sua capacidade endócrina permite que seja possível atuar em vias metabólicas, de forma parácrina, autócrina ou endócrina, respondendo a sinalizações neurais, nutricionais e hormonais e controlando, através das

adipocinas, funções neuroendócrinas, ingestão alimentar, termogênese e relacionadas à imunidade (Ahima, 2006; Rodriguez *et al.*, 2015).

O arranjo estrutural do TAB consiste em adipócitos circundados por tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado e innervado, contendo macrófagos, fibroblastos, adipócitos precursores, dentre outros tipos celulares. Os adipócitos brancos em si possuem uma única gota lipídica ocupando maior parte do volume celular, com baixa densidade mitocondrial e núcleo achatado e periférico. Os maiores depósitos de TAB estão no compartimento subcutâneo e ao redor de órgãos. Cada célula suporta o limite de 1,0 µg de TAGs aproximadamente; caso o acúmulo seja acima do suportado pela célula, há um recrutamento de novos adipócitos ou o depósito ectópico dos TAGs em outros órgãos, como fígado, coração e músculos (Ahima, 2006; Gustafson e Smith, 2015; Bargut *et al.*, 2017).

O aumento da massa de TAB na obesidade é associado com profundas alterações histológicas (hipertrofia e hiperplasia) e bioquímicas, características da inflamação, relacionadas à ativação de macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6), em roedores e humanos (Gustafson *et al.*, 2015).

O tecido adiposo marrom (TAM), por sua vez, é especializado no gasto energético (atividade termogênica). 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 (Cannon e Nedergaard, 2004; Wu *et al.*, 2013).

Adipócitos marrons são células poligonais contendo várias gotículas lipídicas, que caracterizam seu armazenamento como multilocular; possuem núcleo central, citoplasma claro e uma grande quantidade de mitocôndrias - responsáveis pelo aspecto marrom do tecido. O tecido também é altamente vascularizado e innervado pelo sistema nervoso simpático (SNS). A localização clássica do TAM em humanos é na região interescapular, sendo mais facilmente localizável em crianças, e podendo ser encontrado em sítios cervicais, paravertebrais e perirrenais em menor quantidade (Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Betz e Enerback, 2015; Bargut *et al.*, 2017).

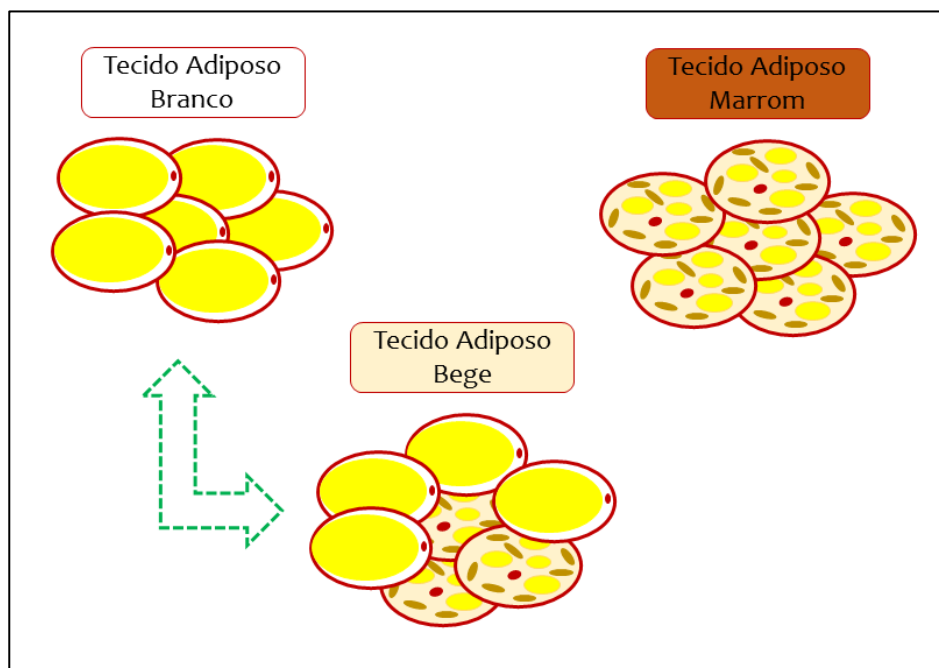
Adipócitos bege, já descritos como um novo tipo celular, foram descobertos no tecido adiposo branco subcutâneo e possuem as propriedades e características oxidativas do tecido marrom. São, portanto, células que constituem um tecido

especializado no gasto energético, mediante variados estímulos. Se originam frente a estímulo adrenérgico, através de transdiferenciação de pré-adipócitos brancos ou da diferenciação a partir de pré-adipócitos beges, não possuindo precursor comum com os adipócitos marrons, que se originam de linhagem miogênica (Wu *et al.*, 2013; Gustafson e Smith, 2015). Apresentam citoplasma abundante, armazenamento multilocular e alta densidade mitocondrial, que permite a realização da atividade termogênica. A tabela a seguir (Tabela 1) resume as principais características dos diferentes tipos de adipócitos, e Figura 2 esquematiza os tecidos adiposos branco, marrom e bege.

Tabela 1 – Diferenças entre adipócitos brancos, marrons e beges

	<b>Adipócito Branco</b>	<b>Adipócito Marrom</b>	<b>Adipócito Bege</b>
<b>Origem</b>	Células tronco mesenquimais do TAB	Linhagem miogênica (Myf5 <sup>+</sup> )	Transdiferenciação de células tronco mesenquimais do TAB
<b>Localização em humanos</b>	Subcutânea ou ectópica	Interescapular, cervical, paravertebral, perirenal	Supraclavicular e subcutânea
<b>Função</b>	Armazenamento lipídico	Dissipação de energia	Termogênese adaptativa
<b>Gotícula lipídica</b>	Unilocular	Multilocular	Multilocular
<b>Densidade mitocondrial</b>	Baixa ou não detectável	Alta	Alta após indução

Figura 2 – Representação esquemática dos tecidos adiposos



Legenda: Esquema representativo dos respectivos tecidos adiposos, e suas configurações estruturais. A seta verde indica a potencial transdiferenciação do tecido adiposo branco no tecido adiposo bege, frente a um estímulo, no processo de termogênese adaptativa.

Fonte: A autora, 2019.

### 1.3 Termogênese adaptativa no TABs

A termogênese, em mamíferos, é um processo que resulta na liberação de energia química (ATP) sob a forma de energia térmica (calor). Sua principal função é a de permitir o controle da temperatura corporal em torno dos 37°C em ambientes frios. Podemos dividir a termogênese em obrigatória (como no aumento de temperatura corporal causado pelo combate a um agente infeccioso na febre) ou adaptativa, que é passível de indução. Dentre fatores que estimulam a termogênese adaptativa temos: 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*) (Bargut *et al.*, 2017); a dieta, que quando hipercalórica pode estimular o TAM no objetivo da manutenção da temperatura corporal (Rothwell e Stock, 1997; Wu *et al.*, 2013); agentes farmacológicos e nutracêuticos, como agonistas do PPAR-alfa (Rachid *et al.*, 2015; Rachid *et al.*, 2018), bloqueadores do

receptor de angiotensina (AT1) (Graus-Nunes *et al.*, 2017), a canela (Kwan *et al.*, 2017) e a crisina (Choi e Yun, 2016), que através de diversas vias estimulam a via termogênica; e o exercício físico (Ricquier *et al.*, 2000; Spiegelman, 2013).

A termogênese acontece através de estímulos a receptores adrenérgicos constantes (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1). 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 desacopladora mitocondrial 1 (UCP1). Conhecida 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 (Ricquier *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Spiegelman, 2013; Bargut *et al.*, 2017; Ricquier, 2017).

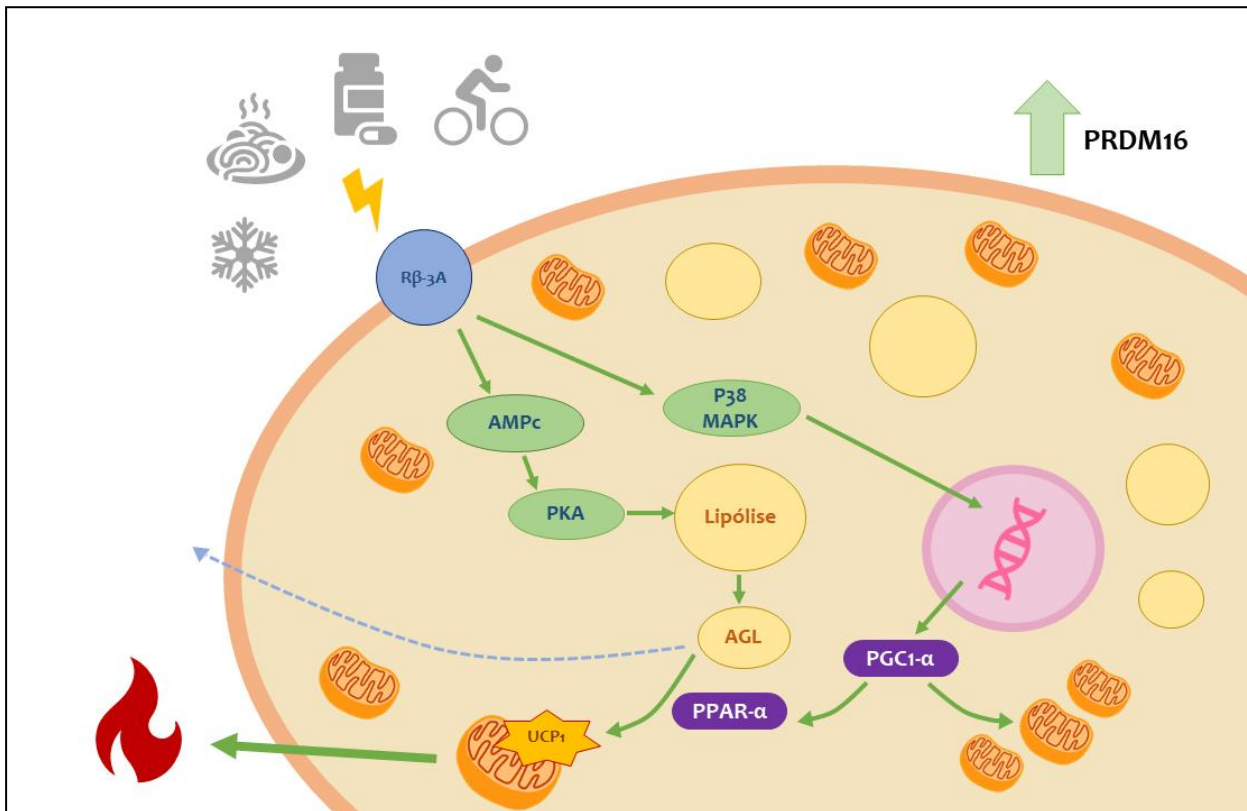
O processo acontece no TAM e pode se processar no TAB, desde que haja uma mudança fenotípica de seus adipócitos. A descoberta de que o TAB possuía plasticidade aconteceu nas décadas de 80 e 90, com a descrição da alta potencialidade na expressão da UCP1 e outros marcadores termogênicos característicos do TAM no TABs de roedores (Loncar *et al.*, 1988; Cousin *et al.*, 1992), como PGC1-alfa e PRDM16 (proteína 16 contendo o domínio PR). O fenômeno de indução de células beiges, que apresentam características metabólicas similares aos adipócitos marrons, no TAB, é denominado *browning*.

A participação do PPAR-alfa na via termogênica passa pelo direcionamento dos ácidos graxos livres, gerados após estímulo adrenérgico, para a via de beta-oxidação, ao invés do direcionamento ao efluxo celular. Sob condições normais, a maioria dos AGLs mobilizados através do estímulo beta-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 receptor beta-3-adrenérgico ( $R\beta$ -3A) regula positivamente a expressão de PPAR-alfa, resultando numa capacidade de oxidação expandida no interior dos adipócitos. Adicionalmente, o PPAR-alfa é capaz de inibir a expressão gênica de agentes pro-inflamatórios, através da supressão do NF-kB (fator nuclear kappa B) (Li *et al.*,

2005). O PRDM16 emerge com um fator de manutenção do fenótipo marrom: sem a presença desse marcador, células bebes retornam ao fenótipo branco, assim como células marrons reduzem suas características termogênicas e podem ser induzidas à diferenciação em células musculares (Seale *et al.*, 2008). 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-alfa. PGC1-alfa é um fator chave da regulação da biogênese mitocondrial (Spiegelman, 2013), ativador da transcrição de PPARs e da UCP1. Através da ativação de NRF1 (Fator respiratório nuclear), e por conseguinte, de TFAM (fator transcricional mitocondrial A), ocorre a replicação mitocondrial. O esquema da Figura 3 ilustra algumas vias de ativação da cascata termogênica.

Estima-se que 63g de tecido adiposo bege possam evitar o armazenamento de aproximadamente 4kg de gordura por ano, em humanos (Virtanen *et al.*, 2009), e portanto, o estudo do fenômeno emerge com grande importância para mais prospeções acerca do tratamento da obesidade e suas comorbidades.

Figura 3 – Cascata termogênica



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

Abreviações: Receptor beta-3 adrenérgico (R $\beta$ -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 deperoxissoma gama (PGC1-alfa); Receptor ativado por proliferação de peroxissoma alfa (PPAR-alfa) e Proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1).

Fonte: A autora, 2019.

## 1.4 Inibidores da DPP-4

### 1.4.1 Incretinas intestinais e DPP-4

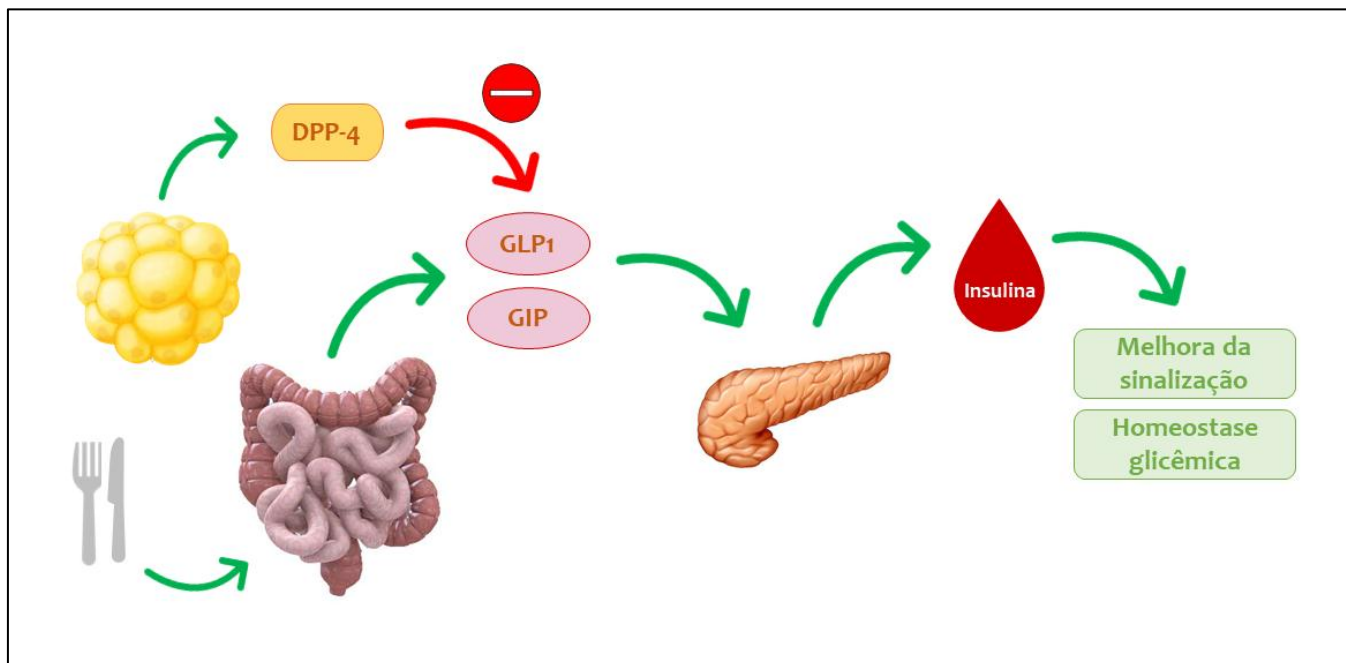
As incretinas são hormônios produzidos pelo intestino, e apresentam níveis plasmáticos basais durante o estado não alimentado. Após a ingestão alimentar, elas são liberadas e agem potencializando a liberação de insulina pós-prandial; agem portanto, de forma glicose-dependente, sem nenhum efeito em baixas

glicemias. (Nauck e Meier, 2016). Dentre os hormônios dessa classe mais estudados temos GIP (peptídeo insulínico dependente de glicose) e GLP1 (peptídeo 1 semelhante ao glucagon), que exercem sua ação através de receptores, que são altamente expressos pela ilhota pancreática. A meia-vida das incretinas intestinais é curta, pois são rapidamente inativadas pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (Campbell e Drucker, 2013).

Recentemente descoberta como adipocina, a DPP-4 é uma protease que cliva e inativa a porção terminal da cadeia das incretinas. Sua alta expressão vem sendo associada a quadros de obesidade, e sua inibição 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 (Lamers *et al.*, 2011; Sell *et al.*, 2013) (Figura 4). 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 (Zhuge *et al.*, 2016).

Terapias baseadas no controle das incretinas apresentam boa preservação das células beta pancreáticas, e bom desempenho para melhora perfil lipídico e hipertensão arterial sistêmica (Campbell e Drucker, 2013).

Figura 4 – Incretinas intestinais



Legenda: Esquema representativo da produção, ação e inibição pela DPP-4 das incretinas intestinais. Abreviações: Dipeptidil peptidase 4 (DPP-4); Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) e Peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).

Fonte: A autora, 2019

#### 1.4.2 Linagliptina

A linagliptina é uma droga hipoglicemiante oral que age através da inibição da adipocina DPP-4 (DPP-4i). É uma molécula sintetizada a partir do arcabouço da xantina, altamente potente e seletiva para DPP-4 e de longa duração. Por agir sobre o inibidor das incretinas intestinais, a droga tem ação glicose-dependente, o que a torna segura do ponto de vista de episódios de hipoglicemia (Eckhardt *et al.*, 2007).

É excretada majoritariamente por via enterohepática, a diferenciando das demais drogas da família das gliptinas, e permitindo seu uso sem ajuste de dosagem para pacientes com comprometimento renal e hepático. Está associada a melhoras significativas na hemoglobina glicosilada, glicemia de jejum e pós-prandial em pacientes portadores de DM2 (McGill, 2012). Um possível mecanismo para que a linagliptina melhore o metabolismo glicídico está vinculado à redução de gordura hepática, avaliado em modelos experimentais de indução à esteatose e RI, o que

candidataria a droga a prescrição em pacientes com quadros de esteatose hepática estabelecidos (Kern *et al.*, 2012).

Pode ser administrada em monoterapia ou combinada com outras drogas como: pioglitazona, reduzindo o ganho de massa corporal associado a pioglitazona, e sem mudanças nos marcadores de risco cardiovascular (Gomis *et al.*, 2011; McGill, 2012); metformina, apresentando melhores dados de massa corporal e menos eventos de hipoglicemia que na associação metformina e glimepirida (Forst *et al.*, 2010); empagliflozina, já testada em modelos experimentais de diabetes e em humanos, com potenciais benefícios cardio-renais (Kern *et al.*, 2016; Kawamori *et al.*, 2018); dentre outras drogas.

O tratamento experimental com linagliptina, em camundongos obesos conduziu a redução da RI, redução da esteatose hepática e polarização de macrófagos do tipo M2, os quais favorecem secreção de adipocinas antiinflamatórias e a adiponectina, além de ativar fatores de transcrição envolvidos no metabolismo oxidativo de lipídios, como os PPARs (Kern *et al.*, 2012; Zhuge *et al.*, 2016). Macrófagos no estado de ativação M2 estão relacionados ao aumento da biogênese mitocondrial pela inibição do NF- $\kappa$ B e a consequente indução do PGC1-alfa (Lumeng *et al.*, 2007; Namgaladze *et al.*, 2014), fator chave da biogênese mitocondrial, um evento fundamental no fenômeno do *browning*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do DPP-4i linagliptina sobre o remodelamento do tecido adiposo branco num modelo experimental de indução ao sobrepeso com dieta hiperlipídica, com ênfase na biogênese mitocondrial, termogênese adaptativa e um possível efeito na indução de células adiposas beges (*browning*).

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os efeitos do tratamento com linagliptina sobre a massa corporal e índice de adiposidade de animais induzidos ao sobrepeso;
- b) Estudar efeitos da medicação sobre a tolerância oral à glicose e níveis plasmáticos de insulina;
- c) Determinar a expressão gênica de fatores implicados na termogênese e marcadores de adipócitos beges no tecido adiposo branco subcutâneo dos animais tratados com linagliptina, avaliando seu remodelamento;
- d) Utilizar a microscopia confocal a fim de caracterizar o adipócito bege ou focos de termogênese ativada no tecido adiposo branco subcutâneo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e Dieta

No presente estudo foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e sob condições controladas de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $60\pm 10\%$ ) e luminosidade (ciclos de 12/12h de claro-escuro), com livre acesso à água e dieta, em caixas *pathogen-free* durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

Após atingirem três meses de idade, iniciou-se o protocolo de indução da obesidade, com duração de 10 semanas, com a divisão aleatória dos animais em dois grupos experimentais: grupo controle (C, n=20), alimentado com dieta padrão para roedores (14% da energia advinda de proteínas, 10% de lipídios e 76% de carboidratos; energia total de 15.884 kJ/kg) e o grupo *high-fat* (HF, n=20), alimentado com dieta hiperlipídica (14% da energia advinda de proteínas; 50% de lipídios e 36% de carboidratos; energia total de 20.900 kJ/kg).

Ao término do protocolo inicial, os grupos C e HF foram subdivididos em quatro grupos experimentais, para cinco semanas de tratamento:

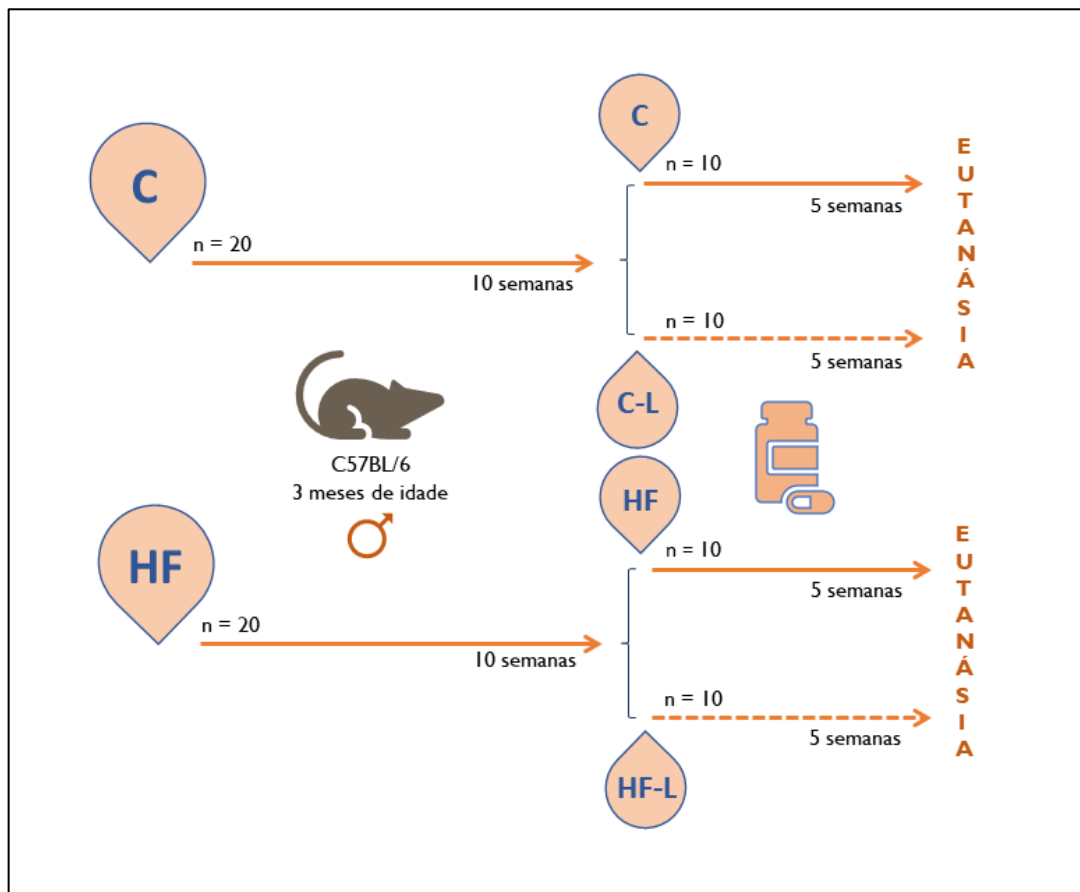
- a) C (n=10), dieta controle, não tratado;
- b) C-L (n=10), dieta controle, tratado com linagliptina;
- c) HF (n=10) dieta hiperlipídica, não tratado;
- d) HF-L (n=10), dieta hiperlipídica, tratado com linagliptina.

O fármaco foi adicionado às dietas na dose de 30mg/Kg de massa corporal (MC), (Kern *et al.*, 2012) sob a forma comercial da linagliptina no mercado brasileiro (Trayenta® - Linagliptina 5mg, Boehringer Ingelheim). As dietas seguiram os padrões recomendados pela AIN-93M para roedores (Reeves *et al.*, 1993) e foram manipuladas por empresa especializada (PragSoluções, Jaú, São Paulo). O tempo

total de duração do protocolo experimental foi de 15 semanas, e segue ilustrado na Figura 5. O  $n$  amostral foi calculado para suprir às demandas das diferentes técnicas laboratoriais.

É fundamental ressaltar que o protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA 022/2018) e conduzido de acordo com o guia convencional para experimentação em animais (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996).

Figura 5 – Desenho experimental



Legenda: Esquema representativo dos grupos experimentais. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

Fonte: A autora, 2019.

### **3.2 Comportamento alimentar e Massa Corporal (MC)**

A ingestão alimentar foi aferida diariamente durante as 15 semanas de protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). O cálculo da ingestão energética foi feito através da multiplicação da ingestão alimentar pela energia ofertada por cada grama de dieta (em KJ). A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente em balança digital modelo BL-3200H (precisão 0,01g).

### **3.3 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

Uma semana antes da eutanásia foi realizado o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG). Após seis horas de jejum dos animais (6AM – 12PM), foi administrada solução glicosada (25%), via gavagem orogástrica, na dose de 1g de glicose por kg de massa corporal de cada animal. Foram medidas as glicemias no tempo 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos, através de glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil), em amostras de sangue coletadas da veia caudal.

### **3.4 Calorimetria Indireta**

Também na 14ª semana de protocolo, animais de todos os grupos foram colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de calorimetria (Oxylet System, Panlab Havard Apparatus), durante três dias, com livre acesso à comida e à água. Este sistema é programado para monitorar simultânea e continuamente o consumo de oxigênio ( $O_2$ ), a produção de gás carbônico ( $CO_2$ ), a taxa de troca respiratória e a temperatura dos animais. Os dados são coletados a cada três minutos durante 72 horas, com as primeiras 24 horas consideradas um

período de climatização. O consumo de oxigênio foi calculado por grama de peso corporal metabólico (PC)<sup>0,75</sup>.

### 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 14ª semana de experimento.

### 3.6 Eutanásia

Ao fim das 15 semanas de protocolo experimental os camundongos foram submetidos a jejum de seis horas (6AM – 12PM), e após administração de heparina, foram anestesiados para o sacrifício - injeção intraperitoneal de ketamina (240 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg). Em seguida, o tórax foi aberto por incisão mediana ventral, e o sangue pôde ser coletado por punção cardíaca (átrio direito); foi destinado à centrifugação (3.500rpm, por 15 minutos) e congelamento (-80°C) para futuras análises bioquímicas; o TABs (considerado como a gordura encontrada na parte proximal do membro inferior) foi cuidadosamente dissecado, pesado e fixado em formalina de Millonig (para técnicas de microscopia) ou congelado (-80°C, para análises moleculares). As gorduras retroperitoneal (ligada à parede posterior do abdômen e aos rins e ureteres), epididimária (ligada ao epidídimo, na porção inferior do abdômen) e marrom (na região interescapular) foram cuidadosamente dissecadas e pesadas para o cálculo do índice de adiposidade (razão entre a soma das gorduras marrom, subcutânea, epididimária e retroperitoneal pela MC dos animais) (Rachid *et al.*, 2015) e distribuição de gordura, considerando apenas o tecido adiposo branco, entre os compartimentos intra-abdominal/visceral (gorduras epididimária e retroperitoneal) e compartimento subcutâneo.

### 3.7 Insulina plasmática

O plasma sanguíneo estocado sob congelamento (-80°C) após a dissecação foi utilizado para o ensaio bioquímico da dosagem de insulina plasmática. Através do kit comercial Millipore (Rat/Mouse Insulin ELISA kit #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, USA), e da utilização o Thermoplate TP-READER para leitura os resultados (Bio Tek Instruments, Inc Highland Park, EUA), foi possível a obter a concentração sérica do hormônio.

### 3.8 Microscopia de Luz e Estereologia

Após dissecação, o TABs dos animais foi fixado durante 48 horas em formalina de Millionig, para posterior processamento e inclusão 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 1-5c, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canada), através do *software* Image-Pro Plus (versão 7.0 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), sendo representativas de todos os grupos experimentais. As fotomicrografias foram obtidas no formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels, em aumento de 40x.

As análises estereológicas do TABs foram feitas com auxílio do *software* STEPanizer (version 1 -subver 0.22 offline -compilation 1-8-0-74) (Tschanz *et al.*, 2011). Para tal, a densidade de volume de adipócitos ( $V_v$ ) foi estimada por contagem de pontos (em área teste de 16 pontos gerada pelo programa) e o perfil de adipócitos por área ( $Q_A$ ) foi obtido pela divisão do número de adipócitos (à exceção dos que tocavam a linha proibida) pela área teste (em µm<sup>2</sup>, também gerada pelo programa após calibração prévia). Ambos os resultados foram utilizados para a determinação da área seccional média dos adipócitos através da média da

densidade de volume dividida por duas vezes a densidade numérica dos adipócitos (fórmula:  $V_v / (2 \times Q_A)$ ) (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

### 3.9 Imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência, secções desparafinizadas e hidratadas de tecido (espessura de 5 $\mu$ m) foram preparadas com as etapas de recuperação antigênica (tampão citrato, pH 6,0, a 60° C por 20 min) e bloqueios (glicina 2% e tampão PBS/5%BSA). As secções foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo UCP1 (anti-goat, SC-6529, Santa Cruz Biotechnology; diluição 1:50 em PBS/1%BSA); em seguida, foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo, (anti-goat Alexa Fluor 488; diluição 1:50 em PBS/1%BSA). Após incubações e lavagens adequadas, as lâminas foram montadas com Slow Fade Antifade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) e as imagens digitais captadas através de microscópio de fluorescência (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Model C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA) com lente planacromática e câmera DP71 (aumento 40x).

### 3.10 PCR quantitativo em tempo real (*RT-qPCR*)

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa em tempo real (*RT-qPCR*) para avaliar a expressão de RNAm dos genes relacionados à biogênese mitocondrial e cascata do *browning* no TABs dos camundongos. O RNA do tecido total foi extraído utilizando uma solução de lise (Trizol, Invitrogen, CA, EUA) para extrair e isolar o RNAm. A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia usando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences) usando 1  $\mu$ g de RNA e DNase I (Invitrogen). O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado utilizando oligonucleótidos Oligo (dT) para RNAm e transcriptase-reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador

StepOne Plus Cycler e a mistura SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). Os iniciadores foram projetados usando o *software* on-line *Primer 3web* versão 4.0. O gene beta-actina foi utilizado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo. A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95° C), com 44 ciclos, cada um consistindo de 95° C para 10s e 60° C por 15s, seguido de uma curva de fusão (60 a 95° C, com aquecimento taxa de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiam em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa do RNAm foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde  $\Delta\Delta C_t$  expressou a diferença entre o número de ciclos ( $C_t$ ) dos genes alvo e o controle endógeno. As sequências de *primers* sensíveis e anti-sentido utilizadas para amplificação estão descritas na Tabela 2 .

### 3.11 Análise de dados

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade da distribuição e homocedasticidade das variâncias e analisados por Teste T de Student (quando comparados apenas dois grupos experimentais, nas 10 primeiras semanas) e por ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Holm-Sidak (quando quatro grupos experimentais foram comparados, na fase de tratamento). Interações entre dieta e tratamento, e efeitos individuais desses fatores sobre as variáveis estudadas, foram avaliadas através da ANOVA de duas vias. As análises foram feitas através do *software* GraphPad Prism, (v7.03 for Windows, GraphPad *Software*, La Jolla CA, USA), e em todos os casos o índice de significância com  $P < 0,05$  foi adotado.

Tabela 2 – Sequência de Primers utilizados no RT-qPCR

Gene	Sequência do primer	
	5' → 3'	3' → 5'
<b>β-actina</b> Beta-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
<b>PPAR-α</b> Receptor ativado de proliferação peroxissomal alfa	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
<b>PGC1α</b> Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha	AACCACACCCACAGGATCAGA	TCTTCGCCTTTATTGCTCCATGA
<b>PRDM16</b> PR Domain containing protein 16	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGCTTGTCCA
<b>Rβ3A</b> Receptor beta-3 adrenérgico	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG
<b>UCP1</b> Proteína desacopladora mitocondrial 1	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Comportamento alimentar e Massa corporal (MC)

A diferença na ingestão energética entre as rações dos grupos C e HF refletiu na MC e no índice de adiposidade dos animais. Os grupos C (média = 25,42g) e HF (média = 25,56g) iniciaram o experimento sem diferença com relação à MC. Contudo, após a segunda semana de consumo de suas respectivas dietas verificou-se aumento da MC significativo no grupo HF em relação ao grupo C (+7%,  $P=0,0396$ ); essa diferença perdurou até a 15ª semana (+17%,  $P=0,0037$ ).

O tratamento começou a mostrar diferenças entre os grupos na 13ª semana, a terceira com a administração da linagliptina. A partir de então, e seguindo até o final do experimento, o grupo HF-L teve redução da MC significativa em relação à sua contraparte não tratada (-9%,  $P=0,0356$ ), conforme exibido na Figura 6.

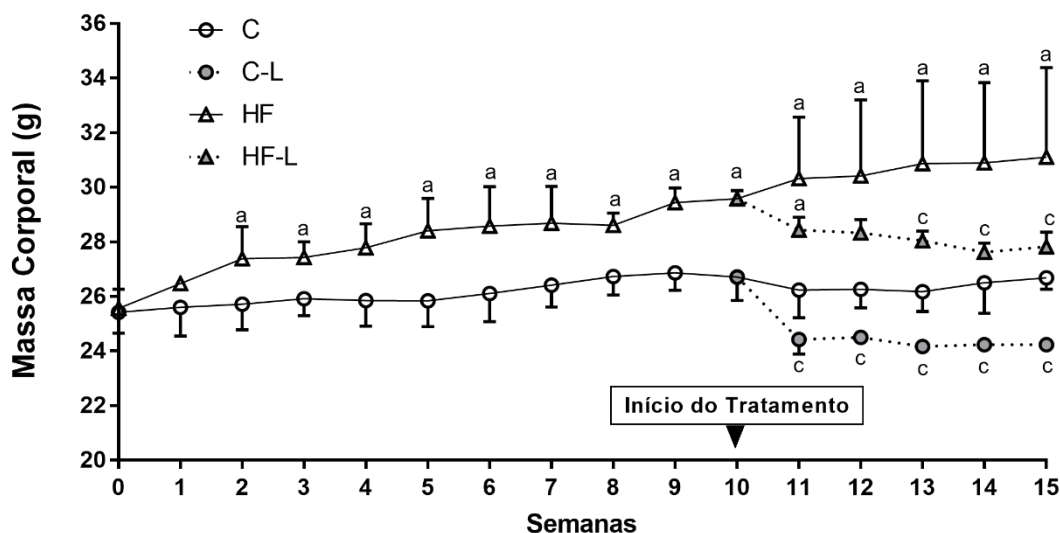
Como não houve diferença estatística significativa entre as ingestões alimentares das rações, em gramatura, entre todos os grupos experimentais, é possível dizer que as alterações na MC tenham sido influenciadas diretamente pela ingestão da droga, como mostra tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 – Comportamento alimentar

DADOS	C	C-L	HF	HF-L
Ingestão energética (KJ/dia/animal)	39,450 ± 0,711	39,650 ± 0,196	51,470 ± 0,705 <sup>a,b</sup>	51,740 ± 0,807 <sup>a,b</sup>
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2,484 ± 0,045	2,493 ± 0,020	2,447 ± 0,050	2,443 ± 0,064

Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=10. Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b ≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

Figura 6 – Evolução da Massa corporal dos animais nos períodos pré e pós-tratamento



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=20$  até a 10<sup>a</sup> semana e  $n=10$  após início do tratamento. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos:  $a \neq C$ ;  $b \neq C-L$ ;  $c \neq HF$ , conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

#### 4.2 Índice de adiposidade e distribuição de gordura

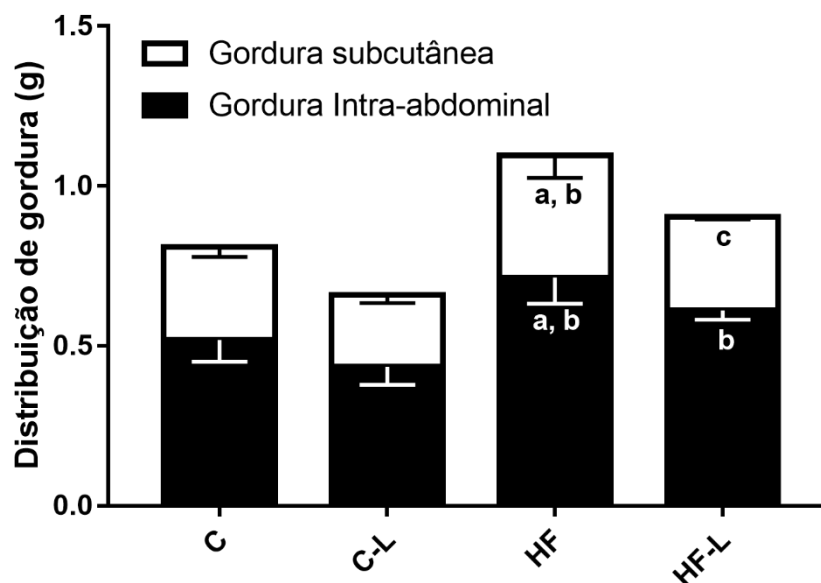
O índice de adiposidade mostrou que o grupo HF teve um aumento significativo em seu percentual de gordura quando comparado a todos os grupos (+33%, +31% e +37% em relação aos grupos HF-L, C e C-L, respectivamente;  $P < 0,05$ ; Tabela 4).

A distribuição de gordura branca entre os compartimentos subcutâneo e intra-abdominal mostrou que o grupo HF apresentou maior acúmulo de TABs que o grupo C (+30%,  $P < 0,02$ ), C-L (+69%,  $P < 0,0001$ ) e HF-L (+30%,  $P < 0,02$ ; Figura 7 e Tabela 4), comprovando a indução ao sobrepeso e mostrando que a medicação foi capaz de reduzir esse depósito no grupo HF-L.

No caso da gordura intra-abdominal, os grupos C e C-L não apresentaram diferença entre si, mas foram menores que o grupo HF (-27%

para o grupo C,  $P<0.001$  e  $-39\%$  para o grupo C-L,  $P<0,0001$ ). Os grupos HF e HF-L não apresentaram diferença entre si em relação à massa desse compartimento adiposo, embora o grupo HF-L tenha apresentado resultado numericamente intermediário (mas não significativo) entre os grupos HF e C (Figura 7 e Tabela 4).

Figura 7 – Distribuição de tecido adiposo branco



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=5$ . Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

Tabela 4 – Gordura Corporal

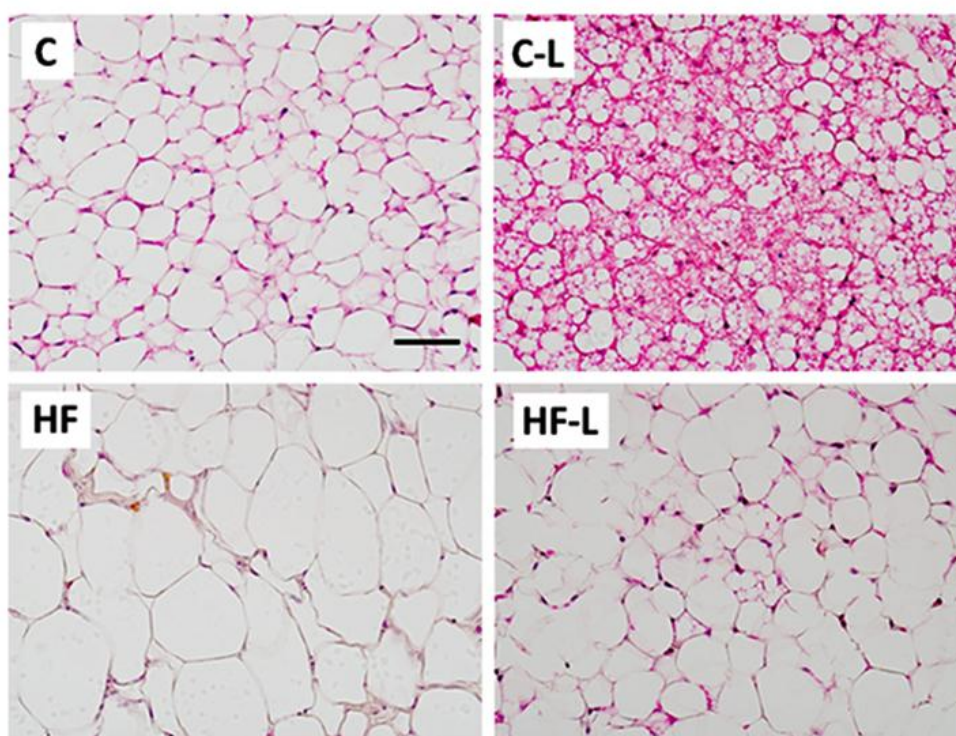
DADOS	C	C-L	HF	HF-L
Índice de adiposidade (%)	3,454 $\pm$ 0,270	3,297 $\pm$ 0,495	4,528 $\pm$ 0,809 <sup>a,b</sup>	3,403 $\pm$ 0,144 <sup>c</sup>
Gordura intra-abdominal (g)	0,518 $\pm$ 0,068	0,434 $\pm$ 0,056	0,714 $\pm$ 0,082 <sup>a,b</sup>	0,611 $\pm$ 0,029 <sup>b</sup>
Gordura subcutânea TABs (g)	0,293 $\pm$ 0,033	0,226 $\pm$ 0,026	0,381 $\pm$ 0,070 <sup>a,b</sup>	0,293 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>

Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=5$ . Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

### 4.3 Morfologia do TABs e Estereologia

A análise das imagens histológicas corrobora os achados anteriores. Fotomicrografias do grupo C mostraram uma configuração padrão de tecido adiposo branco: células uniloculares com núcleos periféricos e de tamanho normal. O grupo HF, por sua vez, apresentou hipertrofia considerável das células (Figura 8). Ambos os grupos tratados apresentaram adipócitos comparáveis aos do grupo C; apresentaram também focos de células multiloculares típicas do tecido adiposo bege, sendo mais evidenciados no grupo C-L do que no grupo HF-L.

Figura 8 – Fotomicrografias do TABs



Legenda: Fotomicrografias do TABs corado com hematoxilina-eosina. Fotos de mesmo aumento e representativas dos grupos experimentais. Barra de calibração = 50  $\mu$ m. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

A análise estereológica mostrou que a área seccional média dos adipócitos do TABs foi de fato significativamente maior no grupo HF quando comparado aos grupos C e C-L (+38% e +51%, respectivamente;  $P < 0,0001$ ), confirmando a hipertrofia dos adipócitos, e portanto, a correta indução do sobrepeso. O grupo HF-L apresentou redução expressiva nesse quesito quando comparado aos grupos HF (-52,5%,  $P < 0,0001$ ) e C (-24%,  $P = 0,038$ ), indicando uma considerável diminuição no acúmulo lipídico no interior das células, e que pode estar relacionada com o aumento da capacidade termogênica do tecido (Tabela 5).

Tabela 5 – Área seccional média dos adipócitos do TABs

DADOS	C	C-L	HF	HF-L
Área seccional média dos adipócitos TABs ( $\mu\text{m}^2$ )	60,600 $\pm$ 20,220	48,060 $\pm$ 12,020	97,390 $\pm$ 28,150 <sup>a,b</sup>	46,260 $\pm$ 7,334 <sup>a,c</sup>

Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=22. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

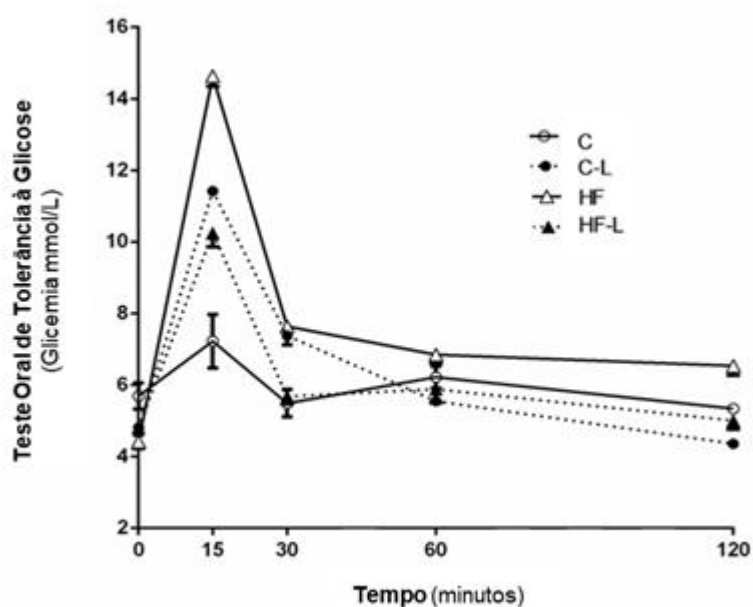
#### 4.4 Metabolismo de carboidratos

No que se refere ao TOTG (Figura 9), todos os grupos apresentaram pico de glicemia aos 15 minutos após a administração da solução glicosada. Os grupos tratados reestabeleceram a glicemia inicial (T0) após aproximadamente 30 minutos decorridos; o grupo C se aproximou do parâmetro inicial por volta de 60 minutos e o grupo HF não conseguiu reestabelecer a glicemia inicial durante o tempo do experimento. A análise da área sob a curva (ASC) (Tabela 6) demonstrou que o grupo HF apresentou intolerância oral à glicose e, portanto, uma ASC maior em relação a todos os grupos (+27%, +23% e +30% que os grupos HF-L, C e C-L, respectivamente; P

<0,001). Esse fato sugere que a linagliptina foi capaz de reduzir a intolerância no grupo HF-L.

Os níveis de insulina plasmática estão de acordo com a intolerância oral à glicose encontrada do grupo HF: +57% ( $P=0,0139$ ) em comparação ao grupo C e +91% ( $P=0,0016$ ) em comparação ao grupo C-L. O grupo HF-L teve insulinemia menor que sua contraparte não tratada, mas não foi significativo, e isso pode ser explicado pelo próprio mecanismo de ação dos inibidores da DPP-4 (Tabela 6).

Figura 9 – Curva glicêmica do TOTG na fase de tratamento



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

Tabela 6 – ASC do TOTG e Insulina plasmática

DADOS	C	C-L	HF	HF-L
ASC TOTG (mmol/L/min)	754,000 ± 15,760	714,700 ± 59,570	928,800 ± 47,400 <sup>a,b</sup>	732,600 ± 67,220 <sup>c</sup>
Insulina plasmática (pg/mL)	1.409 ± 290,5	1.155 ± 243,4	2.210 ± 395,1 <sup>a,b</sup>	1.922 ± 464,3 <sup>b</sup>

Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b ≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L); Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose (ASC TOTG).

#### 4.5 Calorimetria indireta, termografia e Imunofluorescência

O ensaio de calorimetria indireta foi utilizado para o cálculo do Quociente respiratório (QR)/ taxa de troca respiratória, estimado pela razão entre a produção de gás carbônico ( $VCO_2$ ) e o consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), e pode ser um indicador do principal combustível para a manutenção do metabolismo basal dos animais. O grupo C atingiu um maior quociente respiratório em comparação a todos os grupos; o grupo HF-L apresentou a menor taxa, enquanto os grupos C-L e HF apresentaram resultados intermediários. HF-L foi 31% menor que C, 25% menor que C-L e 24% menor que HF ( $P < 0,0001$ ; Tabela 7).

A temperatura corporal média dos animais tratados com a linagliptina se mostrou mais elevada em comparação aos respectivos grupos não tratados: C-L aumentou em comparação ao C (+4%;  $P < 0,0001$ ) e HF-L aumentou em comparação ao HF (+2%;  $P = 0,0221$ ; Tabela 7 e Figura 10).

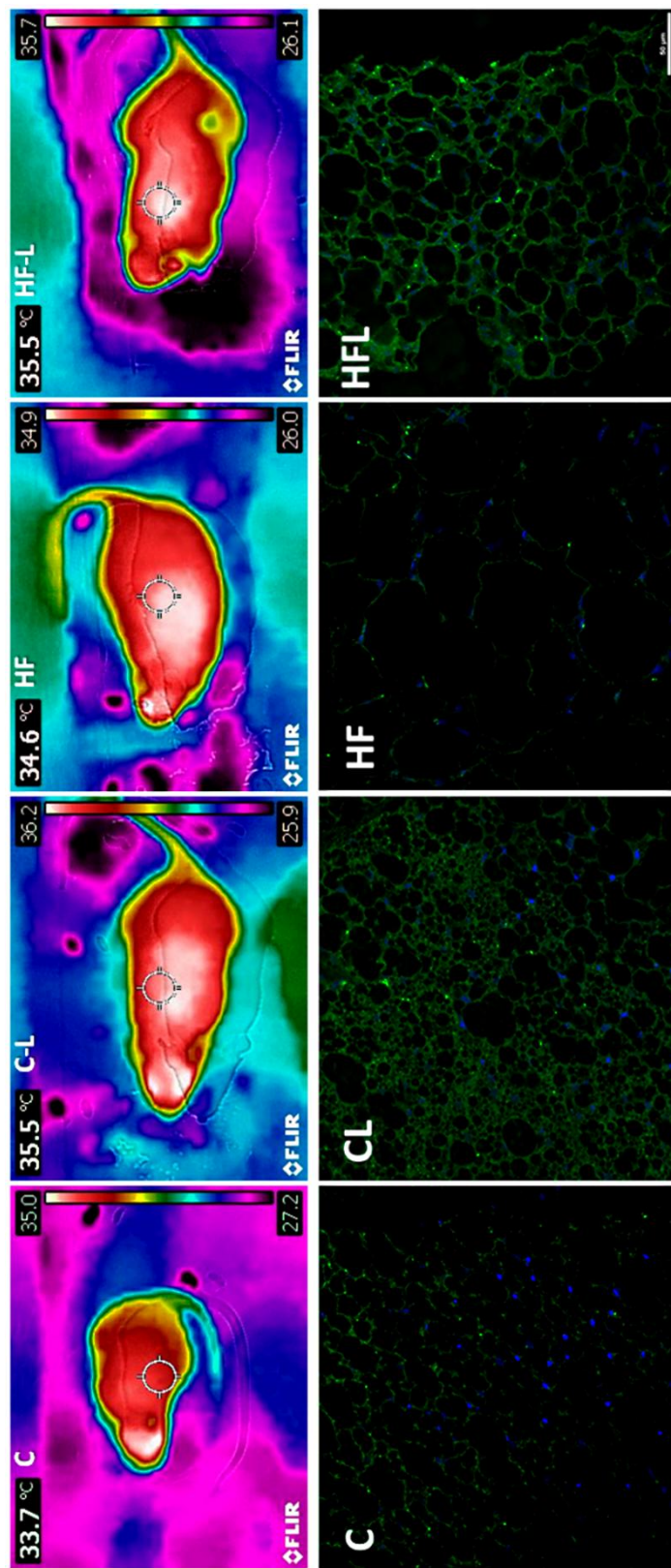
A imunomarcção para UCP1, a proteína termogenina, efetora da termogênese, revelou ativação positiva em ambos os grupos submetidos ao tratamento, corroborando os achados iniciais (Figura 10).

Tabela 7 – Parâmetros metabólicos

DADOS	C	C-L	HF	HF-L
Quociente respiratório (QR)	0,981 ± 0,001	0,900 ± 0,040 <sup>a</sup>	0,898 ± 0,030 <sup>a</sup>	0,678 ± 0,040 <sup>a, b, c</sup>
Temperatura corporal (°C)	33,81 ± 0,716	35,04 ± 0,503 <sup>a</sup>	34,32 ± 0,522 <sup>b</sup>	35,04 ± 0,455 <sup>a, c</sup>

Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina (HF-L).

Figura 10 – Imagens termográficas e Imunomarcção para UCP1



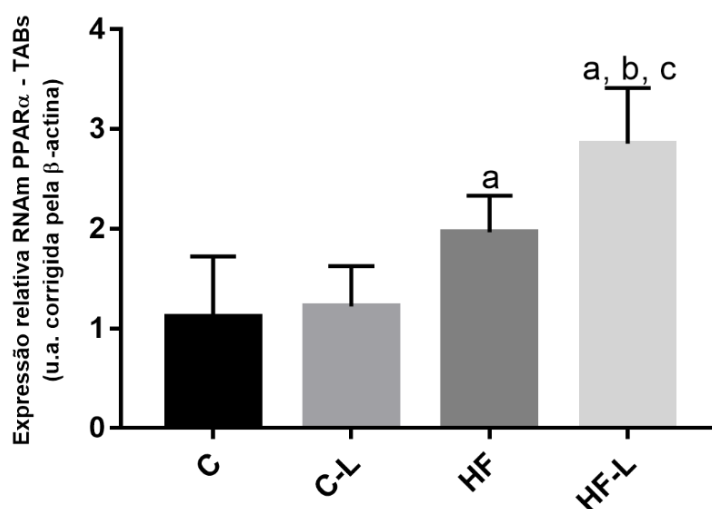
Legenda: Vista dorsal através de câmera termográfica com infravermelho durante o tratamento (prancha superior) e Imunomarcção para UCP1 no TABs (prancha inferior) - Barra de calibração = 50µm.

Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

#### 4.6 RT-qPCR

Os resultados do ensaio de *RT-qPCR* mostraram que a expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) para PPAR-alfa, um importante fator transcricional que possui marcadores termogênicos como genes alvo, foi mais elevado no grupo HF-L que em todos os demais: +45% que o grupo HF,  $P=0,0451$ , +133% que o grupo C-L,  $P=0,0004$  e +155% que o grupo C,  $P=0,0002$ ; Figura 11).

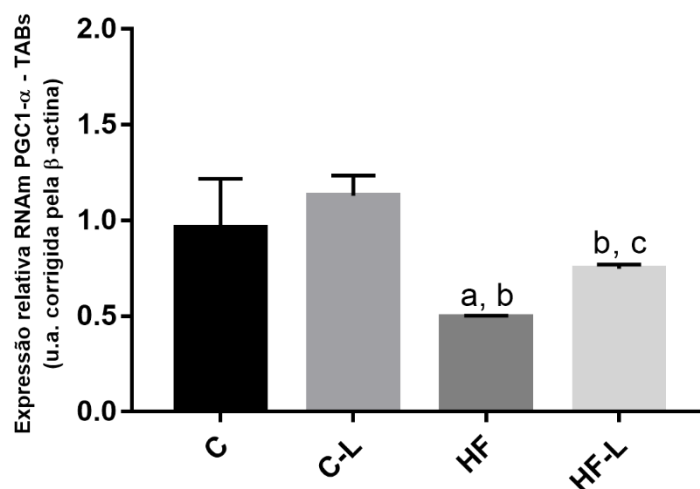
Figura 11 – Níveis de RNA mensageiro para PPAR-alfa



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Os genes foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

O marcador termogênico e fator chave da biogênese mitocondrial PGC1-alfa apresentou aumento significativo de 51% ( $P=0,0331$ ) no grupo HF-L quando comparado ao HF, enquanto os grupos C e C-L não apresentaram diferenças entre si (Figura 12).

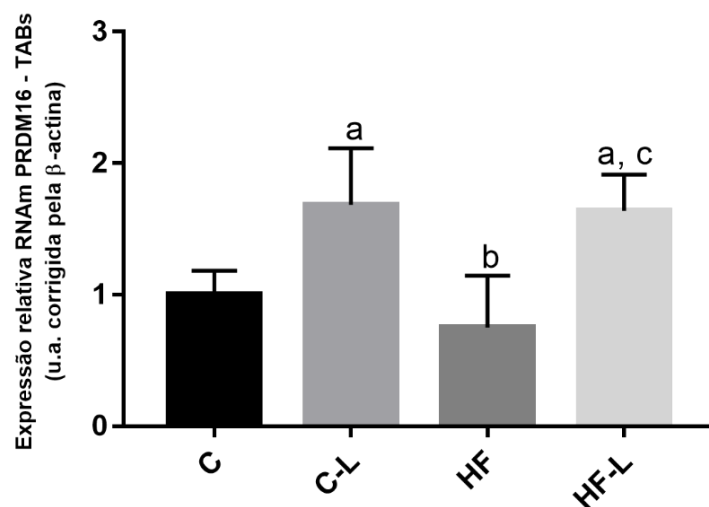
Figura 12 – Níveis de RNA mensageiro para PGC1-alfa



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Os genes foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

O gene essencial relacionado à manutenção do fenótipo bege do tecido adiposo, PRDM16, apresentou expressão elevada em ambos os grupos tratados: C-L foi 68% maior que o grupo C ( $P=0,0212$ ) e HF-L foi 118% maior que HF ( $P=0,0034$ ). Quando comparado ao grupo C, o grupo HF-L teve um aumento de 63% na expressão de PRDM16 ( $P=0,0249$ ; Figura 13).

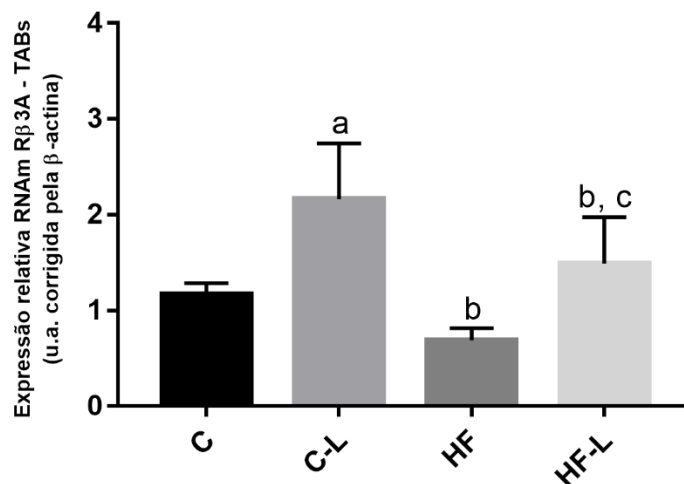
Figura 13 – Níveis de RNA mensageiro para PRDM16



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Os genes foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

De forma similar, a expressão relativa do RNAm para o receptor beta-3-adrenérgico ( $R\beta$ -3A) também foi maior nos grupos tratados, indicando que a medicação pode ter ativado a via termogênica. HF-L teve 177% mais expressão que HF ( $P=0,0198$ ) e C-L teve mais 85% de expressão que C ( $P=0,0050$ ), como mostra a Figura 14.

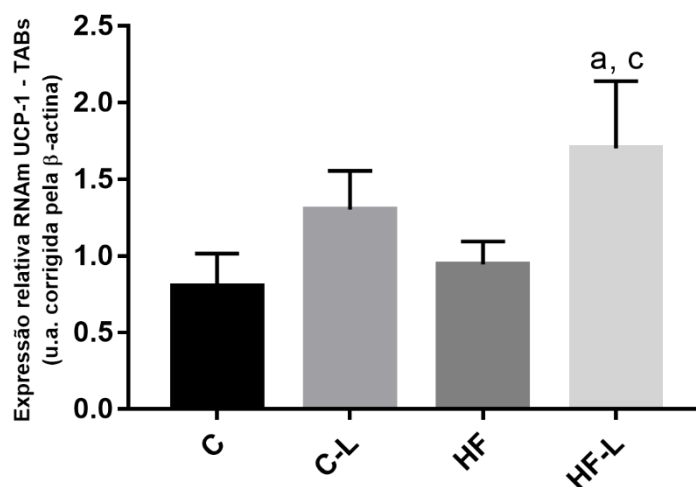
Figura 14 – Níveis de RNA mensageiro para Receptor beta-3 adrenérgico



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Os genes foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

Finalmente, a expressão gênica para UCP1 (figura 15) revelou que ambos os grupos tratados, HF-L e C-L, apresentaram maiores níveis de expressão que suas contrapartes não tratadas, mas apenas o HF-L teve aumento significativo comparado a HF (+80%,  $P = 0,0032$ ). HF-L também apresentou níveis significativamente diferentes em relação ao grupo C (+112%,  $P < 0,0008$ ).

Figura 15 – Níveis de RNA mensageiro para UCP1



Legenda: Valores representados como Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=5 por grupo. Os genes foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a  $\neq$  C; b  $\neq$  C-L; c  $\neq$  HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

#### 4.7 ANOVA de duas vias

A dieta, como único fator, exerceu maior influência sobre os resultados de MC ( $P < 0,0001$ , 47% da variância total), ingestão energética ( $P < 0,0001$ , 98% da variância total), gordura intra-abdominal ( $P < 0,0001$ , 62% da variância total), níveis plasmáticos de insulina ( $P = 0,0002$ , 56% da variância total) e nas expressões gênicas de PPAR-alfa e PGC1-alfa ( $P < 0,0001$ , 62% da variância total para ambos os genes).

O tratamento com linagliptina, como fator independente, teve maior influência sobre os dados de índice de adiposidade ( $P = 0,0110$ , 23% da variância total), área seccional média dos adipócitos ( $P = 0,0016$ , 36% da variância total), ASC do TOTG ( $P < 0,0001$ , 37% da variância total), temperatura corporal ( $P < 0,0001$ , 43% da variância total), e nas expressões gênicas de PRDM16 ( $P < 0,0001$ , 61% da variância total), R $\beta$ -3A ( $P < 0,0001$ , 49% da variância total) e UCP1 ( $P < 0,0001$ , 50% da variância total).

Dieta e tratamento, separadamente, influenciaram da mesma forma o parâmetro de gordura subcutânea ( $P=0.000$ , 34% da variância total atribuída a cada fator).

Dieta e tratamento interagiram significativamente sobre o índice de adiposidade ( $P=0,0453$ ), área seccional média dos adipócitos ( $P=0,0348$ ), ASC do TOTG ( $P=0,0036$ ) e QR ( $P=0,0002$ ). Todos os resultados seguem detalhados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados do ANOVA de duas vias

PARÂMETRO	INTERAÇÃO		TRATAMENTO		DIETA	
	% total da Variância	Valor P	% total da Variância	Valor P	% total da Variância	Valor P
<b>Comportamento alimentar</b>						
Massa Corporal final	---	---	23,76	<0,0001	46,38	<0,0001
Ingestão energética	---	---	---	---	98,27	<0,0001
<b>Gordura corporal</b>						
Índice de adiposidade	13,10	0,0453	22,98	0,0110	19,47	0,0176
Gordura intra-abdominal	---	---	15,61	0,0038	62,39	<0,0001
Gordura subcutânea TABs	---	---	34,05	0,0007	34,40	0,0007
<b>Esteréologia</b>						
Área seccional média dos adipócitos TABs	13,24	0,0348	36,05	0,0016	---	---
<b>Metabolismo de carboidratos</b>						
ASC TOTG	16,30	0,0036	36,73	0,0001	24,59	0,0001
Insulina plasmática	---	---	---	---	55,85	0,0002
<b>Dados metabólicos</b>						
Quociente respiratório	9,05	0,0002	41,92	<0,0001	42,93	<0,0001
Temperatura corporal	---	---	42,73	<0,0001	---	---
<b>Expressão Gênica</b>						
PPAR- $\alpha$	---	---	9,11	0,0382	56,66	<0,0001
PGC1- $\alpha$	---	---	15,31	0,0038	63,63	<0,0001
PRDM16	---	---	61,19	<0,0001	---	---
R $\beta$ -3A	---	---	49,25	<0,0001	20,36	0,0045
UCP1	---	---	50,36	<0,0001	9,33	0,0005

Legenda: O fator que mais influenciou a variância total está em negrito. Abreviações: Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs), Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose (ASC TOTG), Receptores ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ), Receptores ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PGC1- $\alpha$ ), Proteína 16 contendo o domínio PR (PRDM16), Receptor beta-3 adrenérgico (R $\beta$ -3A) e Proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1).

## 5 DISCUSSÃO

A linagliptina administrada na dosagem proposta pelo presente estudo, em camundongos induzidos à obesidade através de dieta, foi capaz de restaurar a MC, índice de adiposidade e RI à valores similares aos do grupo C. É possível atribuir esses resultados metabólicos significativos às evidências de *browning* do TABs após o tratamento, amparado na expressão aumentada de genes marcadores da termogênese, marcações de UCP1 positivas e aumento de temperatura corporal nos animais obesos e tratados com a linagliptina.

A redução da MC entre os grupos HF-L e HF começou a se mostrar significativa após três semanas da administração da droga, e pôde ser confirmada pela redução do índice de adiposidade e pela mudança estrutural do TABs – a redução da área seccional média dos adipócitos gera menor acúmulo lipídico. Já que não houve diferença na ingestão alimentar (não apontando a necessidade de acrescentar grupo *pair-feeding* ao estudo), e houve similaridade na ingestão energética entre os grupos HF e HF-L, a redução da massa corporal observada pode ser atribuída ao uso da medicação. Os resultados encontrados foram compatíveis com a literatura pregressa, onde não houve mudança no comportamento alimentar (normofagia) durante o tratamento com a droga (Kern *et al.*, 2012).

A linagliptina age sobre o metabolismo de carboidratos, sendo indicada para o tratamento de pacientes com diabetes Mellitus do tipo 2 (DMT2). O mecanismo de ação se dá a partir da inibição da enzima e adipocina DPP-4, que inativa as incretinas intestinais (como GIP e GLP1). Sendo assim, há um aumento da secreção pancreática de insulina pós-prandial, graças ao tempo de ação prolongado das incretinas (Eckhardt *et al.*, 2007). Dessa forma, o controle glicêmico de pacientes resistentes à insulina fica melhorado (McGill, 2012). Como a ação da linagliptina é glicose-dependente, é uma droga segura do ponto de vista de episódios de hipoglicemia (Eckhardt *et al.*, 2007; Del Prato *et al.*, 2011; McGill, 2012).

A análise do TOTG e a respectiva ASC mostrou que animais insultados inicialmente pela dieta hiperlipídica tiveram dificuldade de reestabelecer a glicemia inicial ao longo do intervalo de tempo avaliado no ensaio; tal achado

está de acordo com a hiperinsulinemia encontrada nos mesmos animais. A linagliptina promoveu melhora na tolerância oral à glicose no grupo HF-L, que não apresentou diferença estatística para o grupo C. Já os níveis plasmáticos de insulina não apresentaram diferenças significativas nos grupos tratados em comparação às contrapartes não tratadas. Isso pode ser explicado pelo aumento da meia-vida das incretinas intestinais promovido pela inibição da DPP-4, que permitiu uma maior liberação de insulina e, conseqüentemente, maiores níveis séricos – a droga é capaz de manter inibição de aproximadamente 80% da DPP-4 durante as 24h de intervalo entre as doses em humanos (Kern *et al.*, 2012).

A microscopia de luz revelou focos de *browning* no TABs dos animais tratados. As fotomicrografias mostram adipócitos multiloculares entremeados aos adipócitos brancos, sendo esses focos muito mais evidentes nas lâminas do grupo C-L. Mesmo que o mecanismo de ação de droga na homeostase glicêmica seja glicose-dependente, é provável que os efeitos pleiotrópicos não tenham a mesma relação, visto que animais mais magros e menos intolerantes à glicose apresentaram também mudanças no TABs. Ambos os grupos tratados apresentaram alterações estruturais no TABs, mas com diferentes intensidades nesse recorte temporal do estudo. Esses resultados estão de acordo com a redução da MC nos animais tratados, já que a gordura ingerida em excesso pode ter sido utilizada com combustível para a atividade termogênica ao invés de ser armazenado (Wu *et al.*, 2013).

O QR indica a principal fonte energética na manutenção do metabolismo basal dos animais. HF-L teve a menor razão entre  $VCO_2$  e  $VO_2$  (próxima de 0,7) e isso aponta para consumo de lipídios como primeira fonte energética; animais controle, por sua vez, apresentaram QR que indica consumo primário de carboidratos (Arch *et al.*, 2006). O aumento da temperatura corporal nos grupos tratados, somados aos dados de QR, sugerem que a redução da MC tenha se processado através da perda de energia em forma de calor, configurando a atividade termogênica, e utilizando lipídios como combustível.

Os ensaios de imunofluorescência e *RT-qPCR* confirmaram os achados prévios. A imunomarcação para UCP1, localizada na membrana mitocondrial interna, apresentou marcação positiva para a proteína, que é a efetora da termogênese.

A cascata termogênica se inicia com o estímulo adrenérgico (Bargut *et al.*, 2017), que é o gatilho para o aumento de AMPc e ativação da PKA, que por sua vez, induz a lipólise. Os ácidos graxos livres ativam a UCP1, que permite que prótons H<sup>+</sup> retornem do espaço intermembranas para a luz mitocondrial, evitando a formação de ATP e seu consequente armazenamento, e permitindo que a energia seja liberada em forma de calor (Ricquier *et al.*, 2000; Spiegelman, 2013; Ricquier, 2017).

Na temperatura em que o estudo foi conduzido, a expressão aumentada de UCP1 no TABs indica o fenômeno do *browning*, visto que apenas baixas temperaturas (4°C) poderiam induzir o mesmo fenômeno. A evidência de células UCP1 positivas as confirma como células beges (Kalinovich *et al.*, 2017). Ademais, a expressão do receptor beta-3 adrenérgico foi influenciada somente pelo tratamento, e confirma o gatilho para início da via termogênica em ambos os grupos tratados (Jimenez *et al.*, 2003).

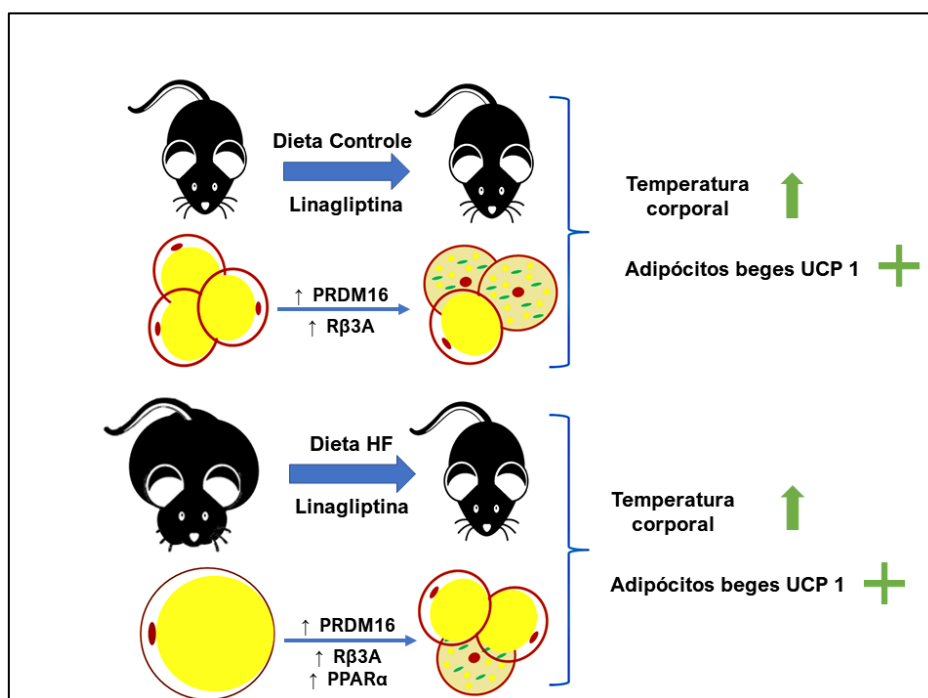
O PPAR-alfa apresenta níveis basais em roedores (Braissant *et al.*, 1996) e agonistas da molécula podem ser utilizados como drogas anti-obesogênicas (Veiga *et al.*, 2017), com efeitos potenciais na termogênese e no fenômeno do *browning* (Rachid *et al.*, 2015). Animais do grupo HF-L apresentaram os maiores níveis de expressão desse marcador dentre todos os grupos, e esse parâmetro foi influenciado pela dieta e pelo tratamento. A possível interação entre a ativação do PPAR-alfa e a ação estendida das incretinas deve ser investigada.

A expressão gênica aumentada de PPAR-alfa influencia os níveis de PGC1-alfa, considerado fator chave da biogênese mitocondrial (Spiegelman, 2013) e também ativador da transcrição de da UCP1 (Bargut *et al.*, 2017). O grupo HF-L apresentou maior expressão gênica de PGC1-alfa que o grupo HF, e isso pode representar a restauração dos níveis, considerando que o grupo HF-L não apresentou diferenças para o grupo C. Os níveis elevados de PPAR-alfa podem explicar essa observação graças a um possível efeito pleiotrópico da ação da linagliptina como um agonista de PPAR-alfa. Já é sabido também que a inibição da DPP-4 promove polarização de macrófagos do tipo M2 (Zhuge *et al.*, 2016) que são relacionados à sinalização anti-inflamatória, transcrição de fatores da beta-oxidação e aumento de PGC1-alfa devido à inibição do NF-kB (Namgaladze *et al.*, 2014).

A termogênese adaptativa, caracterizada pela produção extra de calor, pode ser induzida por frio, ingestão alimentar ou exercício físico (Ricquier *et al.*, 2000; Spiegelman, 2013), e adipócitos do tecido adiposo branco são mais sensíveis a esse fenômeno, que leva ao “amarronzamento” do tecido. Sob estímulo, os adipócitos brancos adquirem fenótipo de células marrons, sendo esses a alta densidade mitocondrial (e conseqüente aumento da capacidade termogênica) e mudança a morfológica da gotícula lipídica (que passa de unilocular para multilocular) (Bargut *et al.*, 2017). A manutenção do fenótipo bege não consegue ser feita sem o aumento dos níveis de PRDM16 (Seale *et al.*, 2008; Bargut *et al.*, 2017), cuja ausência implica no retorno da célula bege ao status de adipócito branco, com seu arranjo de gotícula unilocular, baixa densidade mitocondrial e baixos níveis de UCP1 (Spiegelman, 2013). Os altos níveis de expressão gênica de PRDM16 encontrados nos grupos tratados reforça que o fenótipo bege induzido pelo uso da lincloptina estava sendo mantido.

O grupo HF-L apresentou níveis mais altos de expressão gênica para a proteína UCP1 que o grupo C e HF, indicando alta densidade de mitocôndrias ativas. Esse resultado, combinado aos altos níveis de expressão de PRDM16, maior nível de expressão de PPAR-alfa entre todos os grupos, temperatura corporal aumentada e as imagens histológicas contendo menos focos de células beges (em comparação ao grupo C-L), nos levam a crer que o fenômeno do *browning* deve ter acontecido em diferentes momentos nos grupos tratados. O grupo C-L parece ter tido ativação da cascata termogênica anteriormente ao grupo HF-L, que precisou lidar com o insulto da dieta primeiramente, e ao fim do experimento estava iniciando a expressão dos marcadores termogênicos de forma mais efetiva. A figura 16 resume os resultados encontrados.

Figura 16 – Efeitos da linagliptina no modelo experimental proposto



Legenda: Resumo gráfico com os principais resultados encontrados, sendo o aumento de expressão gênica de PRDM16 (Proteína 16 contendo o domínio PR) e Rβ-3A (Receptor beta-3 adrenérgico), aumento da temperatura corporal e adipócitos positivos para UCP1 (Proteína desacopladora mitocondrial 1) comuns a ambos os grupos tratados; enquanto o HF-L (grupo alimentado com dieta high fat com linagliptina) apresentou maiores níveis de expressão gênica de PPAR-α e poucos focos de células beges, o grupo C-L (Grupo alimentado com dieta controle e tratado com Linagliptina) apresentou focos mais numerosos de adipócitos beges entremeados aos TABs,

Os achados no TABs dos camundongos induzidos à obesidade e tratados com a linagliptina na dosagem de 30mg/kg MC indicam que seus benefícios vão além do controle glicêmico, previamente relacionado à redução da esteatose hepática (Kern *et al.*, 2012). A linagliptina tem excreção predominante através das fezes, o que permite sua administração sem ajuste de dose para pacientes com insuficiência renal, e a torna diferenciada em comparação às demais drogas da família das gliptinas (Del Prato *et al.*, 2011; McGill, 2012). Essa característica reafirma o potencial translacional dos achados presentes, uma vez que a linagliptina é usada atualmente como monoterapia ou combinada com outras drogas em humanos visando a homeostase glicêmica, com potenciais benefícios cardio-renais (Forst *et al.*, 2010; Kawamori *et al.*, 2018). Todavia é importante ressaltar que mais

informações acerca das vias inflamatórias e de potenciais danos a outros órgãos devem ser investigadas.

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos é possível concluir que a dose proposta de linagliptina foi capaz de reduzir a massa corporal dos camundongos induzidos ao sobrepeso, cursando em paralelo com a redução do índice de adiposidade, melhora da morfologia do TABs (com menor acúmulo lipídico) e aumento da expressão gênica de marcadores relacionados à termogênese. Os animais tratados tiveram melhora da tolerância oral à glicose, esperada para um medicamento da classe dos inibidores da enzima DPP-4, e aumento da temperatura corporal quando comparadas às contrapartes não tratadas. Tais indícios, quando analisados juntamente com a expressão proteica positiva e expressão gênica aumentada de UCP1 apontam para a ativação da cascata termogênica, e indução do fenômeno do *browning* no TABs. Sendo assim, é possível dizer que a linagliptina induziu a via termogênica nos animais tratados como um efeito pleiotrópico, podendo ter potencial translacional.

## REFERÊNCIAS

- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 894: i-xii, 1-253
- Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* (Silver Spring) 2006; 14 Suppl 5: 242S-249S (doi: 10.1038/oby.2006.317)
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-1645 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644)
- Arch JR, Hislop D, Wang SJ, Speakman JR. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 1322-1331 (doi: 10.1038/sj.ijo.0803280)
- Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017; 31: (doi: 10.1515/hmbci-2016-0051)
- Betz MJ, Enerback S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes* 2015; 64: 2352-2360 (doi: 10.2337/db15-0146)
- Braissant O, Fougère 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: 354-366 (doi: 10.1210/endo.137.1.8536636)
- Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 2013; 17: 819-837 (doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.008)
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359 (doi: 10.1152/physrev.00015.2003)
- Choi JH, Yun JW. Chrysin induces brown fat-like phenotype and enhances lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition* 2016; 32: 1002-1010 (doi: 10.1016/j.nut.2016.02.007)
- Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-248 (doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.006)

- Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Penicaud L et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992; 103 ( Pt 4): 931-942 (doi: 10.1046/j.1365-2133.1992.1034931.x)
- Del Prato S, Barnett AH, Huisman H, Neubacher D, Woerle HJ, Dugi KA. Effect of linagliptin monotherapy on glycaemic control and markers of beta-cell function in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 258-267 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01350.x)
- 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. *J Med Chem* 2007; 50: 6450-6453 (doi: 10.1021/jm701280z)
- Forst T, Uhlig-Laske B, Ring A, Graefe-Mody U, Friedrich C, Herbach K et al. Linagliptin (BI 1356), a potent and selective DPP-4 inhibitor, is safe and efficacious in combination with metformin in patients with inadequately controlled Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2010; 27: 1409-1419 (doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.03131.x)
- Gomis R, Espadero RM, Jones R, Woerle HJ, Dugi KA. Efficacy and safety of initial combination therapy with linagliptin and pioglitazone in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 653-661 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01391.x)
- Graus-Nunes F, Rachid TL, de Oliveira Santos F, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V. AT1 receptor antagonist induces thermogenic beige adipocytes in the inguinal white adipose tissue of obese mice. *Endocrine* 2017; 55: 786-798 (doi: 10.1007/s12020-016-1213-1)
- Grover SA, Kaouache M, Rempel P, Joseph L, Dawes M, Lau DC et al. Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 114-122 (doi: 10.1016/S2213-8587(14)70229-3)
- Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26: 193-200 (doi: 10.1016/j.tem.2015.01.006)
- Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2015; 241: 27-35 (doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.812)
- Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 2015; 33: 673-689 (doi: 10.1007/s40273-014-0243-x)
- Hu FB. Obesity and mortality: watch your waist, not just your weight. *Arch Intern Med* 2007; 167: 875-876 (doi: 10.1001/archinte.167.9.875)

- Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *J Cell Physiol* 2017; 232: 61-68 (doi: 10.1002/jcp.25450)
- Jimenez M, Barbatelli G, Allevi R, Cinti S, Seydoux J, Giacobino JP et al. Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem* 2003; 270: 699-705 (doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.02700.x)
- Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 2017; 134: 127-137 (doi: 10.1016/j.biochi.2017.01.007)
- Kawamori R, Haneda M, Suzaki K, Cheng G, Shiki K, Miyamoto Y et al. Empagliflozin as add-on to linagliptin in a fixed-dose combination in Japanese patients with type 2 diabetes: Glycaemic efficacy and safety profile in a 52-week, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 2200-2209 (doi: 10.1111/dom.13352)
- Kern M, Kloting N, Mark M, Mayoux E, Klein T, Bluher M. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves insulin sensitivity in db/db mice both as monotherapy and in combination with linagliptin. *Metabolism* 2016; 65: 114-123 (doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.010)
- Kern M, Kloting 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: e38744 (doi: 10.1371/journal.pone.0038744)
- Kwan HY, Wu J, Su T, Chao XJ, Liu B, Fu X et al. Cinnamon induces browning in subcutaneous adipocytes. *Sci Rep* 2017; 7: 2447 (doi: 10.1038/s41598-017-02263-5)
- 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: 1917-1925 (doi: 10.2337/db10-1707)
- Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E617-626 (doi: 10.1152/ajpendo.00010.2005)
- Loncar D, Afzelius BA, Cannon B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1988; 101: 199-209 (doi: 10.1016/0022-2720(88)90010-0)
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117: 175-184 (doi: 10.1172/JCI29881)
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486 (doi: 10.1590/s0001-37652003000300010)

McGill JB. Linagliptin for type 2 diabetes mellitus: a review of the pivotal clinical trials. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2012; 3: 113-124 (doi: 10.1177/2042018812449406)

Namgaladze D, Lips S, Leiker TJ, Murphy RC, Ekroos K, Ferreiros N et al. Inhibition of macrophage fatty acid beta-oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia* 2014; 57: 1067-1077 (doi: 10.1007/s00125-014-3173-4)

Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4: 525-536 (doi: 10.1016/S2213-8587(15)00482-9)

Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* 2014; 20: 396-407 (doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.005)

Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 402: 86-94 (doi: 10.1016/j.mce.2014.12.027)

Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Differential actions of PPAR-alpha and PPAR-beta/delta on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. *PLoS One* 2018; 13: e0191365 (doi: 10.1371/journal.pone.0191365)

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. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)

Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* 2017; 134: 3-8 (doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.018)

Ricquier D, Miroux B, Larose M, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F. Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 2: S86-88 (doi: 10.1016/j.ijob.2000.07.005)

Rodriguez-Ortiz D, Reyes-Perez A, Leon P, Sanchez H, Mosti M, Aguilar-Salinas CA et al. Assessment of two different diagnostic guidelines criteria (National Cholesterol Education Adult Treatment Panel III [ATP III] and International Diabetes Federation [IDF]) for the evaluation of metabolic syndrome remission in a longitudinal cohort of patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery* 2016; 159: 1121-1128 (doi: 10.1016/j.surg.2015.11.015)

Rodriguez A, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Becerril S, Fruhbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 309: E691-714 (doi: 10.1152/ajpendo.00297.2015)

Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obes Res* 1997; 5: 650-656 (doi:

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: 1949-1961 (doi: 10.1016/S0140-6736(11)60135-9)

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: 961-967 (doi: 10.1038/nature07182)

Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutr Metab* 2015; 66 Suppl 2: 7-12 (doi: 10.1159/000375143)

Sell H, Bluher M, Kloting 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: 4083-4090 (doi: 10.2337/dc13-0496)

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 239-250 (doi: 10.1042/CS20100061)

Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 2013; 62: 1774-1782 (doi: 10.2337/db12-1665)

Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 2015; 64: 2361-2368 (doi: 10.2337/db15-0227)

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* 2011; 378: 804-814 (doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1)

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243: 47-59 (doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03481.x)

Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarin-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: 106-116 (doi: 10.1016/j.biochi.2017.07.003)

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360: 1518-1525 (doi: 10.1056/NEJMoa0808949)

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: 366-376 (doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016)

Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27: 234-250 (doi: 10.1101/gad.211649.112)

Yudkin JS. Insulin resistance and the metabolic syndrome--or the pitfalls of epidemiology. *Diabetologia* 2007; 50: 1576-1586 (doi: 10.1007/s00125-007-0711-3)

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: 425-432 (doi: 10.1038/372425a0)

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: 2966-2979 (doi: 10.2337/db16-0317)

## ANEXO A – Comitê de ética



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

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

**Endocrine**  
International Journal of Basic and Clinical Endocrinology

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)  
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

**Editorial Manager™**

Role: **author** | Username: souzamelio,uerj

---

**Submissions Being Processed for Author Vanessa Souza-Mello, Ph.D.**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display **10** results per page.

<input type="checkbox"/> Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	ENDO-D-19-00027	Linagliptin induces thermogenic beige adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue in diet-induced obese C57BL/6 mice	10 Jan 2019	10 Jan 2019	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display **10** results per page.

<< Author Main Menu