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

Felipe de Oliveira Santos

Efeitos anti-esteatóticos da linagliptina na supressão da lipogênese de novo e do estresse do retículo endoplasmático em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro
2019

Felipe de Oliveira Santos

Efeitos anti-esteatóticos da linagliptina na supressão da lipogênese de novo e do estresse do retículo endoplasmático em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica

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.ª Dra. Vanessa Souza Mello

Rio de Janeiro

2019

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

S237 Santos, Felipe de Oliveira.
Efeitos anti-esteatóticos da linagliptina na supressão da lipogênese de novo e do estresse do retículo endoplasmático em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Felipe de Oliveira Santos. – 2019.
73 f.

Orientadora: Vanessa Souza Mello

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

1. Obesidade – Teses. 2. Linagliptina. 3. Lipogênese. 4. Estresse do retículo endoplasmático. 5. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. I. Mello, Vanessa Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.391

Bibliotecária: Angela da Silva Velho – CRB7/4780

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

_____ _____

Assinatura Data

Felipe de Oliveira Santos

Efeitos anti-esteatóticos da linagliptina na supressão da lipogênese de novo e do estresse do retículo endoplasmático em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica

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 28 de novembro de 2019.

Banca examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Simone Nunes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Milena Barcza Stockler-Pinto

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por Ele e para Ele são todas as coisas: "*Dêem graças ao Senhor, porque ele é bom; o seu amor dura para sempre";*

Aos meus pais, Marta e José Sebastião, por acreditarem em mim em todos os momentos, obrigado por tudo, minha base e meu amparo;

Ao meu irmão, Renan, e avós por fazer diferença em minha vida, sei que posso contar sempre com vocês, obrigado;

À minha família, por todas as demonstrações de carinho e por acreditar que eu seria capaz;

À minha orientadora, Profa. Dra.Vanessa Souza-Mello, "mãe-científica" que me recebeu com tanto carinho e não exitou esforços para me ajudar em todo o trabalho, pela amizade construída;

Aos meus anjos Thatiany Marinho e Tamiris Ingrid, vocês fizeram a diferença, foram meu suporte, braço direito e esquerdo, não mediram esforços em parar e me ensinar cada dúvida solicitada. Eternamente serei grato. Obrigado pelo carinho e amizade construída;

As minhas "irmãs-científicas" do LMMC, Flávia, Carol, Francielle Graus, Tamiris Rachid, obrigado por todo apoio e força;

Aos demais colegas do LMMC, Obrigado pela parceria!;

A minha dupla de vida Carolina Estrela, que me ouviu, chorou comigo e me apoiou em todos os momentos. Existem pessoas que nos traz paz em sua fala. Obrigado por estar comigo, pela parceira e cumplicidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.
Martin Luther king

RESUMO

SANTOS, Felipe de Oliveira. **Efeitos anti-esteatóticos da linagliptina na supressão da lipogênese de novo e do estresse do retículo endoplasmático em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.** 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O trabalho busca investigar os efeitos do tratamento com a linagliptina no metabolismo energético hepático e no estresse do retículo endoplasmático em camundongos C57BL/6 alimentados dieta hiperlipídica. Quarenta camundongos machos C57BL/6, 3 meses de idade, receberam dieta controle (C, 10% de lipídios como energia, n = 20) ou dieta hiperlipídica (HF, 50% de lipídios como energia, n = 20) por 10 semanas. Posteriormente, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos para receber linagliptina (L), durante 5 semanas, na dose de 30mg/kg/dia adicionada às dietas: grupos C, C-L, HF e HF-L. Foram realizadas análises bioquímicas, estereologia, qPCR para genes relacionados à oxidação beta, lipogênese e estresse do retículo endoplasmático. Tendo como resultados o grupo HF apresentou aumento da massa corporal, dos níveis de colesterol total e hepático e dos níveis de triacilglicerol total e hepático em comparação ao grupo C, os quais foram significativamente reduzidos pela linagliptina no grupo HF-L. O grupo HF apresentou maior esteatose hepática que o grupo C, enquanto a linagliptina reduziu acentuadamente a esteatose hepática (-52%, $P<0,001$). A expressão de *Sirt1* e *Pgc1a* foi maior no grupo HF-L do que no grupo HF. A linagliptina também provocou uma redução na expressão dos genes lipogênicos *Fas* e *Srebp1c*. Além disso, o HF-L mostrou redução nos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático *Chop*, *Atf4* e *Gadd45*, associados à redução da imunocoloração de núcleos apoptóticos. A linagliptina causou redução acentuada da esteatose hepática baseada na supressão de genes lipogênicos e na indução de genes da beta-oxidação. Esse padrão de expressão gênica causou alívio no estresse do retículo endoplasmático, levando à redução da apoptose e à melhor preservação da estrutura hepática. Portanto, a linagliptina pode ser utilizada preferencialmente em pacientes diabéticos para evitar a progressão da esteatose hepática.

Palavras-chave: Linagliptina. Obesidade. Lipogênese. Beta-oxidação. NAFDL. Estresse do retículo endoplasmático.

ABSTRACT

SANTOS, Felipe de Oliveira. **Anti-steatotic linagliptin effects encompasses suppression of de novo lipogenesis and ER stress in high-fat-fed mice**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The paper aims to investigate the effects of linagliptin treatment on hepatic energy metabolism and endoplasmic reticulum stress in C57BL / 6 mice fed a high fat diet. Forty 3-month-old male C57BL / 6 mice received either a control diet (C, 10% lipid as energy, n = 20) or a hyperlipid diet (HF, 50% lipid as energy, n = 20) for 10 weeks. Subsequently, the groups were randomly divided into four groups to receive linagliptin (L) for 5 weeks at a dose of 30mg / kg / day added to the diets: groups C, C-L, HF and HF-L. Biochemical analyzes, stereology, qPCR for genes related to beta oxidation, lipogenesis and stress of the endoplasmic reticulum were performed. The HF group showed increased body mass, total and hepatic cholesterol levels and total and hepatic triacylglycerol levels compared to group C, which were significantly reduced by linagliptin in the HF-L group. Group HF had higher hepatic steatosis than group C, while linagliptin markedly reduced hepatic steatosis (-52%, P <0.001). The expression of Sirt1 and Pgc1a was higher in the HF-L group than in the HF group. Linagliptin also caused a reduction in lipogenic gene expression Fas and Srebp1c. In addition, HF-L showed a reduction in stress-related genes of the endoplasmic reticulum Chop, Atf4 and Gadd45, associated with reduced immunostaining of apoptotic nuclei. Linagliptin caused marked reduction in hepatic steatosis based on suppression of lipogenic genes and induction of beta-oxidation genes. This pattern of gene expression caused stress relief in the endoplasmic reticulum, leading to reduced apoptosis and better preservation of liver structure. Therefore, linagliptin may preferably be used in diabetic patients to prevent the progression of hepatic steatosis.

Keywords: Linaglitin. Obesity. Lipogenesis. Beta-oxidation. NAFLD. ER stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obesidade: causas e consequências..... 17
Figura 2 - Metabolismo hepático..... 19
Figura 3 - Hipóteses dos fatores..... 20
Figura 4 - Esquema representativo da ativação do ERE..... 24
Figura 5 - Incretinas intestinais e linagliptina..... 28
Figura 6 - Desenho experimental..... 32
Figura 7 - Gráfico de evolução da massa corporal..... 40
Figura 8 - Distribuição de tecido adiposo branco..... 41
Figura 9 - Curva glicêmica do TOTG na fase de tratamento..... 43
Figura 10 - Fotomicrografia, massa hepática e esteatose..... 46
Figura 11 - Irrigação hepática..... 47
Figura 12 - Bioquímica hepática..... 49
Figura 13 - Bioquímica plasmática..... 50
Figura 14 - Expressão gênica da via lipogênica..... 51
Figura 15 - Expressão gênica da via da β-oxidação..... 52
Figura 16 - Expressão gênica e imunomarcação para Plin2..... 53
Figura 17 - Níveis de RNAm dos genes do ERE e morte celular..... 54
Figura 18 - Imunomarcação de tunel no fígado..... 55
Figura 19 - Resumo gráfico dos resultados..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas..... 31

Tabela 2 Sequência de *Primers* utilizados no *qPCR*..... 37

Tabela 3 - Comportamento alimentar..... 39

Tabela 4 Gordura corporal..... 41

Tabela 5 - ASC do TOTG e Insulina plasmática 44

Tabela 6 - Resultados do ANOVA de duas vias..... 57

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASC	Área sob a curva do TOTG
ATF-4	Fator 4 ativador da transcrição
ATF-6	Fator 6 ativador da transcrição
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo alimentado com dieta controle
cDNA	DNA complementar
C-L	Grupo alimentado com dieta controle e tratado com Linagliptina
CHOP	proteína homóloga ao C/EBP
CPT1A	carnitina palmitoiltransferase 1a
DHGNA	Doença Hepática gordurosa não alcoolica
DMT2	Diabetes Mellitus do tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
DPP-4i	Inibidor da Dipeptidil peptidase 4
EHNA	Esteato hepatite não alcóolica
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
ERAD	sistema de degradação associado ao RE
FAS	Ácido graxo sintase
GIP	Peptídeo insulinotrópico dependente de glicose
GLP1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
HF	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (*High-fat*)
HF-L	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica (*High-fat*) e tratado com Linagliptina
LDN	Lipogênese *de novo*
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica (*Non-alcoholic fatty liver disease*)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular

PGC1-α	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
SIRT1	Sirtuína 1
SM	Síndrome metabólica
SREBP1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
UPR	Resposta a proteínas mal-dobradas
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	**REVISÃO DE LITERATURA**.....	16
1.1	**Obesidade**.....	16
1.2	**Doença hepática gordurosa não alcoólica**.....	18
1.3	**Patogênese**.....	19
1.4	**Mecanismos moleculares**.....	21
1.5	**Estresse do retículo endoplasmático**	22
1.6	**Inibidores da DPP4**.....	25
1.6.1	Incretinas intestinais e DPP-4.....	25
1.6.2	Linagliptina.....	26
2	**OBJETIVOS**.....	29
2.1	**Objetivo geral**.....	29
2.2	**Objetivos específicos**.....	29
3	**MATERIAIS E MÉTÓDOS**.....	30
3.1	**Animais e dieta**.....	30
3.2	**Comportamento alimentar e Massa Corporal (MC)**.....	32
3.3	**Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**.....	32
3.4	**Eutanásia**.....	33
3.5	**Insulina plásmática e Quicki**.....	33
3.6	**Índice de adiposidade**.....	34
3.7	**Microscopia de luz e estereologia**.....	34
3.7.1	Estrutura.....	34
3.8	**Imunofluorescência**.....	35
3.9	**PCR quantitativo em tempo real**.....	36
3.10	**Análise de dados**.....	38
4	**RESULTADOS**.....	39
4.1	**Comportamento alimentar e Massa Corporal (MC)**.....	39
4.2	**Índice de adiposidade e distribuição de gordura**.....	40
4.3	**Metabolismo de carboidratos**.....	42
4.4	**Histologia do fígado, massa hepática e dosagens**	

bioquímicas..... 45
4.4.1 Massa do fígado..... 45
4.4.2 Esteatose hepática..... 45
4.4.3 Colesterol e triacilglicerol hepático..... 48
4.4.4 Colesterol e triacilglicerol plasmático..... 49
4.5 **Via lipogênica**..... 50
4.6 **Via da beta-oxidação**..... 51
4.7 **Inclusões lipídicas**..... 52
4.8 **Estresse do retículo endoplasmático**..... 53
4.9 **ANOVA de duas vias**..... 55
5 **DISCUSSÃO**..... 58
CONCLUSÃO..... 64
REFERÊNCIAS..... 65
ANEXO A - Comitê de Ética..... 71
ANEXO B - Artigo Submetido 72

INTRODUÇÃO

A obesidade é causada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que pode levar a danos à saúde que culminam na redução da expectativa de vida (Dunham-Snary e Ballinger 2013; Seidell e Halberstadt 2015). O tecido adiposo do indivíduo obeso costuma apresentar altas taxas de lipólise, e o fígado, na impossibilidade de metabolizar a entrada excessiva de ácidos graxos (AG), armazena-o como gotículas (ou inclusões) lipídicas nos hepatócitos, caracterizando a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), o componente hepático da síndrome metabólica (Paniagua, Escandell-Morales et al. 2014; Gustafson, Hedjazifar et al. 2015).

A DHGNA é inicialmente uma condição benigna, mas na presença de aumento do influxo crônico de AG, a inflamação e a resistência à insulina (RI), que também prejudicam a capacidade oxidativa hepática, podem progredir para estágios mais prejudiciais, como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (Brunt, Janney et al., 1999, Festi, Colecchia et al., 2004). Durante a DHGNA, ocorre o estresse do retículo endoplasmático (ERE), caracterizado pela formação e acúmulo de proteínas mal dobradas e desdobradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE), que, por sua vez, produz um desequilíbrio na homeostase celular, gerando um aumento no trabalho do RE, (Yoshida 2007). Com a desregulação do RE, efeitos pró-inflamatórios são produzidos através da ativação da via AT4 / CHOP / GADD45 (Yoshida 2007, Silva-Veiga, Rachid et al., 2018), culminando em morte celular.

Embora não exista um medicamento disponível exclusivamente destinado a tratar a DHGNA, algumas vias são promissoras na tentativa de minimizar suas restrições. Dessa maneira, a ativação da via sirtuína 1 (SIRT1) / coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1a) leva a uma redução expressiva do acúmulo de lipídios ectópicos no fígado devido à inibição da lipogênese *de novo* (LDN) (conversão de carboidrato excessivo em lipídios), que depende da ativação ou repressão de fatores específicos de transcrição (Li, Wong et al. 2014; Salomone, Barbagallo et al. 2017). Entre esses fatores, os efeitos a jusante do SIRT1/PGC1a abrangem a transcrição de genes-chave relacionados à beta-oxidação (como a carnitina palmitoiltransferase 1a - CPT1a). Por outro lado, a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c) é inibida por essa via, inibindo assim os genes relacionados à LDN em resposta à glicose, como a ácido graxo sintase (FAS) (Benhamed, Denechaud et al. 2012; Yang; Li e outros 2014).

Um estudo usando a sitagliptina, um inibidor da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4i), em camundongos alimentados com alto teor de gordura, mostrou esteatose hepática reduzida associada a um pâncreas bem preservado e à predominância de pequenos adipócitos brancos sensíveis à insulina (Souza-Mello, Gregorio et al., 2010). No entanto, as vias relacionadas à remodelação benéfica do fígado continuavam por ser desvendadas. Assim, levantamos a hipótese de que a linagliptina possa estimular a SIRT1 e, portanto, favorecer os genes relacionados à beta-oxidação sobre os genes lipogênicos e mitigar o ERE, melhorando a arquitetura hepática e reduzindo a morte celular devido à excessiva reação das proteínas desdobradas.

O presente estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos do tratamento com a linagliptina no metabolismo energético hepático e no ERE em camundongos C57BL / 6 alimentados com muita gordura.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade

Atualmente, a obesidade apresenta proporções pandêmicas e representa um grave problema de saúde pública por promover o desenvolvimento de doenças crônicas associadas (Seidell e Halberstadt, 2015). É uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, podendo levar a prejuízos na saúde que culminam com a redução da expectativa de vida dos indivíduos (Dunham-Snary e Ballinger, 2013; Seidell e Halberstadt, 2015).

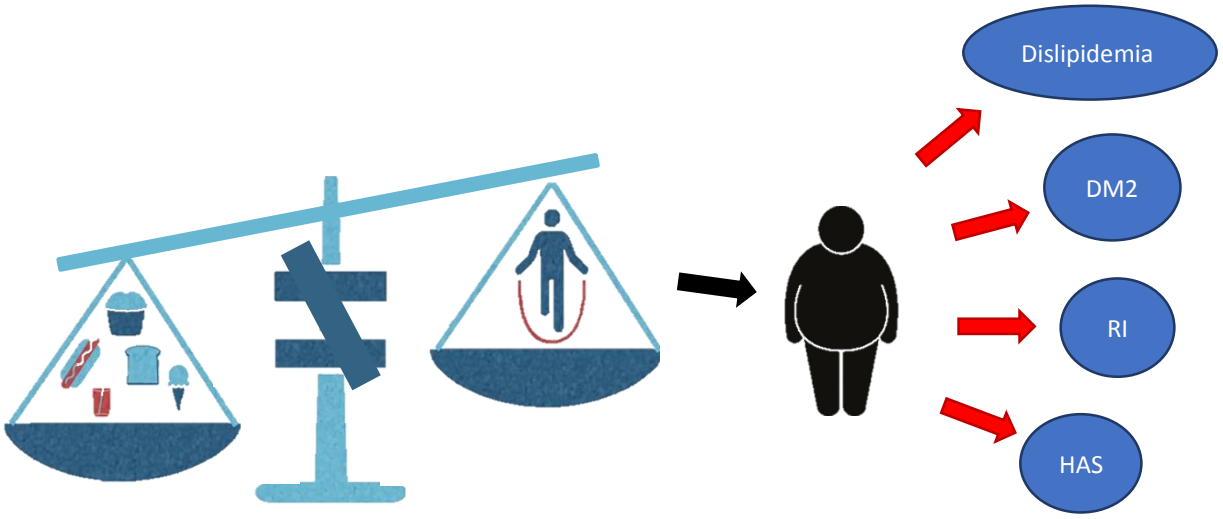
Segundo o Vigitel, o Brasil teve um aumento drástico da prevalência de obesidade na população adulta. O sobrepeso e a obesidade são os principais fatores de risco para Síndrome Metabólica. De acordo com o Ministério da Saúde, na última década ocorreu aumento de 61,8% de casos de diabetes e 14,2% nos casos de hipertensão. Além disso, mais da metade da população está com sobrepeso e 18,9% dos brasileiros são obesos. No entanto, o Ministério da Saúde se comprometeu a desenvolver estratégias para reduzir a taxa de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis em 2% ao ano até 2022 no Brasil (Brasil, 2017).

A obesidade está associada com uma variedade de outros problemas como o aumento do risco de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), DHGNA, RI e aterosclerose. A interação entre essas doenças é denominada de síndrome metabólica (Wree *et al.*, 2011).

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada por um agrupamento de comorbidades, tendo como base a RI, e o diagnóstico é dado quando três ou mais fatores de riscos estiverem presentes numa mesma pessoa. Entretanto, podemos destacar a obesidade como um dos principais componentes para a ocorrência da SM (Ahima 2014). A obesidade está relacionada ao aumento do tamanho e número das células adiposas, aumentando a massa total de tecido adiposo. Essas células adiposas são denominadas adipócitos, que armazenam triacilgliceróis (TAG) provenientes da ingestão alimentar (Ahima 2014).

Devido a um desbalanço energético positivo, com aumento da ingestão alimentar e redução do gasto energético, ocorre o sobrepeso, que irá culminar em um aumento do reservatório do tecido adiposo branco (TAB) (Gustafson *et al.*, 2015; Gustafson e Smith, 2015).

Figura 1 – Obesidade: causas e consequências



Legenda: Esquema representativo do desbalanço energético, desencadeando o acúmulo excessivo de gordura corporal, que, quando associadas, constituem a síndrome metabólica (SM).

Fonte: O autor, 2019.

O tecido adiposo do indivíduo obeso apresenta altas taxas de lipólise, e o fígado, na impossibilidade de metabolizar o excesso de ácidos graxos livres (AGLs) direcionado a ele, armazena o excesso sob a forma de gotículas ou inclusões lipídicas no citoplasma dos hepatócitos, caracterizando a DHGNA, apontada como o componente hepático da síndrome metabólica (Paniagua *et al.*, 2014; Gustafson e Smith, 2015).

1.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica

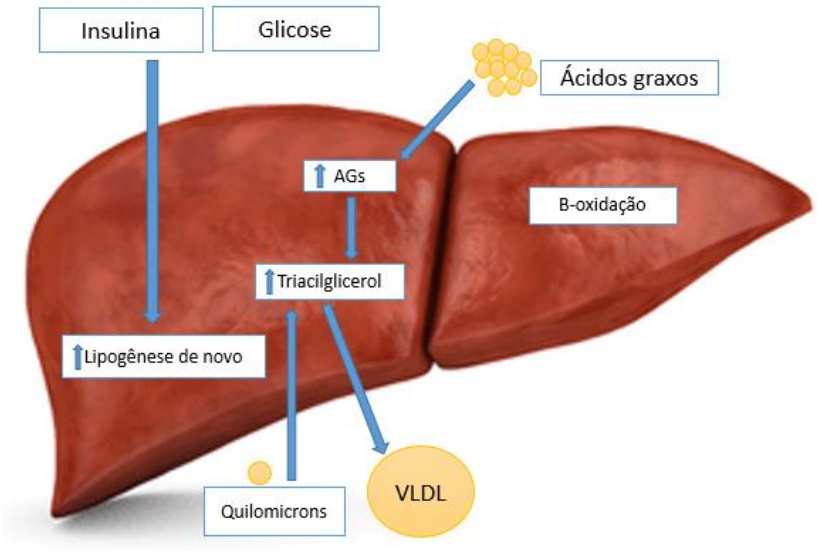
O fígado é um orgão central que atua no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Quando em condições normais, a glicose será absorvida pelo fígado, e por sua vez, convertida em AGLs, levando à síntese de TAG, que é a principal fonte de estoque energético (Koo, 2013).

Após a síntese dos TAGs, os mesmos podem ser armazenados em gotículas lipídicas no interior dos hepatócitos ou secretados no sangue como lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Postic e Girard, 2008). Estudos experimentais realizados demonstraram que a cascata de eventos que levam ao acúmulo exacerbado de TAGs hepáticos está associada a uma elevação da oferta de AGs, provenientes do TAB periférico para o fígado, além de ocorrer uma síntese de lipídios *de novo* por via lipogênica (Lewis *et al.*, 2002).

Os AGs estão envolvidos em muitos eventos celulares importantes. Uma elevação exacerbada dos AGLs gera alteração nas vias metabólicas e indução da RI. Por sua vez, a RI induz o aumento da lipólise no TAB e, com isso, leva a uma elevação nos níveis de AGs. Perturbações em qualquer mecanismo que envolva o metabolismo lipídico podem levar ao desenvolvimento da DHGNA (Auguet *et al.*, 2014).

A DHGNA é um termo utilizado para caracterizar uma gama de alterações hepáticas, que incluem desde uma esteatose simples até EHNA (Wieckowska *et al.*, 2008).

Figura 2 – Metabolismo hepático



Legenda: A caracterização da DHGNA é atribuída ao acúmulo de triacilglicerol no citoplasma dos hepatócitos, como resultado de um desequilíbrio lipídico. Em resumo, o acúmulo de TG no citoplasma dos hepatócitos, como marca registrada da DHGNA, decorre de um desequilíbrio entre a aquisição de lipídios (captação de AG e lipogênese de novo) e remoção (oxidação mitocondrial de AG e exportação como componente das partículas de VLDL).

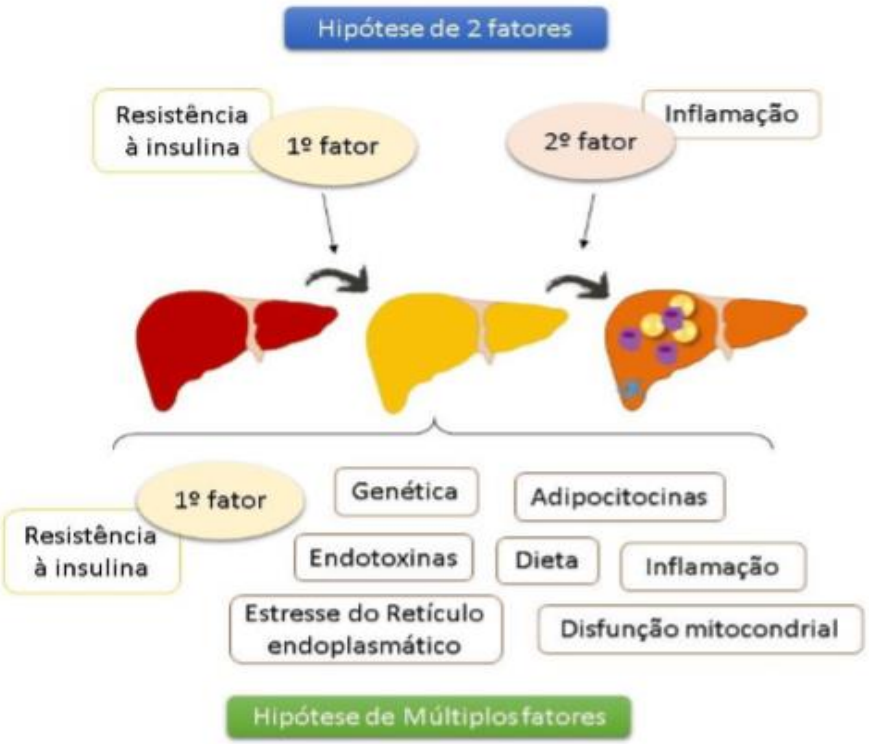
Fonte: Adaptada de Alba Berlanga, 2014

1.3 Patogênese

A patogênese e os mecanismos moleculares que induzem a progressão da DHGNA ainda é pouco compreendida e, inicialmente, foi interpretada pela hipótese de “dois fatores” ou “dois golpes” (em inglês, *two-hit*). O “primeiro fator” ou impacto é representado pelo acúmulo de TAG no fígado, desenvolvendo a esteatose hepática, seguido por um “segundo fator”, o evento em que mediadores pró-inflamatórios levam à inflamação, lesão hepatocelular, e fibrose. Um estudo recente de Fang et al. acrescenta que a RI atua como um “primeiro fator”, que, por sua vez, sensibiliza os hepatócitos (Day e James, 1998; Fang *et al.*, 2018). Com o avanço dos estudos e das tecnologias, estas hipóteses se tornaram imcompletas, quando nos referimos à complexidade da patogênese da DHGNA e suas alterações fisiopatológicas desencadeadas (Day e Saksena, 2002).

No entanto, uma nova hipótese tem sido considerada mais adequada para compreender a patogênese da DHGNA, sendo denominada de hipótese dos “multiplos fatores” (em inglês, *multiple hits*), enfatizando a diversidade de vias que induzem às alterações na arquitetura hepática, bem como alterações em diferentes orgãos e tecidos (Tilg e Moschen, 2010; Su *et al.*, 2018). Os “múltiplos fatores” incluem a RI, adipocinas pró-inflamatórias, fatores dietéticos, ácido graxo livre, lipopolissacarídeos (LPS) derivados da microbiota intestinal e fatores epigenéticos e genéticos (Ratziu *et al.*, 2010; Tilg e Moschen, 2010; Buzzetti *et al.*, 2016).

Figura 3 - Hipóteses dos fatores



Legenda: A hipótese clássica é a hipótese de 2 fatores onde o primeiro fator, a resistência à insulina, era necessário para induzir a esteatose hepática, e para a indução da esteatohepatite era necessário um segundo fator, a inflamação. A hipótese mais recente é de múltiplos fatores, na qual diferentes fatores, incluindo o primeiro fator, convergem na indução das alterações hepáticas.
Fonte: O Autor, 2019.

1.4 Mecanismos moleculares

O influxo de AGLs no fígado pode derivar de três fontes distintas: lipólise, fontes alimentares e LDN. Na lipólise ocorre a hidrólise de TAGs em glicerol e AGs no interior no tecido adiposo. Já a LDN é caracterizada como uma via de conversão de fontes glicídicas para a síntese de AGs (Ameer *et al.*, 2014). Além da ingestão aumentada de lipídios, a LDN também provoca um estado de lipotoxicidade, predispõe à RI e ao desenvolvimento de alterações hepáticas (Magliano *et al.*, 2013; Rachid *et al.*, 2015). A LDN é controlada principalmente por fatores de transcrição ativados no estado pós-prandial, com aumento de glicose e insulina plasmática, sendo este um provável fator hormonal que aumenta e regula a expressão da SREBP1c (Dentin *et al.*, 2004).

A SREBP1c é um membro da família SREBP, sendo um fator chave que controla vários genes envolvidos no metabolismo de lipídios e homeostase de colesterol, levando a um aumento na regulação transcricional de genes lipogênicos (Kim *et al.*, 2009). Já foi identificado o aumento da expressão de SREBP1c em camundongos obesos em estudos prévios (Shimomura *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004; Denechaud *et al.*, 2008).

A beta-oxidação de AGs ocorre nas mitocôndrias para reduzir os AGs em acetil-CoA, sendo fortemente afetado pela RI. Em condições basais, para iniciar este processo, a molécula de acil-CoA de cadeia longa (LC-CoA) é transportada para a membrana mitocondrial interna (MMI) via carnitina palmitoil transferase-1a (CPT1a), onde é beta oxidada (Schreurs *et al.*, 2010; Koo, 2013).

Porém, na presença de concentrações elevadas de glicose e AGLs, a CPT1a é inibida pelo aumento de Malonil-CoA, intermediário na síntese de AGs. Por conseguinte, ocorre aumento da FAS, enzima limitante na biossíntese de AGs e catalisadora do último passo desta via. Quando este processo é inibido, ocorre aumento na concentração de LC-CoA no citoplasma, o que reduz a expressão de genes que podem retardar a beta-oxidação hepática (Peeters *et al.*, 2011; Jensen-Urstad e Semenkovich, 2012).

O estado de equilíbrio dos TAGs hepáticos é também controlado pelo consumo de AGs pela beta-oxidação mitocondrial (Eaton *et al.*, 1996). No estado pós-prandial, a beta-oxidação hepática é suprimida devido ao efeito anti-lipolítico da insulina no tecido adiposo, reduzindo o fluxo de AGLs para o fígado, e também, devido ao controle

direto da glicose e insulina sobre a taxa de entrada de AGs na mitocôndria (Sidossis e Wolfe, 1996).

Um elemento primordial na resposta transcricional hepática ao excesso de lipídios na dieta é a SIRT1, a qual é uma histona deacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) que modula o metabolismo hepático de AGs através da ativação de sensores de nutrientes importantes como PGC1a (Hou *et al.*, 2008; Ponugoti *et al.*, 2010). O PGC1a é expresso em tecidos com alta densidade de mitocôndrias, como fígado, músculo esquelético, coração, cérebro e adiposo marrom (Nakamura *et al.*, 2014).

De forma sucinta, estudos mostram que a ativação da via SIRT1/PGC1a leva à redução expressiva do acúmulo de gordura ectópica hepática e à inibição da LDN (conversão do excesso de carboidratos em lipídios), que ocorre através da ativação ou repressão de fatores de transcrição específicos (Li *et al.*, 2014; Salomone *et al.*, 2017). Dentre os fatores ativados por essa via, o receptor ativado por proliferador de peroxissoma-alfa (PPAR-alfa) atua na transcrição de genes relacionados à beta-oxidação (como a CPT1a), ao passo que dentre os fatores inibidos por essa via, destacam-se a SREBP1c, sendo ativo na transcrição de genes lipogênicos (como a FAS, em resposta à glicose) (Benhamed *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

1.5 – Estresse do retículo endoplasmático

O RE é uma rede membranosa responsável pela síntese, maturação e tráfego de uma grande variedade de proteínas, pela homeostase do cálcio e desenvolve um papel importante no metabolismo de lipídios (Li et al.,2018).

O RE é uma organela citoplasmática responsável pela síntese, maturação, dobramento e locomoção de uma grande variedade de proteínas. Além disso, tem um papel importante no metabolismo de lipídios (Lake *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). A síntese e a concentração de proteínas no RE são extremamente altas, e todas as proteínas secretoras entram na via do RE e devem ser devidamente dobradas com o auxílio de chaperonas moleculares. Somente as proteínas dobradas são transportadas para o Complexo de Golgi (Yoshida, 2007).

As proteínas desdobradas ou mal formadas são retiradas do RE, translocadas ao citoplasma pela maquinaria do sistema de degradação associada ao RE (ERAD) e degradadas pelos proteassomas. Desta forma, é de extrema importância que a homeostase do lúmen do RE seja mantida (Yoshida, 2007; Rasheva e Domingos, 2009).

No entanto, algumas condições fisiológicas, tais como obesidade, RI, DMT2 e lipotoxicidade hepática, podem produzir um desequilíbrio entre a demanda celular, o dobramento das proteínas e a capacidade do RE para promover a maturação dessas proteínas (Tabas, 2010).

Quando as células sintetizam proteínas secretoras em quantidades que excedem a capacidade do dobramento e da maquinaria do ERAD, as proteínas desdobradas são acumuladas no RE. Essa condição é denominada ERE (Yoshida, 2007; Hotamisligil, 2010).

Estudos mostraram que a RI é um potente indutor para o ERE. A hiperinsulinemia promove ERE, os quais podem desencadear a apoptose (Tabas, 2010). A obesidade e uma dieta rica em lipídios podem desencadear uma resposta adaptativa conhecida como *Unfolded Protein Response,* ou resposta a proteínas mal-dobradas (UPR). O objetivo da ativação da UPR é reestabelecer a homeostase do RE em resposta a uma grande quantidade de proteínas imaturas no RE e se caracteriza por: atenuar a taxa de tradução, aumentar a expressão de chaperonas e ativar o ERAD. Em conjunto, reduzem o risco de erros na montagem das proteínas (Umut Özcan; Qiong Cao, 2004; Rasheva e Domingos, 2009).

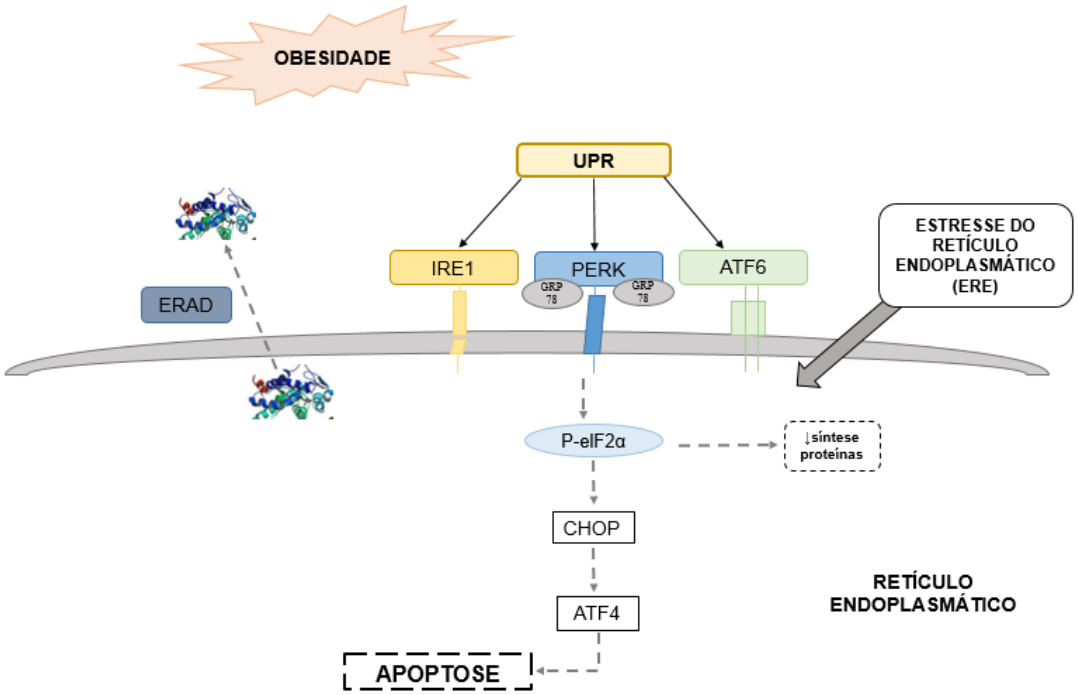
Quando uma célula produz um excesso de proteínas desdobradas durante o ERE, a UPR é ativada e alivia o estresse dessa organela através dos três processos a seguir: (a) diminuindo a carga biossintética da via secretora, reduzindo a entrada de proteínas recém-sintetizadas no RE via regulação negativa da tradução de proteínas; (b) reforçar a capacidade de dobramento de proteínas e potencial de secreção do RE pela regulação positiva de genes que codificam a expressão de chaperonas e foldases do RE; e (c) promover a degradação de proteínas mal dobradas ou não dobradas através do ERAD (Schroder e Kaufman, 2005).

Do ponto de vista mecanicista, uma das via de ativação da UPR pode ser gerada através da ativação do ATF4 (fator 4 ativador da transcrição), que por sua vez induz a expressão de genes envolvidos na apoptose, como a CHOP (proteína homóloga ao C/EBP) (Ma et al., 2002). Esta última retém o ciclo celular, o que resultará

na morte celular com o objetivo de proteger as células dos efeitos tóxicos desencadeados pela ação das proteínas desdobradas (Galligan et al., 2012).

A ativação da CHOP pode resultar das diferentes vias de ativação da UPR, entretanto, a ativação pelo ATF4 é considerado o principal indutor (Shore et al., 2011). Em conjunto as 3 vias atenuam o estresse do RE pela redução da síntese de proteínas, facilitando a degradação de proteínas e aumentando a produção de chaperonas que ajudam as proteínas no lúmen do RE a dobrarem. O resultado esperado é a resolução do ERE, e caso não resolva, a célula estará comprometida funcionalmente e pode sofrer apoptose (Hotamisligil, 2010).

Figura 4 – Esquema representativo da ativação do ERE



Legenda: Mecanismo de ativação da via do ERE ativado por obesidade podendo culminar em apoptose. Todos os 3 ramos da UPR podem induzir apoptose. Abreviações: ATF4 – fator de transcrição ativado 4; ATF6 – fator de transcrição ativado 6; CHOP – proteína homóloga C/EBP; eIF2α – subunidade alfa do fator de iniciação de tradução eucariótica 2); ERAD – maquinaria de degradação associada ao retículo endoplasmático; IRE1 – enzima 1 dependente de inositol; UPR – resposta à proteínas desdobradas; PERK – quinase reticular endoplasmática semelhante à proteína quinase.

Fonte: O autor, 2019.

1.6 Inibidores da DPP-4

1.6.1 Incretinas intestinais e DPP-4

O termo incretina foi registrado por Starling no início de 1900 para significar um hormônio intestinal que estimula a secreção interna do pâncreas (Moore, 1906). Esse conceito foi desenvolvido por La Barre e Still e Heller na década de 1930, quando mostraram que a administração de extratos intestinais em animais experimentais resultava na redução da glicose circulante (Ahren, 2019). 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 o GIP (peptídeo insulinotrópico dependente de glicose) e o 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).

Além do desenvolvimento de vários inibidores eficientes de DPP-4 e a demonstração de que eles têm propriedades redutoras de glicose, um fator importante por trás do conceito de inibição de DPP-4 foi que ele visa os processos fisiopatológicos básicos no DMT2. Esse conceito evoluiu durante as décadas de 1990 e 2000, quando estudos mecanísticos foram realizados paralelamente ao caminho da inibição do DPP-4 para uso em estudos clínicos. Demonstrou-se que os inibidores de DPP-4 impedem a inativação de GLP-1 e GIP, resultando em um estímulo da secreção de insulina e na inibição da secreção de glucagon de maneira dependente da glicose. Em particular, a estimulação da função das células beta e a inibição da secreção de glucagon foram importantes, uma vez que a secreção insuficiente de insulina e a hipersecreção de glucagon estavam naquele momento emergindo como os principais defeitos subjacentes ao DMT2. Também foi demonstrado que a disfunção das ilhotas já existia antes do início do DMT2 em indivíduos com tolerância à glicose diminuída, ou seja,

com risco de desenvolver diabetes. Esses achados sugeriram que a inibição da DPP-4 visa as causas precoces do início do DMT2, e surgiu o conceito de que o tratamento pode ser usado como terapia precoce durante o desenvolvimento do diabetes. Essa ideia iniciou, por sua vez, vários estudos com diferentes inibidores de DPP-4 em pacientes que não usavam drogas e em pacientes tratados com metformina, ou seja, pacientes no estágio inicial da doença (Ahren, 2019).

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 DMT2, visto que possibilita um maior tempo de sinalização pancreática para liberação de insulina pós-prandial (Lamers et al., 2011; Sell et al., 2013). 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).

1.6.2 Linaglitina

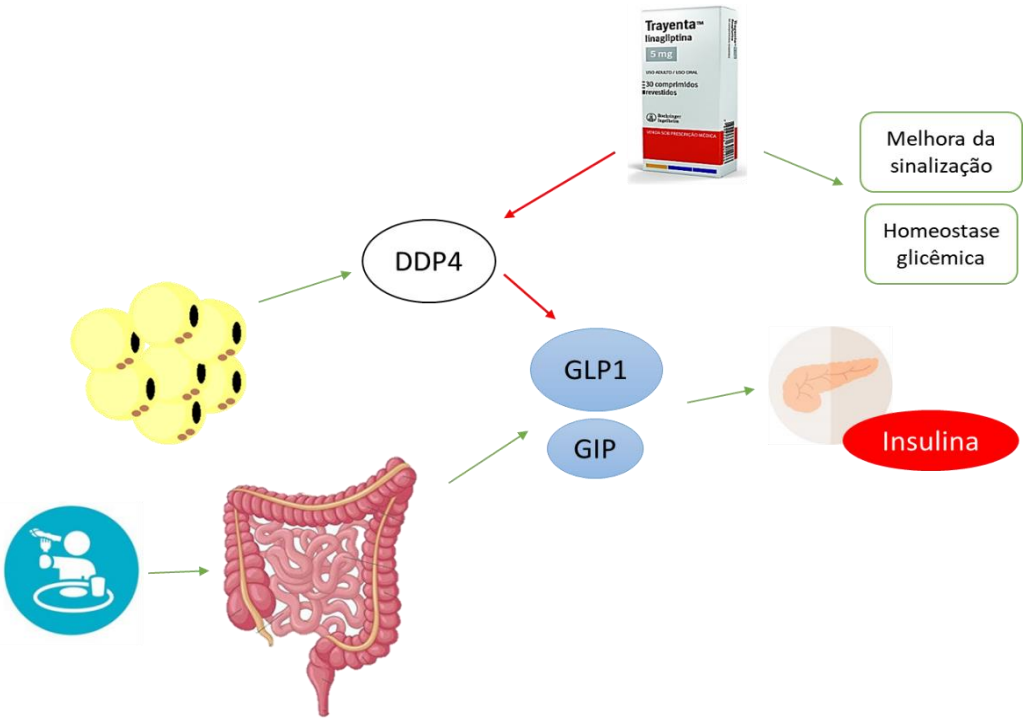
A linagliptina é um potente inibidor da DPP-4 e tem como efeito principal aumentar o tempo de ação das incretinas, hormônios produzidos pelo intestino após a ingestão alimentar. Faz parte de uma classe de agentes orais anti-diabéticos (Bahirat *et al.*, 2018). É excretada majoritariamente por via enterohepática, 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, e glicemia de jejum e pós-prandial em pacientes portadores de DMT2 (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 e 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 à redução da RI, redução da esteatose hepática e polarização de macrófagos do tipo M2, os quais favorecem secreção de adipocinas antiinflamatórias como 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). Um estudo comparativo em 2018 , avaliou a segurança da utilização das gliptinas, mostrado que os inibidores da DDP-4, por ser glicose dependente, apresentam menor risco de causar hipoglicemia grave. A capacidade de melhorar o controle glicêmico sem o aumento da hipoglicemia é particularmente relevante para pacientes com DM2, como idosos ou pacientes com insuficiência renal ou disfunção hepática.{Scheen, 2018 #3011}.

Figura 5 – Incretinas intestinais e linagliptina



Legenda: Esquema representativo da produção e ação das incretinas intestinais após inibição da DPP-4. Abreviações: Dipeptidil peptidase 4 (DPP-4); Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) e Peptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP).Fonte: O autor, 2019

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da linagliptina sobre o metabolismo energético hepático (carboidratos e lipídios) e o ERE hepático num modelo experimental de obesidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Induzir o sobrepeso a partir do consumo crônico de dieta hiperlipídica por camundongos C57BL/6;
- Avaliar os efeitos do tratamento com linagliptina sobre a tolerância oral à glicose, lipídios plasmáticos e insulinemia;
- Estudar os efeitos do tratamento com linagliptina sobre a densidade de volume de esteatose hepática;
- Determinar a expressão gênica de fatores influenciados pela via SIRT1/PGC1-alfa implicados na beta-oxidação, lipogênese *de novo*, gliconeogênese, e estresse do retículo endoplasmátoco
- Utilizar a microscopia confocal a fim de verificar os efeitos da linagliptina sobre a estabilidade da gotícula lipídica, apoptose e regeneração hepática.

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), sob condições controladas de temperatura (21±2ºC), umidade (60±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.

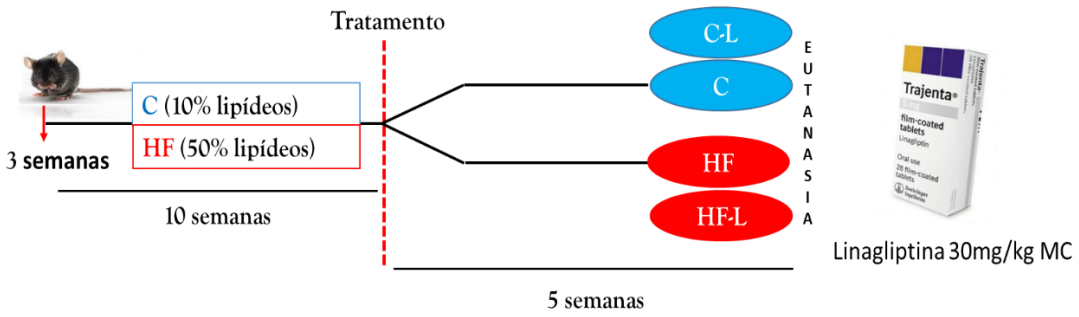
O fármaco foi adicionado às dietas na dose de 30mg/Kg de massa corporal (MC), (Kern et al., 2012) sob a forma comercial da linagliptina no mercado brasileiro (Trayenta® - Linagliptina 5mg, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemanha). As dietas seguiram os padrões recomendados pela AIN-93M para roedores (Reeves et al., 1993) e foram manipuladas por empresa especializada (PragSoluções, Jaú, São Paulo), as composições dietéticas estão na tabela 1. O tempo total de duração do protocolo experimental foi de 15 semanas, e segue ilustrado na Figura 6. 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).

Tabela 1 - Composição das dietas

	Dieta	
Ingredientes (g/kg)	**C**	**HF**
Caseína (>85%proteína)	140	175
Amido de milho	466	193
Amido dextrinizado	155	155
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	238
Fibra	50	50
Mix Vitaminas	10	10
Mix Minerais	35	35
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Energia (kcal/kg)	3800	5000
Carboidrato (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lipídios (%)	10	50

Figura 6 – 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: O autor, 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 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 intraperiotoneal 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 (3.500 rpm, por 15 minutos) e congelamento (-80°C) para futuras análises bioquímicas.

3.5 Insulina plasmática e QUICKI

O plasma sanguíneo estocado sob congelamento (-20°C) 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 plasmática do hormônio. Para o cálculo do QUICKI (índice quantitativo de sensibilidade à insulina), foi utilizada a fórmula, $QUICKI$ = 1 [log $f()$ ($I0/$) + $log(G0)$], onde I0 é a insulina em jejum (µU/mL), e G0 é a glicemia em jejum (mg/dL) (Katz et al., 2000).

3.6 Índice de Adiposidade

Após a eutanásia dos animais, as gordura inguinal, epididimária e retroperitoneal foram cuidadosamente dissecadas e pesadas. Foi considerado o compartimento adiposo inguinal, localizado entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa, a gordura retroperitoneal conectada à parede abdominal posterior próxima aos rins e a porção abdominal dos ureteres, e a gordura epididimária localizada na parte inferior do abdômen e conectada ao epidídimo. O cálculo do índice de adiposidade foi determinado como a razão entre a soma das massas dos tecidos adiposos dividida pela massa corporal total, apresentada em porcentagem.

3.7 Microscopia de Luz e Estereologia

3.7.1 Estrutura

Após a dissecação, o fígado foi pesado e depois cortado em vários fragmentos. Algumas amostras de fígado foram preservadas em fixador recém-preparado (formaldeído a 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) por 48 h em temperatura ambiente. Outras amostras foram congeladas a -20 °C ou -80 °C para análises moleculares. Os fragmentos fixados foram incorporados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), seccionados com uma espessura nominal de cinco micrômetros, processados e corados com hematoxilina e eosina ou seguidos de imuno-histoquímica, conforme detalhado posteriormente. As imagens digitais foram capturadas com um microscópio BX51 (Olympus Co., Tóquio, Japão) e uma câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co., Ottawa, Canadá). A densidade de volume da esteatose no fígado (Vv [esteatose, fígado]) foi avaliada por contagem de pontos em pelo menos dez campos aleatórios por animal, como descrito anteriormente (Aguila, Pinheiro Ada et al. 2003). Resumidamente, uma grade com 36 pontos de teste foi sobreposta em

imagens microscópicas digitais do fígado com o auxílio do software Stepanizer (Tschanz, Burri et al. 2011). O Vv [esteatose hepática] foi obtido como a razão entre os pontos que atingem as gotículas de gordura (Pp [esteatose hepática]) e os pontos totais do sistema (PT): Vv [esteatose hepática] = Pp [esteatose hepática] / PT. (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Este método mostrou-se mais consistente na avaliação da esteatose hepática do que o uso de escores (Catta-Preta, Mendonca et al. 2011). Da mesma forma, pelo método de contagem de pontos e também utilizando a grade de 36 pontos do programa Stepanizer, foi estimada a densidade de volume de sinusoides hepáticos.

3.8 Imunofluorescência

Para imunofluorescência, as seções foram diafanizadas, hidratadas e a recuperação antigênica foi realizada, etapa que foi seguida pelo bloqueio de ligações inespecíficas. As secções hepáticas foram incubadas com anti-PLIN2 (CSB-PA920084, Cusabio, diluição 1:50), anti-PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular, sc-7907, Santa Cruz, diluição 1: 100) e anti-VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial,sc-6251, Santa Cruz, diluição 1:50) durante a noite a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo: IgG-Alexa 488 anti-coelho e IgG-Alexa 546 anti-coelho (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Para a marcação nuclear, foi utilizado o corante intercalar de ácido nucléico DAPI. As lâminas foram montadas com *Slow Fade Antifade* (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA).

O teste TUNEL foi realizado para avaliar a apoptose utilizando a desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) para detecção de células positivas com o Kit de Detecção de Apoptose ApopTag Plus Fluoresceína In Situ (S7111; Millipore - EUA). Todos os procedimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante. As imagens de imunofluorescência foram obtidas por microscopia confocal (Nikon Confocal Laser Scanning Microscope, modelo C2, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

3.9 PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*)

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa em tempo real (*qPCR*) para avaliar a expressão de RNAm dos genes relacionados ao metabolismo energético e ERE no fígado 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 µg de RNA e DNAse I (Invitrogen). O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado utilizando oligonucleótideos Oligo (dT) para RNAm e transcriptase-reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O qPCR 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 por 10s e 60° C por 15s, seguido de uma curva de fusão (60 a 95° C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa do RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 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* senso e anti-sensosentido utilizadas para amplificação estão descritas na Tabela 2 .

Tabela 2 - Sequência de *Primers* utilizados no *qPCR*

	Primers	
Gene	**5'- 3'**	**3'-5'**
CPT-1ª	GCAGAGCACGGCAAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
FAZ	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
SREBP-1c	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
ATF4	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
CHOP	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
GADD45	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTCGTCACCAGCACACAGT
PLIN2	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
SIRT-1	CCTGACTTCAGATCAAGAGACGGTA	CTGATTAAAAATGTCTCCACGAACAG
PGC1a	GTCAACAGCAAAAGCCACAA	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT
Beta-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

Abreviações: carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT-1a), ácido graxo sintase (FAS), proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c), fator 4 ativador da transcrição (ATF4) e proteína homóloga ao C/EBP (CHOP), coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1a), Receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR), Perilipina 2 (PLIN2), gene para parar o crescimento de danos do DNA 45 (GADD45), Sirtuína 1 (SIRT1).

3.10 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 e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane (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.

4. RESULTADOS

4.1 Comportamento alimentar e Massa corporal (MC)

Os animais iniciaram o experimento sem diferença entre os grupos quanto à ingestão alimentar (g), o que foi mantido durante todo o experimento. No entanto, o consumo de energia foi maior nos grupos HF e HF-L em comparação ao grupo C e C-L (+ 39% para os dois grupos *P*<0,0001, tabela 3).

O aumento no consumo de energia refletiu na massa corporal dos animais. A MC não foi diferente entre os grupos no início do estudo (Figura 7). Entretanto, após a segunda semana de consumo de suas respectivas dietas, houve um aumento significativo no MC no grupo com HF comparado ao C (+ 6%, *P*<0,0001); essa diferença durou até a 15ª semana (+ 16%, *P*=0,0049). Além disso, o grupo HF-L mostrou MC diminuída em comparação com HF (- 8%, *P*=0,0054), o que foi constante até o final do estudo. No entanto, o grupo HF-L apresentou MC elevada em comparação ao C-L (8%, *P*<0,0001), constante até o final do estudo.

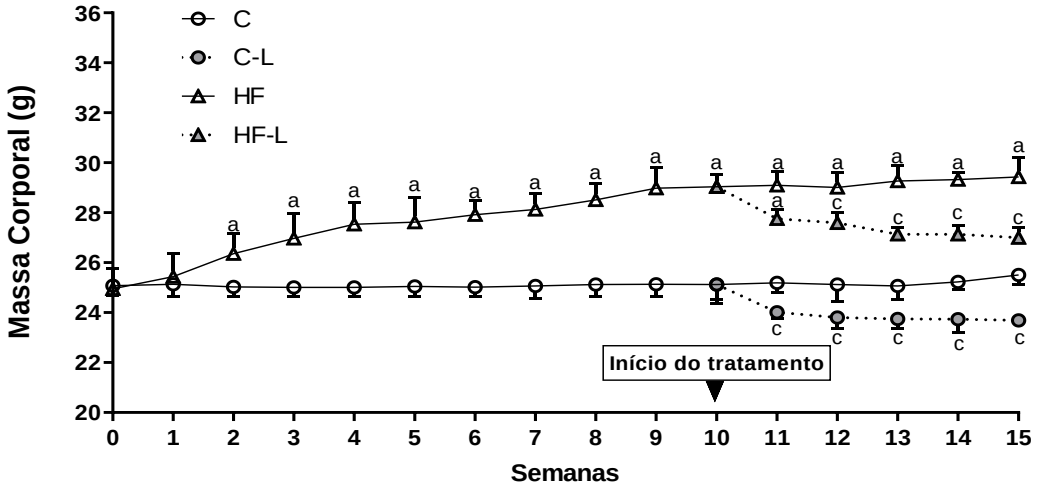
Como não houve diferença estatística significativa entre as ingestões alimentares das rações, em gramatura, entre todos os grupos experimentais, é possível dizer que as alterações na MC tenham sido influenciadas diretamente pela ingestão da droga, como mostra tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 – Comportamento alimentar

DADOS	C	C-L	HF	HF-L
Ingestão energética (KJ/dia/animal)	37,66±0,13	37,72±0.09	52,27±0,17[a.b]	52,33±0,0[a.b]
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2.51±0.01	2,51±0,01	2,50±0,01	2,50±0,01

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 e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat com linagliptina (HF-L).*

Figura 7: Gráfico de evolução da massa corporal



Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=20 até a 10ª semana e n=10 após início do tratamento. Diferenças significativas (*P*<0,05) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.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

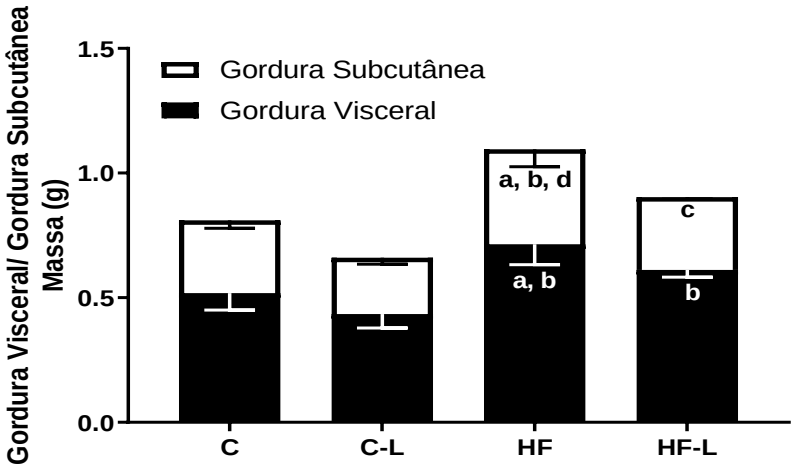
O índice de adiposidade mostrou que o grupo HF teve um aumento significativo no percentual de gordura quando comparado a todos os grupos (+33%, +31% e +37% em relação aos grupos HF-L, C e C-L, respectivamente; *P*<0,05; Tabela 4).

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 8 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 8 e Tabela 4).

Figura 8 – Distribuição de tecido adiposo branco



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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane.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 ± 0,270	3,297 ± 0,495	4,528 ± 0,809 [a, b]	3,403 ± 0,144 [c]
Gordura intra-abdominal (g)	0,518 ± 0,068	0,434 ± 0,056	0,714 ± 0,082 [a,b]	0,611 ± 0,029 [b]
Gordura subcutânea TABs (g)	0,293 ± 0,033	0,226 ± 0,026	0,381 ± 0,070 [a,b]	0,293 ± 0,008 [c]

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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 deTamhane.Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF); *High-fat* com Linagliptina (HF-L) e Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

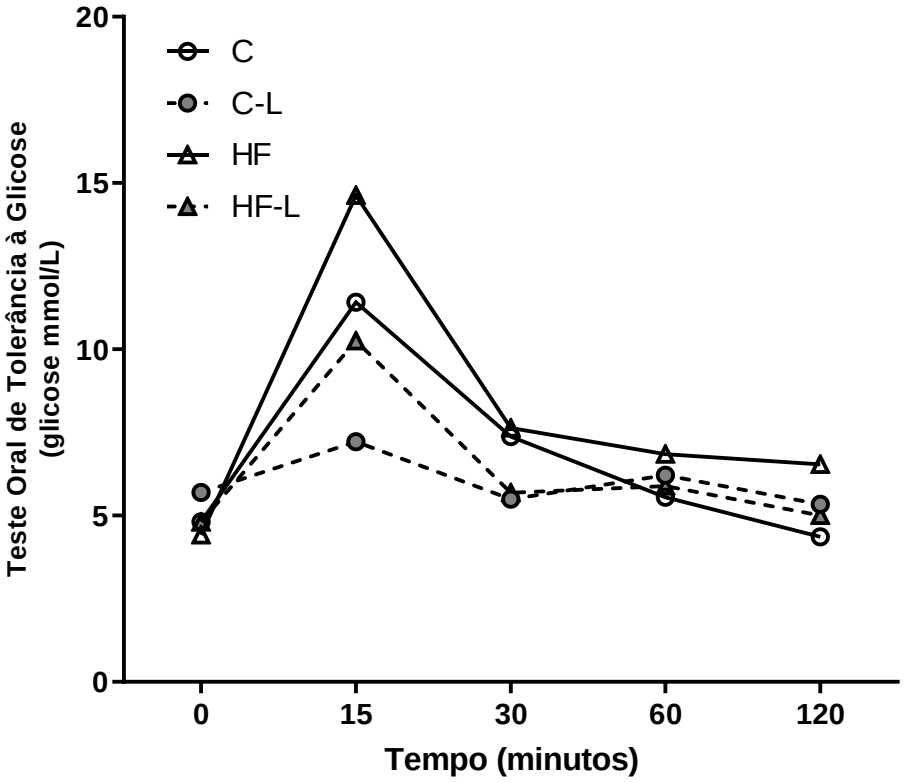
4.3. Metabolismo de carboidratos

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 5) 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 5).

Os animais alimentados com a dieta HF apresentaram QUICKI reduzido em comparação ao grupo C (-9%, $P=0,0368$). A administração de linagliptina aumentou a sensibilidade à insulina, avaliada aqui através do QUICKI, no grupo HF-L em comparação ao grupo HF (+ 9%, $P=0,0245$).

Figura 9 – Curva glicêmica do TOTG na fase de tratamento



Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5 por grupo. 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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); *High-fat* (HF) e *High-fat* com Linagliptina(HF-L).

Tabela 5 – 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 [a,b]	732,600 ± 67,220 [c]
Insulina plasmática (pg/mL)	1.409 ± 290,5	1.155 ± 243,4	2.210 ± 395,1 [a,b]	1.922 ± 464,3 [b]
QUICKI	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.2530 ± 0.01[a,b]	0.2768 ± 0.01[c]

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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. 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).

4.4 Histologia do fígado, massa hepática e dosagens bioquímicas

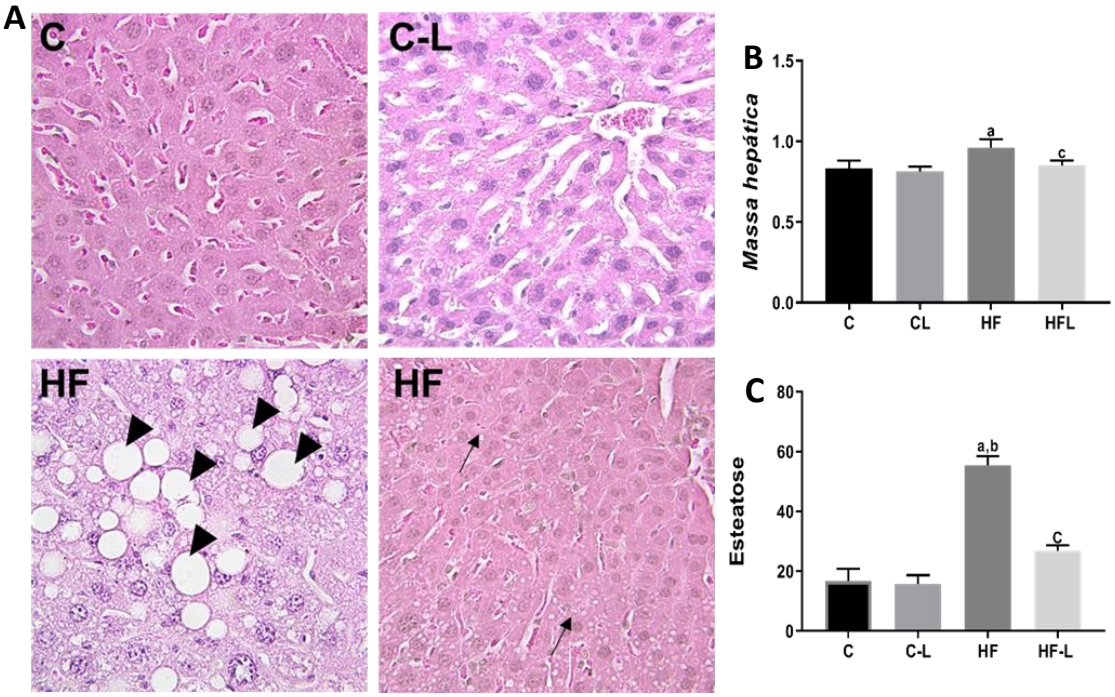
4.4.1 Massa do fígado

A massa hepática foi maior no grupo HF do que no grupo C (+16%, *P* 0,0241). Esta condição foi resgatada pelo tratamento no grupo HF-L, pois esses animais apresentaram menor massa hepática quando comparados ao grupo HF (-12%, *P*=0,0346) como mostra na figura 10B. Provavelmente estes resultados estão associados à deposição de vesículas de gordura no tecido hepático, como observado nas fotomicrografias do grupo HF. Pelo contrário, as fotomicrografias do grupo HF-L são semelhantes às do grupo C, exibindo parênquima hepático mais preservado e com pequena quantidade de gotículas de gordura (Figura 10A).

4.4.2 Esteatose hepática

O grupo HF apresentou acúmulo de lipídios nos hepatócitos com maior percentual de esteatose em comparação ao grupo C (+ 230%, P <0,0001). O grupo HF-L mostrou uma redução da esteatose em 52% em comparação ao grupo HF (*P* <0,0001), mas o grupo HF-L ainda apresentou maior percentual de esteatose em relação ao grupo C-L (+71%, *P*=0,0015, Figura 10C).

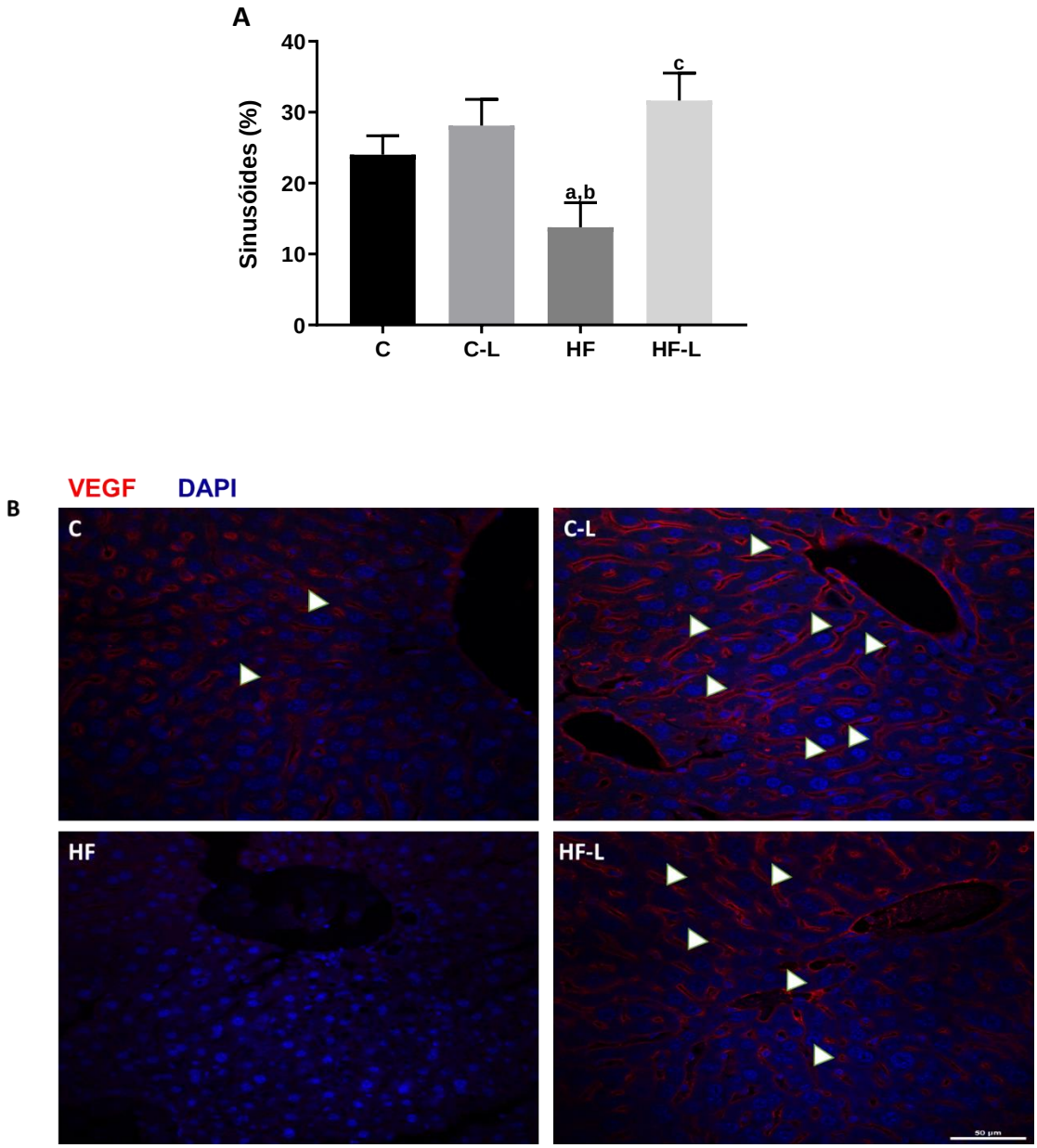
Figura 10 – Fotomicrografia, massa hepática e esteatose



Legenda: A - Fotomicrografias do fígado coradas com hematoxilina-eosina. Fotos de mesmo aumento e representativas dos grupos experimentais. Barra de calibração = 50 µm; mesma ampliação para todas as imagens (40x). B e C - 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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

Corroborando com esses achados, foi observada uma redução de sinusóides no grupo HF em comparação ao grupo C (-43%, P = 0,0091), confirmando uma menor irrigação e metabolismo no tecido hepático. Após o tratamento, o grupo HF-L mostrou um aumento dos sinusóides em comparação ao grupo HF (+ 130%, P = 0,0004), melhorando a irrigação do tecido. Estes resultados estão ilustrados na figura 11.

Figura 11 – Irrigação hepática



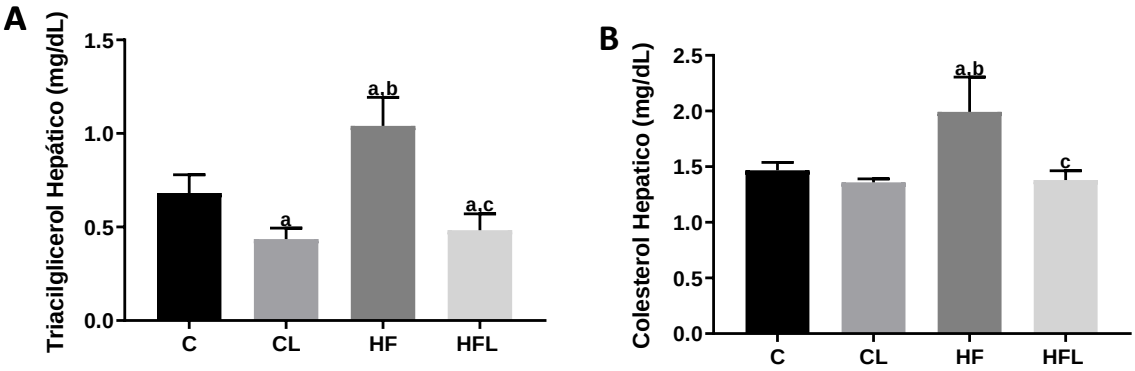
Legenda: A:Densidade de volume de sinusóides hepáticos. Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Diferenças significativas (*P*<0,05) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

B- Imunomarcação para a proteína VEGF, marcador de endotélio vascular (vermelho), na qual houve uma menor marcação no grupo HF comparado ao grupo C, além do grupo HF-L apresentar maior marcação comparado ao HF. Entre os grupos C-L e C não houve diferença. DAPI foi utilizado como marcador de núcleo (azul). Abreviações: Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L). Mesma ampliação para todas as imagens 500x, barra de calibração de 50µm.

4.4.3 Colesterol e triacilglicerol hepático

De acordo com a massa hepática, os níveis de colesterol hepático e o triacilglicerol hepático tiveram comportamento semelhante no estudo. Ambos apresentaram elevação no grupo HF em comparação ao grupo C (+36% para colesterol, *P*=0,0492; +53% para triacilglicerol *P*=0,0067), e o tratamento com linagliptina reduziu a concentração hepática de ambos no grupo HF-L em comparação ao grupo HF (-31% para colesterol, *P*=0,0239; -54% para triacilglicerol, *P*=0,0004). Além disso, o grupo C-L mostrou redução hepática do triacilglicerol em comparação com o grupo C (-39%, *P*=0,0039) figura 12.

Figura 12 – Bioquímica hepática

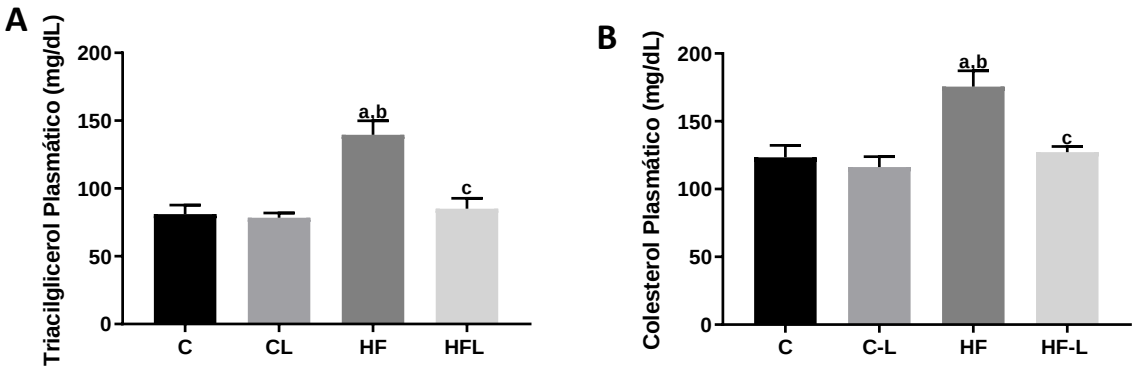


Legenda: A- Triacilglicerol hepático e em B- Colesterol hepático. Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

4.4.4 Colesterol e triacilglicerol plasmático

Em relação aos níveis de colesterol e triacilglicerol plasmático, a dieta rica em lipídios elevou significativamente seus níveis no grupo HF quando comparado ao grupo C (+42% para colesterol, *P*<0,0001; +72% para triacilglicerol *P*<0,0001). No entanto, a linagliptina diminuiu eficientemente os níveis dos lipídios plasmáticos no grupo HF-L em comparação com a sua contraparte (-27%, *P*= 0,0004; -29%, <0,0001, respectivamente, conforme a Figura 13).

Figura 13 – Bioquímica plasmática



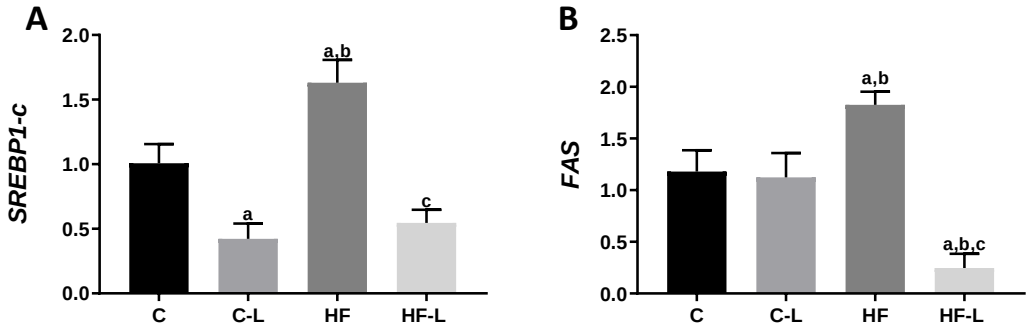
Legenda: A- Triacilglicerol plasmático e em B- Colesterol plasmático. Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos estão indicadas com os símbolos: a ≠ C; b≠ C-L; c ≠ HF, conforme determinado pelo One-way ANOVA e teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

4.5 Via lipogênica

Entre os genes relacionados à lipogênese, o gene *Srebp1c* foi mais expresso no grupo HF do que no grupo C (+62%, *P*=0,0008, Figura 14A). O tratamento atenuou a expressão de *Srebp1c* nos grupos C-L (-58%, *P*=0,0007) e HF-L (-25%, *P*<0,0001) em comparação aos seus pares, Figura 14A.

A expressão do gene *Fas* foi maior no grupo HF do que no grupo C (+55%, *P*=0,0043, Figura 3B). A linagliptina reduziu acentuadamente a expressão de *Fas* no grupo HF-L quando comparado ao grupo HF (-87%, *P*<0,0001) e mesmo ao grupo C-L (-78%, *P*=0,0003), Figura 14B.

Figura 14 – Expressão gênica da via lipogênica.



Legenda: Valores representados como Média ± Desvio Padrão, n=5. Os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. 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 teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

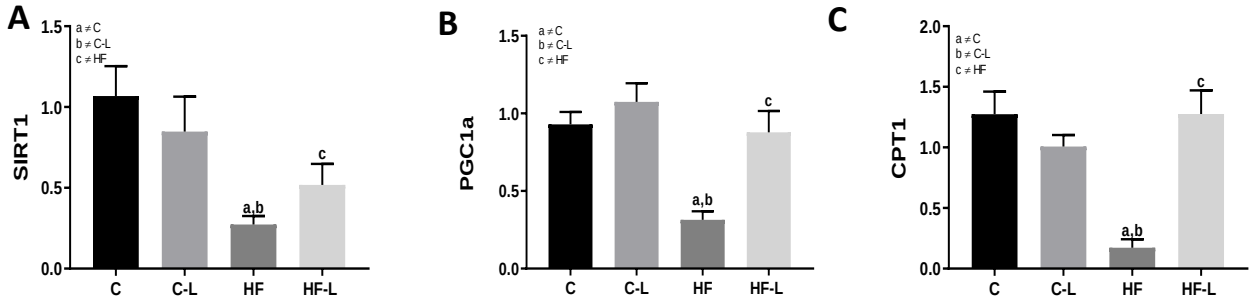
4.6. Via da Beta-oxidação

A expressão do gene *Sirt1* mostrou uma diminuição significativa no grupo HF em comparação com o grupo C (-74%, *P*=0,0024, Figura 15A). A administração de linagliptina melhorou os níveis do gene *Sirt1* no grupo HF-L em comparação com o grupo HF (+ 90%, *P*=0,0248, Figura 15A).

A expressão do gene *Pgc1a* mostrou uma diminuição significativa no grupo HF em comparação com o grupo C (-66%, *P*<0,0001, Figura 3D). Pelo contrário, o grupo C-L teve um aumento expressivo em comparação com o grupo C (+180%, *P*=0,0003, Figura 15B).

Os níveis do gene *Cpt1a* foram mais baixos no grupo HF do que no grupo C (-86%, *P*=0,0004, Figura 15C). O tratamento restaurou a *Cpt1a* no grupo HF-L, que não mostrou diferença com o grupo C e aumentou a expressão de *Cpt1a* quando comparado ao grupo HF (+641%, *P*<0,0001, Figura 15C).

Figura 15 - Expressão gênica da via da β-oxidação.

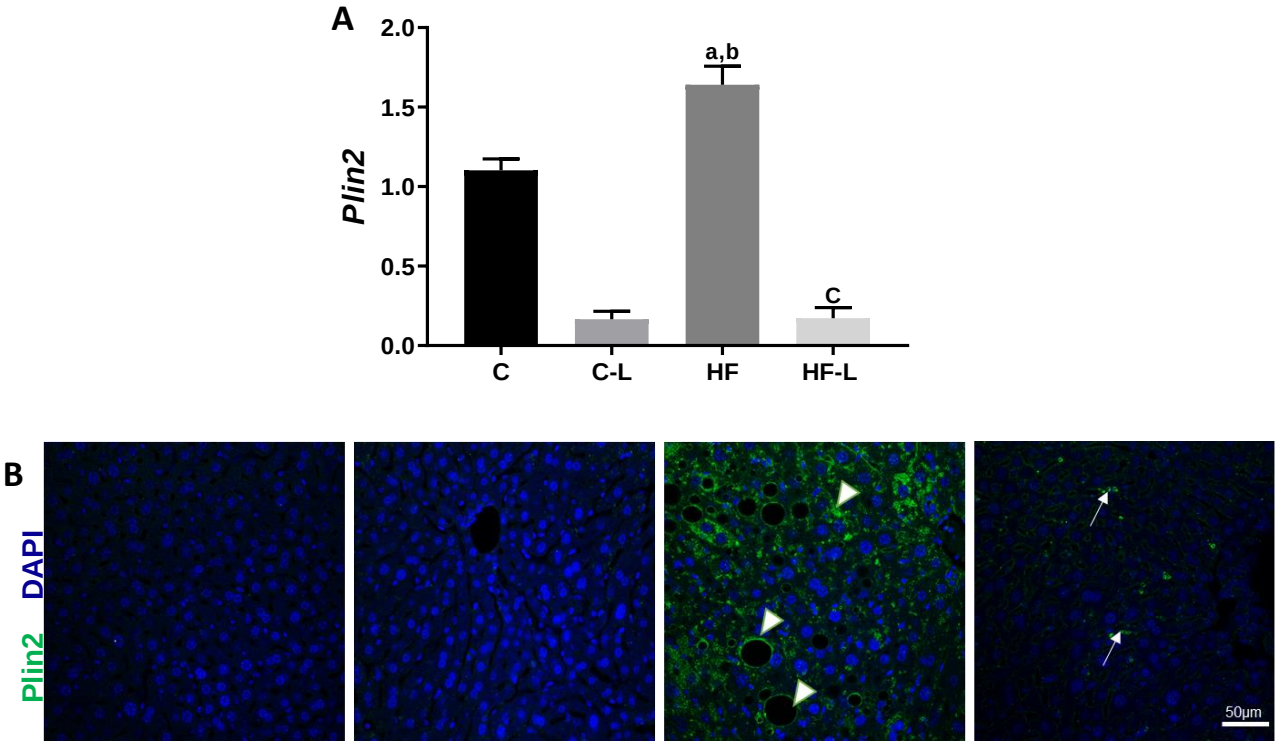


Legenda: Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média, n = 5 por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras (P <0,05): a ≠ C; b ≠ C-L; c ≠ HF e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

4.7 – Inclusões lipídicas

A expressão gênica da proteína associada a gotículas lipídicas ou perilipina *Plin2* no grupo HF foi maior do que o grupo C (+49%, *P*<0,0001). Por outro lado, o grupo HF-L mostrou menor expressão em comparação a sua contraparte (-89%, *P*<0,0001). O medicamento ainda foi capaz de promover uma diferença significativa entre os grupos C-L e C (-84,98%, *P*<0,0001), figura 16A. Além disso, visualizando a imunofluorescência, a proteína PLIN2 apresentou marcação mais evidente no grupo HF do que no grupo C, e houve uma marcação reduzida no grupo HF-L comparado ao grupo HF, corroborando com os dados da expressão gênica. As fotomicrografias estão apresentadas na figur

Figura 16 – Expressão gênica e imunomarcação para Plin2



Legenda: A- Expressão gênica de *Plin2*. Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média, n = 5 por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras (P <0,05): a ≠ C; b ≠ C-L; c ≠ HF e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

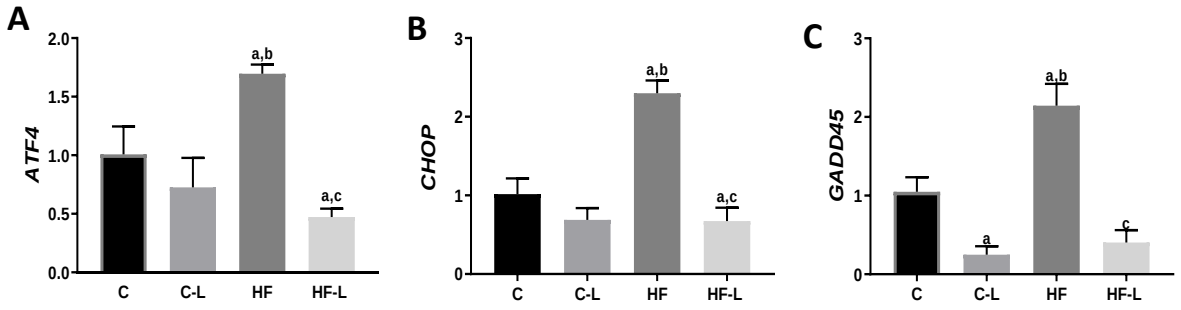
B- Imunomarcação para a proteína PLIN2, marcador de gotícula lipídica no fígado (verde), na qual houve uma maior marcação no grupo HF comparado ao grupo C, além do grupo HF-L apresentar menor marcação comparado ao HF. Entre os grupos C-L e C não houve diferença. DAPI foi utilizado como marcador de núcleo (azul). Abreviações: Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L). Mesma ampliação para todas as imagens 500x, barra de calibração de 50µm.

4.8 Estresse do retículo endoplasmático

O gene *Atf4* foi mais expresso no grupo HF do que no grupo C (+68%, *P*=0,0117, Figura 17A). O tratamento foi eficiente na redução do *Atf4* em 72% no grupo HF-L em comparação com o seu homólogo (*P*<0,0001, Figura 17A). Da mesma forma, a expressão dos genes *Chop* e *Gadd45* foi maior no grupo HF do que no grupo C

(+126% para *Chop*, *P*<0,0001, Figura 17B; +104% para *Gadd45*, *P*=0,0002, Figura 17C). A administração de linagliptina reduziu esses marcadores de ERE no grupo HF-L em comparação com o grupo HF (-71% para *Chop*, Figura 17B; -81% para Gadd45, figura 17C, ambos *P*<0,0001). Além disso, o grupo C-L mostrou menor expressão do gene *Gadd45* que o grupo C (-76%, *P*=0,0007, Figura 17C), reforçando o efeito do tratamento mesmo nos animais magros.

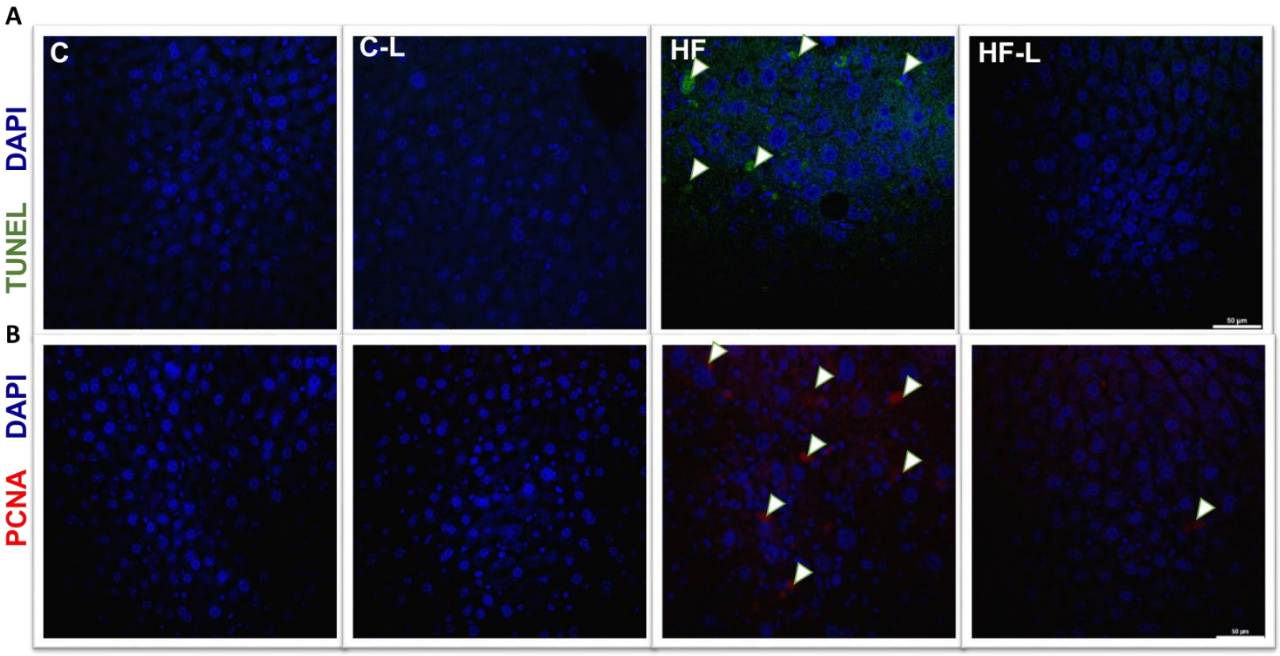
Figura 17 – Níveis de RNA mensageiro dos genes do estresse do retículo endoplasmático e morte celular.



Legenda: Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média, n=5 por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras (P <0,05): a ≠ C; b ≠ C-L; c ≠ HF e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste T2 de Tamhane. Abreviações: Controle (C); Controle com Linagliptina (C-L); High-fat (HF) e High-fat com Linagliptina (HF-L).

O ERE resulta em estímulo pró-apoptótico e nossos resultados mostram imunorreação positiva para o método TUNEL e PCNA no fígado de camundongos alimentados com dieta HF. Esses achados corroboram com a expressão gênica aumentada de *Atf4*, *Chop* e *Gadd45*, pois são importante preditores da apoptose. O tratamento reduziu a expressão das proteínas e a imunorreatividade ao método TUNEL e PCNA, ambos indicam apoptose reduzida e confirmam que a morfologia do RE bem preservada protege a célula contra a apoptose (Figura 18).

Figura 18 - Imunomarcação de tunel (apoptose e regeneração) no fígado.



Legenda: A - Imunomarcação de Tunel, com células apoptóticas positivas (marcação verde indicada pela ponta da seta) apenas nos animais HF (mesma ampliação para todas as imagens, barra de calibração = 25 µm). B - Imunomarcação para PCNA, com células de regeneração positiva (marcação vermelha indicada pela ponta da seta) apenas nos animais HF (mesma ampliação para todas as imagens, barra de calibração = 25 µm).

4.9 ANOVA de duas vias

A dieta e o tratamento interagiram significativamente para determinar esteatose hepática (*P*<0,0001), TAG hepática (*P*=0,0045), TAG plasmática (*P*<0,0001), colesterol hepático (*P*=0,0037), colesterol plasmático (*P*<0,0001), QUICKI (*P*=0,0131), *Atf4*, *Chop* e *Gadd45* (*P*<0,0001), *Sirt1* (*P*=0,0047), *Pgc1a* (*P*=0,0003), *Cpt1a*, *Srbp1c*, *Fas* e *Plin2* (*P*<0,0001).

A dieta, como fator único, exerceu o efeito mais potente sobre a massa corporal final (*P*<0,0001, representando 67% da variação total), consumo de energia (*P*<0,0001, representando 99% da variação total), esteatose hepática (*P*<0,0001, representando 58% da variação total), massa hepática (*P*=0,0023, representando 32% da variação total), colesterol plasmático (*P*<0,0001, representando 41% da variação total), TAG plasmático (*P*<0,0001, respondendo por 39% da variação total),

QUICKI (*P*=0,0089, responsável por 22% da variação total), *Sirt1* (*P* <0,0001, responsável por 70% da variação total) e *Pgc1a* (*P*<0,0001, responsável por 45 % da variação total).

O tratamento com linagliptina, como fator único, exerceu o efeito mais potente sobre o colesterol hepático (*P*=0,0002, responsável por 36% da variação total), TAG hepático (*P*<0,0001, responsável por 62% da variação total), marcadores do ERE (*P*<0,0001 para todos os genes avaliados - a linagliptina foi responsável por 60% da variação total em relação ao *Atf4*, 51% da variação total em relação ao *Chop* e 69% da variação total em relação ao *Gadd45*), marcadores lipogênicos (*Srebp1c*, *P*=0,001, responsáveis por 72% da variância total e *Fas*, *P*<0,0001, representaram 49% da variância total) e *Plin2* (P <0,0001, representaram 90% da variância total. Todos os resultados seguem detalhados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do ANOVA de duas vias

	INTERAÇÃO		TRATAMENTO		DIETA	
PARAMETROSS	**% total da variância**	**Valor de P**	**% total da variância**	**Valor de P**	**% total da variância**	**Valor de P**
Massa corporal final	NS	NS	22.97	<0.0001	**66.49**	<0.0001
QUICKI	19.18	0.0131	19.51	0.0125	**21.86**	0.0089
Ingestão energética	NS	NS	NS	NS	**99.98**	<0.0001
Colesterol total	17.29	<0.0001	31.84	<0.0001	**41.15**	<0.0001
Colesterol hepático	17.88	0.0037	**36.44**	0.0002	20.82	0.0021
Triacilglicerol total	24.63	<0.0001	29.86	<0.0001	**39.01**	<0.0001
Triacilglicerol hepático	9.17	0.0045	**61.67**	<0.0001	**15.73**	0.0005
Massa hepática	NS	NS	19.45	0.0121	**31.70**	0.0023
Esteatose	17.91	<0.0001	20.78	<0.0001	**58.47**	<0.0001
Expressão gênica						
Srebp1c	6.495	0.001	**72.48**	<0.0001	14.57	<0.0001
Fas	42.51	< 0.0001	**48.74**	< 0.0001	NS	NS
Sirt1	12.01	0.0047	NS	NS	**70.06**	<0.0001
PGC1a	11.97	0.0003	34.10	<0.0001	**44.68**	<0.0001
CPT1a	**52.92**	<0.0001	19.72	<0.0001	19.53	<0.0001
Atf4	23.52	<0.0001	**60.25**	<0.0001	5.04	0.0163
Chop	22.46	<0.0001	**50.97**	<0.0001	21.49	<0.0001
Gadd45	9.413	<0.0001	**68.85**	<0.0001	16.69	<0.0001
Plin2	4.386	<0.0001	**89.17**	<0.0001	4.630	<0.0001

O fator mais poderoso que influencia a variância total de cada parâmetro está em negrito e, quando a interação ou a influência do fator nos parâmetros não foi significativa, foi descrito como NS. Abreviações: Carnitina Palmitoil Transferase IA (CPT-1a), Ácido Graxo Sintase (FAS), Proteína de Ligação a Elementos Reguladores de Esterol 1c (SREBP-1c), Fator de Transcrição Ativadora 4 (ATF4) e proteína homóloga da proteína de ligação a intensificador de CCAAT (CHOP) , Co-ativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 a), Perilipina 2 (PLIN2), Parada de crescimento e gene induzível por danos no DNA 45 (GADD45), Sirtuin 1 (SIRT1).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a ingestão crônica de dieta HF produziu elevação dos níveis plasmáticos e hepáticos de colesterol e triacilglicerol, RI e sobrepeso. Esses achados corroboram com danos provocados na estrutura do tecido hepático, desencadeando ERE. No entanto, pode-se argumentar que o tratamento com linagliptina normalizou os parâmetros bioquímicos, reduziu a lipogênese hepática e aumentou a beta-oxidação após cinco semanas de tratamento.

A linagliptina é um potente bloqueador da enzima dipeptidil peptidase tipo 4 (DPP-4) e tem como efeito principal aumentar o tempo de ação das incretinas, hormônios produzidos pelo intestino após a ingestão alimentar (Campbell e Drucker, 2013). As ações das incretinas incluem a potencialização da secreção de insulina dependente de glicose pelo pâncreas e inibição da secreção de glucagon, com consequente redução da gliconeogênese hepática e, portanto, menor produção hepática de glicose (Kern *et al.*, 2012).

No início do experimento os grupos não demostravam diferença significativa da massa corporal. Entretanto, após duas semanas de administração do medicamento, houve redução significativa da massa corporal. Como não houve diferença na ingestão alimentar e, por sua vez, houve similaridade na ingestão de energia entre os grupos HF-L e HF, a redução da massa corporal observada neste estudo pode ser explicada pelo tratamento. Tal achado é compatível com um estudo anterior utilizando a mesma dose (Kern *et al.*, 2012).

A linagliptina age sobre o metabolismo de carboidratos, sendo indicada para o tratamento de pacientes com DMT2. Esse medicamento induz 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 possíveis 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, consequentemente, 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 análise do QUICKI mostrou que os animais expostos ao insulto da dieta HF tiveram uma menor sensibilidade à insulina durante todo o teste. Este resultado concorda com o aumento da massa corporal encontrada nos animais do grupo HF. Em contrapartida, a linagliptina foi capaz de restabelecer a sensbilidade à insulina no grupo HF-L, que por sua vez não apresentou diferença significativa com o grupo C. Este resultado está de acordo com a RI, a hiperglicemia e o atraso na normalização dos níveis de glicose no TOTG, configurando intolerância oral à glicose em animais do grupo HF, como demostrado em estudo prévio do nosso grupo (de Oliveira Correia *et al.*, 2019).

Em concordância com o aumento da massa corporal, o fígado sofreu alterações morfológicas e moleculares induzidas pela obesidade. A linaglipitina foi capaz de normalizar os níveis de colesterol e triacilglicerol tanto hepático quanto plasmático. O aumento no consumo de dieta hiperlipídica no grupo HF promoveu elevação dos níveis de triacilglicerol e colesterol hepáticos. O último é um marcador essencial para caracterizar o quadro de inflamação no tecido hepático (Wouters *et al.*, 2010). O excesso de gordura proveniente da dieta pode ser armazenado no fígado, devido ao aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres e aumento da lipogênese *de novo* (Bugianesi *et al.*, 2010).

Imagens de microscopia de luz revelaram aumento expressivo de gotículas lipídicas no tecido hepático do grupo HF, quando comparado ao grupo C, caracterizando um quadro de esteatose hepática induzida. Em contrapartida, o medicamento foi capaz de reverter esse quadro e promover uma melhora da morfologia do tecido. Essas observações estão de acordo com a redução da MC observada no tratamento dos animais. De fato, uma melhora na esteatose hepática

proveniente do tratamento com linagliptina suporta a hipótese da melhora na sensibilidade à insulina.

No que diz respeito aos resultados da via da lipogênese, foi observado a elevação da expressão de *Srebp1c* e *Fas*, sendo esses genes primordiais na transcrição de enzimas lipogênicas, as quais estavam aumentadas em resposta à dieta HF, resultando no acúmulo de lipídios no fígado (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2014). O *Srebp1* é considerado o regulador principal da lipogênese, aumenta a síntese de ácidos graxos e acelera o acúmulo de TAG (Eberle *et al.*, 2004). Tal acúmulo de lipídios no fígado é gerado pela ingestão excessiva, aumento da distribuição de ácido graxo ao fígado, oxidação inadequada de ácidos graxos e aumento da lipogênese *de novo* (Fujii *et al.*, 2013). Além disso, o presente estudo também observou redução da expressão do *Fas* hepático pela ação da linagliptina, tendo contribuído para a melhora da esteatose hepática (Souza-Mello *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2012).

Outro gene envolvido com o acúmulo de lipídios é o *Plin2*. É um marcador molecular de grande importância para a formação e manutenção de gotículas lipídicas intracelulares, uma vez que é uma proteína vital associada à gotículas lipídicas no fígado normal e esteatótico (Targett-Adams *et al.*, 2005; Aibara *et al.*, 2013). Através da análise por expressão gênica e imunohistoquímica foi demonstrado que o PLIN2 se localizou na superfície das gotículas lipídicas tecidos com esteatose hepática, indicando seu envolvimento na progressão da DHGNA (Ikura e Caldwell, 2015). Dessa forma, foi mostrado que a imunomarcação e expressão gênica para PLIN2 apresentou redução no grupo tratado com a linagliptina, confirmando os efeitos benéficos do medicamento.

Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que a linagliptina reduz a expressão gênica da LDN, enquanto não altera a expressão dos genes relacionados à β-oxidação (Souza-Mello *et al.*, 2010). Assim, a melhora da DHGNA pela linagliptina pode estar associada à diminuição da síntese de ácidos graxos, além do aumento da oxidação de ácidos graxos pela ativação de genes lipolíticos como *Sirt1*, *Pgc1a* e *Cpt1a*.

A SIRT1 uma proteína desacetilase dependente de NAD+, prolonga a longevidade em diversas espécies e está envolvida no metabolismo energético. Estudos relatam que a SIRT1 sofre implicações na progressão da DHGNA, tendo uma redução na sua expressão no fígado de camundongos com indução de DHGNA (Deng *et al.*, 2007; Nassir e Ibdah, 2016). Outro estudo mostra que animais *knockout* para o

gene Sirt1 nos hepatócitos apresentam supressão da oxidação de ácidos graxos (Purushotham *et al.*, 2009). A SIRT1 regula o metabolismo celular e também modula a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídios (Long *et al.*, 2019). Corroborando com nossos achados, a linagliptina foi capaz de aumentar a expressão do gene *Sirt1* no fígado de camundongos tratados e promoveu o aumento da beta-oxidação, favorecendo a normalização da estrutura hepática e reduzindo o ERE.

O gene *Sirt1* interage e regula a acetilação do *Pgc1a*, que desempenha um papel central na expressão gênica mitocondrial (Nemoto *et al.*, 2005). Nossos achados sugerem que a superexpressão do *Sirt1* gera ativação do *Pgc1a*, que por sua vez contribui para o aumento da atividade mitocondrial e possibilita incremento da beta-oxidação, contribuindo para atenuação da esteatose hepática. Dessa forma, a linagliptina induziu ativação do *Sirt1*, concomitantemente à ativação do *Pgc1a*, contribuindo para a melhora da esteatose, resistência à insulina e sobrecarga do RE.

A CPT1a desempenha um papel essencial para a entrada de ácidos graxos na matriz mitocondrial. No entanto, é considerado o principal regulador da beta-oxidação hepática mitocondrial (Longo *et al.*, 2006). Dessa forma, nossos resultados confirmam atividade da CPT1a no fígado, em que o grupo HF mostra uma redução da expressão gênica de *Cpt1a*, com maior lipogênese e esteatose. Em contrapartida, o grupo HF-L mostrou uma elevação na expressão desse gene, com melhora dos parâmetros. A administração da linagliptina ativou a *Cpt1a*, e esta descoberta prevê um aumento da beta-oxidação, que ocorre nas mitocôndrias, desencadeando a degradação do TAG e, assim, contribuindo para a reversão da lipotoxicidade hepática.

A progressão da DHGNA ainda tem seus mecanismos pouco esclarecidos, entretanto, uma possibilidade envolve uma resposta lipotóxica precoce devido à esteatose hepática, surgindo assim, nesse contexto, a importância do papel do RE. Essa organela intracelular é responsável pela síntese, desdobramento, modificação e tráfego intracelular das proteínas. Uma desregulação na homeostase do RE, referida como ERE, tem sido associada a algumas condições patológicas, incluindo evidências recentes que implicam o ERE no desenvolvimento de esteatose hepática (Li *et al.*, 2012).

O aumento no consumo de energia leva a um acúmulo de ácidos graxos livres no tecido hepático, induzindo ao ERE, culminando com diminuição da função hepática e apoptose (Li *et al.*, 2012; Zhou e Liu, 2014). Nossos resultados demostraram que os

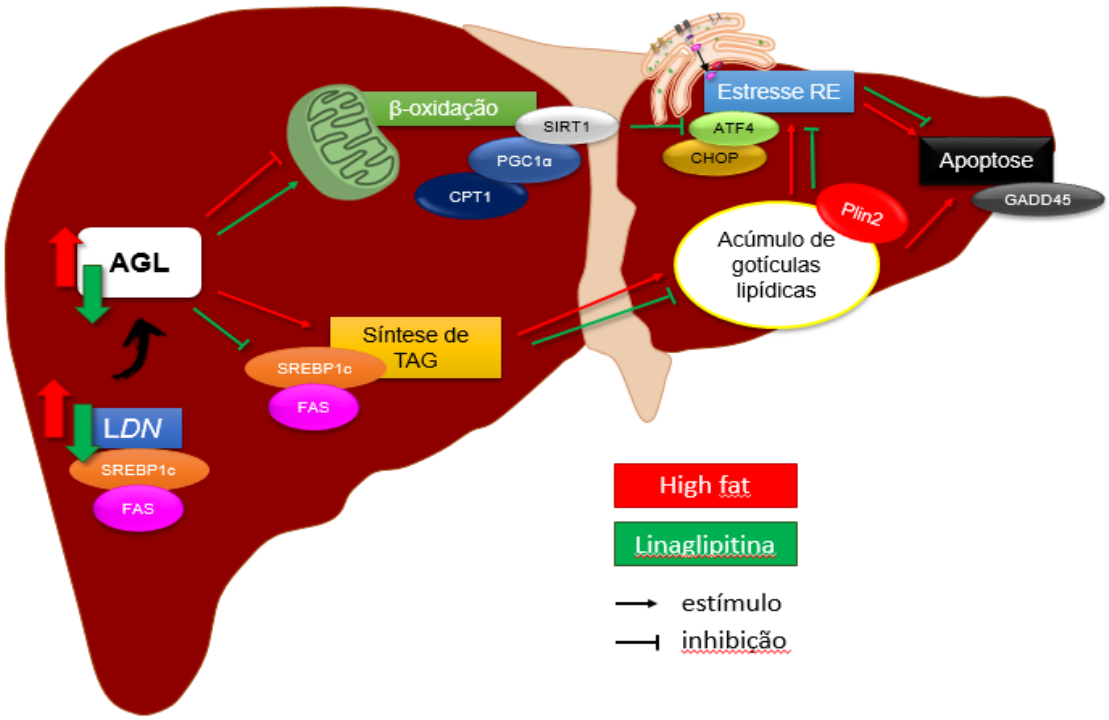
fígados esteatóticos dos animais alimentados com dieta HF apresentaram maior expressão do gene *Atf4*, *Chop* e *Gadd45*, todos genes envolvidos no ERE.

O ATF4 é um fator de transcrição que regula vários genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos e resistência ao estresse oxidativo. Além disso, o ATF4 pode induzir a transcrição de outro fator de transcrição, CHOP, que se encontra presente no citoplasma da célula, em condições de homeostasia. Entretanto, quando em situações de estresse, sua expressão sofre um aumento no núcleo e induz à expressão do gene *Gadd45*, culminando em uma estagnação do ciclo celular e apoptose (Oyadomari e Mori, 2004; Fusakio *et al.*, 2016).

No presente estudo, os grupos alimentados com uma dieta rica em gordura apresentaram fígados esteatóticos com aumento da expressão das isoformas *Atf4*, *Chop* e *Gadd45*. Por sua vez, a ativação desses genes induz a morte celular, tendo objetivo de proteger as demais células hepáticas sadias dos efeitos tóxicos desencadeados pelas ações das proteínas desdobradas (Oyadomari e Mori, 2004; Silva-Veiga *et al.*, 2018). Por outro lado, o tratamento com linaglitina melhorou a expressão desses três genes envolvidos no ERE do tecido hepático em camundongos HF-L, suportando a ligação do acúmulo de lipídios no fígado com o ERE.

Em relação aos nossos resultados, estudos anteriores relatam que a ativação da SIRT1 desempenha um papel essencial na regulação da apoptose gerada pelo ERE em diferentes tipos celulares (Romeo-Guitart *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2019). Correlato a isso, podemos confirmar a atuação da linagliptina promovendo ativação da Sirt1, que por sua leva ativação de genes lipolíticos e reduz genes envolvidos com a morte celular. A Figura 19 resume os principais achados deste estudo.

Figura 19 – Resumo gráfico dos resultados



Legenda – A dieta hiperlipídica leva à deposição ectópica de lipídios no fígado, gerando redução na oxidação de lipídios, culminando em esteatose hepática. O tratamento com a linagliptina normalizou a massa corporal, reduziu os níveis de triacilglicerol e colesterol plasmáticos e hepáticos, além de aumentar a beta-oxidação. Essas condições inibiram a inflamação hepática e promoveram uma estrutura normal do retículo endoplasmático. A redução da expressão de *Atf4* e *Chop* inibiu a apoptose e exerceu efeitos antiinflamatórios no fígado. A linagliptina provocou uma modulação benéfica dos genes *Fas*, *Sirt1*, *Pgc1a* e *Cpt1a*, favorecendo a beta-oxidação sobre a lipogênese hepática e a consequente atenuação de DHGNA após o tratamento.

Fonte: O autor, 2019.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a linagliptina promoveu efeitos anti-esteatóticos e alívio do ERE. Esses efeitos benéficos estão relacionados a melhorias na sensibilidade à insulina e no metabolismo da energia hepática, com supressão da lipogênese e estimulação da beta-oxidação. Esse padrão de expressão gênica levou à mitigação de marcadores de ERE e núcleos apoptóticos, resultando em uma estrutura hepática bem preservada. Em suma, a linagliptina pode ser uma ferramenta promissora para controlar a DHGNA e funcionar como uma droga terapêutica em pacientes com esteatose hepática associada a outras comorbidades como DMT2.

REFERÊNCIAS

Ahren B. DPP-4 Inhibition and the Path to Clinical Proof. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10: 376 (doi: 10.3389/fendo.2019.00376)

Aibara D, Matsusue K, Matsuo K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S. Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 1766-1772 (doi:

Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014; 63: 895-902 (doi: 10.1016/j.metabol.2014.04.003)

Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martinez S, Porras JA, Aragones G et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 22173-22187 (doi: 10.3390/ijms151222173)

Bahirat UA, Shenoy RR, Talwar R, Goel RN, Nemmani KVS. Co-administration of APD668, a G protein-coupled receptor 119 agonist and linagliptin, a DPPIV inhibitor, prevents progression of steatohepatitis in mice fed on a high trans-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495: 1608-1613 (doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.004)

Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res* 2014; 44: 450-459 (doi: 10.1111/hepr.12138)

Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012; 122: 2176-2194 (doi: 41636 [pii]
10.1172/JCI41636)

Brasil. 2017. *Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016.* In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde. p 160.

Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1941-1951

Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016; 65: 1038-1048 (doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012)

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)

Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11245-11250 (doi: 10.1073/pnas.0404297101
0404297101 [pii])

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845 (doi: 10.1016/s0016-5085(98)70599-2)

Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3: S377-384:

de Oliveira Correia BR, Rachid TL, de Oliveira Glauser JS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. High dose of linagliptin induces thermogenic beige adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Endocrine* 2019: (doi: 10.1007/s12020-019-01969-y)

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)

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582: 68-73 (doi: S0014-5793(07)00875-7 [pii]
10.1016/j.febslet.2007.07.084)

Deng XQ, Chen LL, Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int* 2007; 27: 708-715 (doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01497.x)

Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 20314-20326 (doi: 10.1074/jbc.M312475200)

Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 1229-1237 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.007)

Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 2): 345-357 (doi: 10.1042/bj3200345)

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86: 839-848 (doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018)

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-ylme thyl)-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)

Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World J Gastroenterol* 2018; 24: 2974-2983 (doi: 10.3748/wjg.v24.i27.2974)

Feng K, Ge Y, Chen Z, Li X, Liu Z, Li X et al. Curcumin Inhibits the PERK-eIF2alpha-CHOP Pathway through Promoting SIRT1 Expression in Oxidative Stress-induced Rat Chondrocytes and Ameliorates Osteoarthritis Progression in a Rat Model. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 8574386 (doi: 10.1155/2019/8574386)
Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013; 46: 141-152 (doi: 10.1007/s00795-013-0016-1)

Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell* 2016; 27: 1536-1551 (doi: 10.1091/mbc.E16-01-0039)

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)

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-917 (doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034)

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008; 283: 20015-20026 (doi: 10.1074/jbc.M802187200 M802187200 [pii])

Ikura Y, Caldwell SH. Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 8699-8708

Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 747-753 (doi: 10.1016/j.bbalip.2011.09.017)

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)

Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY et al. Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem* 2009; 284: 15071-15083 (doi: 10.1074/jbc.M109.006742)

Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19: 210-215 (doi: 10.3350/cmh.2013.19.3.210)

Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci* 2014; 137: 26-35 (doi: kft230 [pii] 10.1093/toxsci/kft230)

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 201-229 (doi: 10.1210/edrv.23.2.0461)

Li J, Huang J, Li JS, Chen H, Huang K, Zheng L. Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *J Hepatol* 2012; 56: 900-907 (doi: 10.1016/j.jhep.2011.10.018)

Li T, Jiang S, Lu C, Hu W, Ji T, Han M et al. Snapshots: Endoplasmic Reticulum Stress in Lipid Metabolism and Cardiovascular Disease. *Curr Issues Mol Biol* 2018; 28: 14-28 (doi: 10.21775/cimb.028.014)

Li Y, Wong K, Giles A, Jiang J, Lee JW, Adams AC et al. Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology* 2014; 146: 539-549 e537 (doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.059)

Long JK, Dai W, Zheng YW, Zhao SP. miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Med* 2019; 25: 26 (doi: 10.1186/s10020-019-0085-2)

Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142C: 77-85 (doi: 10.1002/ajmg.c.30087)

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 2013; 8: e64258 (doi: 10.1371/journal.pone.0064258)

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)

Moore B. On the treatment of Diabetus mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J* 1906; 1: 28-38 (doi: 10.1042/bj0010028)

Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2014; 53: 124-144 (doi: 10.1016/j.plipres.2013.12.001)

Nassir F, Ibdah JA. Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 10084-10092 (doi: 10.3748/wjg.v22.i46.10084)

Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem* 2005; 280: 16456-16460 (doi: 10.1074/jbc.M501485200)

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389 (doi: 10.1038/sj.cdd.4401373)

Paniagua JA, Escandell-Morales JM, Gil-Contreras D, Berral de la Rosa FJ, Romero-Jimenez M, Gomez-Urbano A et al. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. *Nutrition* 2014; 30: 177-185 (doi: 10.1016/j.nut.2013.07.017)

Peeters A, Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Baes M. Hepatosteatosis in peroxisome deficient liver despite increased beta-oxidation capacity and impaired lipogenesis. *Biochimie* 2011; 93: 1828-1838 (doi: 10.1016/j.biochi.2011.06.034)

Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 2010; 285: 33959-33970 (doi: 10.1074/jbc.M110.122978)

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 829-838 (doi: 10.1172/JCI34275)

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 2009; 9: 327-338 (doi: 10.1016/j.cmet.2009.02.006)

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)

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007 (doi: 10.1007/s10495-009-0341-y)

Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010; 53: 372-384 (doi: 10.1016/j.jhep.2010.04.008)

Romeo-Guitart D, Leiva-Rodriguez T, Espinosa-Alcantud M, Sima N, Vaquero A, Dominguez-Martin H et al. SIRT1 activation with neuroheal is neuroprotective but SIRT2 inhibition with AK7 is detrimental for disconnected motoneurons. *Cell Death Dis* 2018; 9: 531 (doi: 10.1038/s41419-018-0553-6)

Salomone F, Barbagallo I, Godos J, Lembo V, Currenti W, Cina D et al. Silibinin Restores NAD(+) Levels and Induces the SIRT1/AMPK Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver. *Nutrients* 2017; 9: (doi: 10.3390/nu9101086)

Schreurs M, Kuipers F, van der Leij FR. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2010; 11: 380-388 (doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x)

Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 739-789 (doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134)

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)

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274: 30028-30032

Sidossis LS, Wolfe RR. Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed. *Am J Physiol* 1996; 270: E733-738 (doi: 10.1152/ajpendo.1996.270.4.E733)

Silva-Veiga FM, Rachid TL, de Oliveira L, Graus-Nunes F, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 474: 227-237 (doi: 10.1016/j.mce.2018.03.013)

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-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)

Su Q, Kumar V, Sud N, Mahato RI. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; 129: 54-63 (doi: 10.1016/j.addr.2018.01.009)

Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 2010; 107: 839-850 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.224766)

Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1728: 95-104 (doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.01.017)

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846 (doi: 10.1002/hep.24001)

Umut Özcan; Qiong Cao EYA-HLNNIEÖ, Gürol Tuncman, Cem Görgun, Laurie H. Glimcher; Gökhan S. Hotamisligil. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 2004; 306: 457-461

Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1372-1379 (doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x)

Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lutjohann D, Kerksiek A et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett* 2010; 584: 1001-1005 (doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.046)

Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011; 83: 124-133 (doi: 10.1159/000318741)

Yang Y, Li W, Liu Y, Sun Y, Li Y, Yao Q et al. Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. *J Nutr Biochem* 2014; 25: 1207-1217 (doi: S0955-2863(14)00133-8 [pii]
10.1016/j.jnutbio.2014.06.001)

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal* 2007; 274: 630-658

Zhou H, Liu R. ER stress and hepatic lipid metabolism. *Front Genet* 2014; 5: 112 (doi: 10.3389/fgene.2014.00112)

ANEXO A - Comitê de Ética

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

ibrag Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

CERTIFICADO

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

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigencia 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

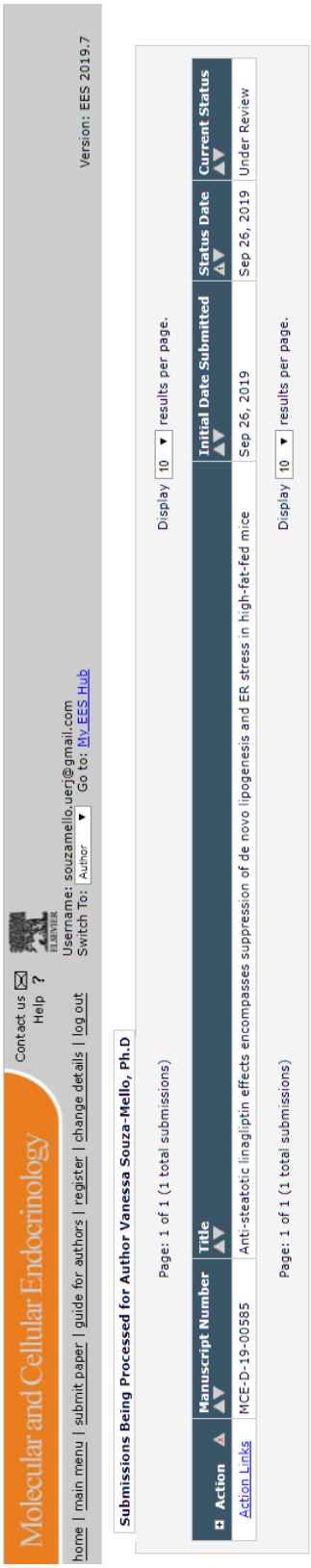
Rio de Janeiro, 24 de Maio de 2018.

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

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

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

ANEXO B – Artigo Submetido



Molecular and Cellular Endocrinology

Contact us
Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: souzamello.uerj@gmail.com
Switch To: Author Go to: My EES Hub

Version: EES 2019.7

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

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	MCE-D-19-00585	Anti-steatotic linagliptin effects encompasses suppression of de novo lipogenesis and ER stress in high-fat-fed mice	Sep 26, 2019	Sep 26, 2019	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu