



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

Aline Penna de Carvalho

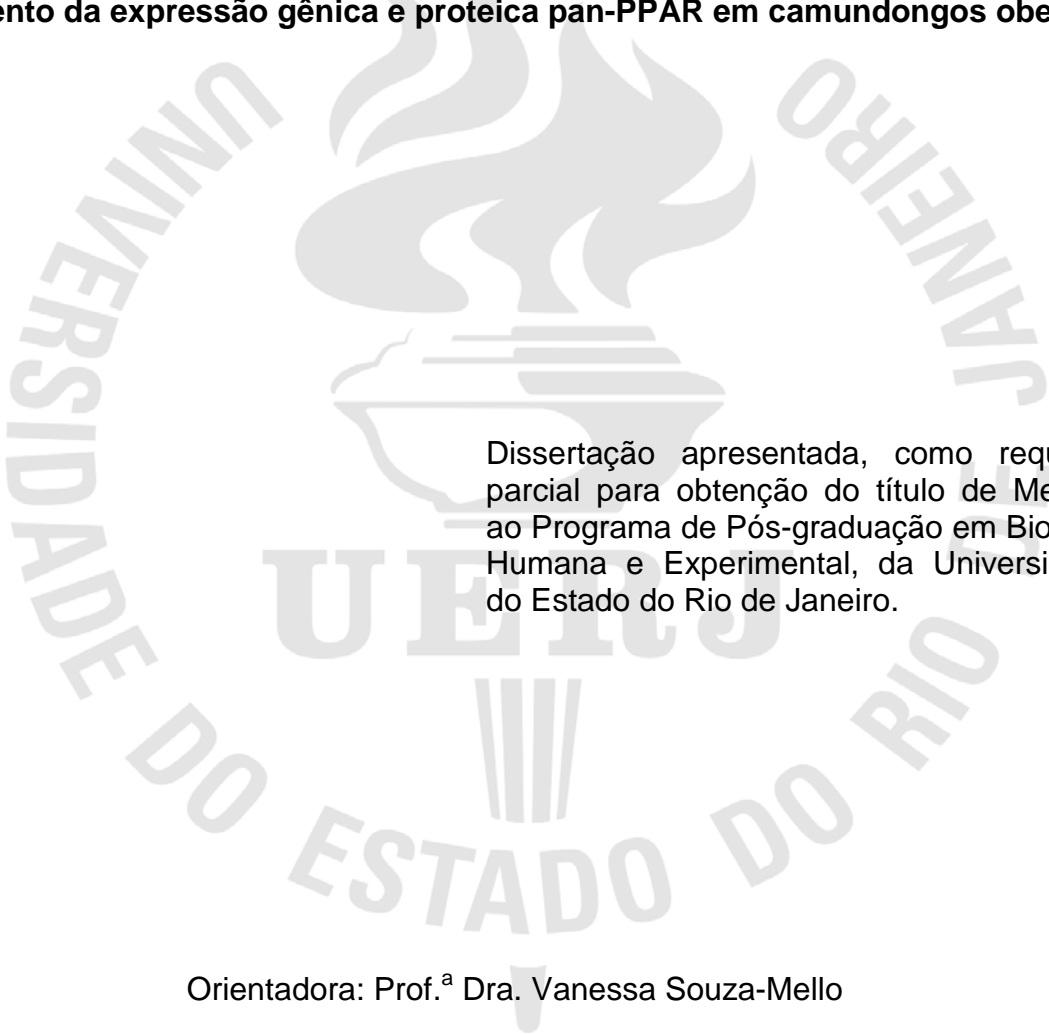
Efeitos pleiotrópicos da telmisartana nos tecidos adiposos branco e marrom: aumento da expressão gênica e proteica pan-PPAR em camundongos obesos

Rio de Janeiro

2014

Aline Penna de Carvalho

**Efeitos pleiotrópicos da telmisartana nos tecidos adiposos branco e marrom:
aumento da expressão gênica e proteica pan-PPAR em camundongos obesos**



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

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

Rio de Janeiro

2014

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

C331 Carvalho, Aline Penna de.

Efeitos pleiotrópicos da telmisartana nos tecidos adiposos branco e marrom: aumento da expressão gênica e proteica pan-PPAR em camundongos obesos. / Aline Penna de Carvalho. – 2014.

72 f.

Orientadora: Vanessa de 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. Tecido adiposo branco - Teses. 2. Tecido adiposo marrom - Teses. 3. Expressão gênica. 4. Termogênese. 5. Fatores de Transcrição. I. Souza-Mello, Vanessa de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.39

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

Assinatura

Data

Aline Penna de Carvalho

**Efeitos pleiotrópicos da telmisartana nos tecidos adiposos branco e marrom:
aumento da expressão gênica e proteica pan-PPAR em camundongos obesos**

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

Aprovada em 15 de Julho de 2014.

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dra. Tania Maria Ortiga-Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

À minha bisavó,
por toda superação e força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Ele e para Ele são todas as coisas. “Levantarei os meus olhos para os montes, de onde vem o meu socorro. O meu socorro vem do Senhor que fez o céu e a terra. O Senhor guardará a minha entrada e a minha saída, desde agora e para sempre”;

Ao meu amado esposo Thiago, por toda dedicação, paciência e zelo, o caminho ao seu lado foi menos árduo, te amo;

Aos meus pais, Loran e Ronaldo, por acreditarem em mim em todos os momentos, obrigada por tudo, minha base e meu amparo;

À minha irmã, Pâmella, por fazer diferença em minha vida, sei que posso contar sempre com você, obrigada;

À minha família, por todas as orações e demonstrações de carinho, a vida é mais bela ao lado de vocês;

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Vanessa Souza-Mello, pela amizade construída, pelo suporte dado em todo o trabalho e pelos momentos descontraídos fora do lab;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda e a Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila, pela paciência e apoio;

À prof.^a Cristiane Matsuura e aos amigos da farmácia, pelo suporte prestado e amizade construída;

Aos grandes amigos do chá: Eli, Thereza, André e D'Angelo, por todo ensinamento adquirido e compartilhado, com certeza com vocês a caminhada foi menos árdua;

Às minhas irmãs científicas, Fran e Tamires, obrigada pelo carinho e amizade construída;

Aos amigos do LMMC, Fernanda Ornellas, Isabele, Jéssica, Simone, Celina, Jorginho e Milton, obrigada por todo apoio e força;

À minha IC Júlia e as agregadas Mariel e Thaís, o trabalho também é de vocês! Obrigada por toda ajuda;

Aos demais colegas do LMMC e secretários do BHEX, Obrigada!;

Aos técnicos do LMMC, Thatiany, Leia, Michele e Wilian, somos uma grande equipe!;

Às amigas da faculdade, Mônica e Dandara, obrigada pela torcida!;

Aos meus amigos, que mesmo distante estiveram presente, Fabrícia, Debora, Amanda Melo, Michelinha, Danielzinho, Fabiana, Daniel, Flávia, Marco Moura, Lohane e Isadora, Amo vocês!;

E aos casais felizes para sempre, estamos juntos.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve.

Charles Chaplin

RESUMO

CARVALHO, Aline Penna de. **Efeitos pleiotrópicos da telmisartana nos tecidos adiposos branco e marrom**: aumento da expressão gênica e proteica pan-PPAR em camundongos obesos. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

Receptores ativadores de proliferação perioxossomal(PPARs) são fatores de transcrição envolvidos com a oxidação dos ácidos graxos e proliferação celular, mediando diversas vias, o que representa uma estratégia promissora para enfrentar as características da síndrome metabólica. Existem três isoformas de PPARs(PPARalfa, beta/delta e gama), que são diferencialmente expressos em diferentes tecidos.No presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos pleiotrópicos da telmisartana, um anti-hipertensivo, bloqueador do receptor AT1 da angiotensina e agonista parcial PPAR gama, no tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM) em camundongos obesos induzido por dieta.Camundongos machos, da linhagem C57BL/6 foram alimentados com uma dieta padrão (*standard-chow*, 10% da energia proveniente de lipídios) ou com uma dieta com alto teor lipídico (*high fat*, 49% de energia proveniente de lipídios) durante 10 semanas. Em seguida, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: SC, SC-T, HF e HF-T (n=10). O fármaco foi administrado (10mg/kg de dieta) durante 4 semanas para os grupos SC-T e HF-T.O grupo HF apresentou sobrepeso, hipertensão arterial sistêmica, perfil de adipocinas pró-inflamatórias, resistência insulínica, diminuição do gasto energético, comprometimento do metabolismo da glicose e distribuição anormal da massa adiposa. Além disso, a obesidade ocasionou diminuição da expressão de PPARalfa, beta/delta e gama noTAB e TAM, resultando na inadequação da captação de glicose e termogênese insuficiente. Por outro lado,a ativação das três isoformas de PPARs, a melhora do perfil inflamatório das adipocinas, o aumento da sensibilidade à insulina e a melhora da captação de glicose, foi vistaapós o tratamento com telmisartana. A ativação dos PPARs no TAB trouxe muitos benefícios. No TAM, resultados surpreendentes foram que a telmisartana provocou o aumento da expressão do receptor adrenérgico beta 3 (RA β 3), induzido pela ativação de PPARbeta/delta e maior termogênese comaumento da expressão da proteína desacopladora1 (UCP1). Em conclusão, nossos resultados mostram que telmisartanaaumenta a expressão gênica e proteica PAN-PPAR no TAB e TAM em camundongos obesos induzidos por dieta. Nossas observações mostram que, apesar do grupo HF-T ter reduzido a ingestão energética, os efeitossão explicados pela ativação PAN-PPAR da telmisartana, causando a ativação da termogênese e resultando num balanço energético negativo.

Palavras-chave: Telmisartana. Tecido adiposo branco. Tecido adiposo marrom. Termogênese.

ABSTRACT

CARVALHO, Aline Penna de. **Pleiotropic effects of telmisartan in white and brown adipose tissues**: enhanced pan-PPAR gene and protein expression in obese mice. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) are transcription factors involved in fatty acids oxidation and cell proliferation, mediating different pathways, representing a hopeful strategy to deal with the characteristics of metabolic syndrome. There are three isoforms of PPARs (PPAR alpha, beta / delta and gamma) that are differentially expressed in different tissues. The present study, aimed to evaluate pleiotropic effects of telmisartan, an anti-hypertensive, angiotensin receptor blocker AT1 and PPAR gamma agonist in white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) in diet-induced obese mice. Male C57BL/6 mice fed a standard diet (standard-chow, 10% of energy from lipids) or a high fat diet (high fat, 49% of energy from lipids) for 10 weeks. Afterwards, groups were subdivided into: SC, SC-T, HF and HF-T (n=10, each). Treatment with telmisartan (10 mg/Kg BM, in the diet) was maintained for 4 weeks. The HF group showed overweight, hypertension, adipokine pro-inflammatory profile, insulin resistance, decreased in energy expenditure, flawed in glucose metabolism and abnormal distribution of adipose mass. Furthermore, obesity caused reduced expression of PPARalpha, beta/delta and gamma in WAT and BAT, resulting in unproductive glucose uptake and insufficient thermogenesis. On the other hand the activation of the three isoforms of PPARs, the improvement of the inflammatory profile, increased insulin sensitivity and improved glucose uptake was observed after treatment with telmisartan. The activation of PPARs in BAT provided many benefits. In BAT, surprising new findings show that telmisartan caused sympathetic activation with beta-3 adrenergic receptor (RA β 3), induced activation PPARbeta /delta and increased thermogenesis with increased expression of uncoupling protein 1 (UCP1), that it is a target gene of PPARalpha. In conclusion, our results show for the first time telmisartan increases the gene and protein expression PAN-PPAR in WAT and BAT in diet-induced obese mice. Our observations demonstrate that, although the HF-T group have reduced energy intake, the effects are explained by the PPAR-PAN activation of telmisartan, causing the activation of thermogenesis through maintaining sympathetic stimulation and increased expression of UCP1, resulting in a negative energy balance.

Keywords: Telmisartan. White Adipose Tissue. Brown Adipose Tissue. Thermogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Obesidade e comorbidades associadas.....	17
Figura 2 –	Tecido adiposo e síndrome metabólica.....	19
Figura 3 –	Classe I dos GLUTs.....	21
Figura 4 –	Via de sinalização da insulina.....	22
Figura 5 –	Adipócitos.....	24
Figura 6 –	Sinalização da termogênese.....	26
Figura 7 –	PPAR no núcleo.....	27
Figura 8 –	Esquema do desenho experimental.....	33
Figura 9 –	Evolução da MC no período experimental.....	41
Figura 10 –	Evolução da pressão arterial sistólica.....	43
Figura 11 –	Calorimetria indireta.....	44
Figura 12 –	Tolerância à glicose.....	45
Figura 13 –	Diâmetro médio dos adipócitos.....	48
Figura 14 –	Distribuição do diâmetro dos adipócitos.....	48
Figura 15 –	Nível proteico de PPAR-alfa e PPAR-gama no TAB.....	49
Figura 16 –	Nível proteico de Adiponectina, Leptina e TNF-alfa no TAB.....	50
Figura 17 –	Nível proteico de TC10 e GLUT4 no TAB.....	51
Figura 18 –	Expressão gênica dos PPARs no TAB.....	52
Figura 19 –	Nível proteico de PPAR-alfa e PPAR-gama no TAM.....	53
Figura 20 –	Nível proteico de RA β 3e UCP-1 no TAM.....	54
Figura 21 –	Nível proteico de TC10 e GLUT-4 no TAM.....	55
Figura 22 –	Expressão gênica dos PPARs no TAM.....	56
Figura 23 –	Expressão gênica da termogênese no TAM.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais.....	32
Tabela 2 - Sequência dos <i>primers</i>	40
Tabela 3 - Ingestão alimentar e energética.....	42
Tabela 4 - Hormônios e perfil glicídico.....	46
Tabela 5 - Parâmetros do tecido adiposo branco.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sob a curva
BRA	Bloqueador do receptor tipo 1 da Angiotensina
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
GLUTs	Família de transportadores de glicose
HF	Grupo que recebeu dieta <i>high-fat</i>
HF-T	Grupo que recebeu dieta <i>high-fat</i> com telmisartana
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment-insulin resistance</i>
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
MC	Massa corporal
NF κ B	Fator nuclear kapa B
PAS	Pressão arterial sistólica
PKA	Proteína quinase A
PPAR	Receptores ativados de proliferação perioxossomal
PPREs	Elementos de resposta de proliferação perioxossomal
RA	Receptor adrenérgico
RA β	Receptor adrnérgico beta
RA β 3	Receptor adrenérgico beta 3
RXR	Receptor do retinóide X
SC	Grupo que recebeu dieta <i>standard-chow</i>
SC-T	Grupo que recebeu dieta <i>standard-chow</i> com telmisartana
SM	Síndrome metabólica
TA	Tecido adiposo

TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAMi	Tecido adiposo marrom interescapular
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
u.a.	Unidade arbitrária
UCP-1	Proteína desacopladora 1

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Obesidade, síndrome metabólica e tecido adiposo branco	17
1.2	Resistência à insulina e intolerância à glicose	20
1.3	Ativação da termogênese e tecido adiposo marrom	23
1.4	PPARs e Telmisartana	26
1.4.1	PPARS	26
1.4.2	Telmisartana	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Geral	30
2.2	Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Animaise dieta	31
3.2	Massa corporal e ingestão alimentar	34
3.3	Pressão arterial Sistólica (PAS)	35
3.4	Calorimetria indireta	35
3.5	Tolerância à glicose e insulina	35
3.6	Sacrifício	36
3.7	Extração de tecidos	36
3.8	Análise plasmática	37
3.9	Tecido adiposo branco	37
3.9.1	Morfometria	37
3.10	Western blot	38
3.11	RT- PCR em tempo real	39
3.12	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Massa corporal	41
4.2	Pressão arterial sistólica	42
4.3	Calorimetria indireta	43
4.4	Tolerância à glicose	44
4.5	Parâmetros metabólicos	45

4.6	Tecido adiposo branco	47
4.6.1	<u>Biometria e morfologia</u>	47
4.6.2	<u>Western blot</u>	49
4.6.3	<u>RT-PCR em tempo real</u>	51
4.7	Tecido adiposo marrom	53
4.7.1	<u>Western blot</u>	53
4.7.2	<u>RT-PCR em tempo real</u>	55
5	DISCUSSÃO	58
	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE - Comprovante de submissão de artigo científico.....	71
	ANEXO - Comitê de ética em experimentação animal.....	72

INTRODUÇÃO

A obesidade e o sobrepeso já alcançaram proporções epidêmicas em todo mundo (1), o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a hipertensão arterial sistêmica cresceram concomitantemente, tornando-se complicações secundárias em indivíduos obesos, pertencentes a síndrome metabólica (SM) (2).

O tecido adiposo é o principal regulador da homeostase energética, porém o acúmulo de gordura corporal causado muitas vezes por um consumo excessivo de caloria superior ao valor usado para as atividades do organismo pode levar a um desequilíbrio, isso acontece quando a ingestão alimentar é maior que o gasto energético correspondente (3).

O tecido adiposo branco (TAB) é capaz de secretar diferentes adipocinas, as quais desempenham um papel na resistência à insulina através do seu perfil pró-inflamatório na obesidade (4). Inversamente, o tecido adiposo marrom (TAM) realiza a termogênese adaptativa, que consiste na liberação da energia na forma de calor através da ação da proteína desacopladora 1 (UCP-1), induzida pela exposição ao frio ou dieta hiperlipídica, e tem como fonte principal os ácidos graxos livres do próprio tecido ou da lipólise do TAB (5).

Os receptores ativadores de proliferação perioxossomal (PPARs) são fatores de transcrição envolvidos com a oxidação dos ácidos graxos e proliferação celular, mediando diversas vias (6), o que representa uma estratégia promissora para enfrentar as características da SM na obesidade. Existem três isoformas de PPARs (PPAR alfa, beta/delta e gama), que são diferencialmente expressos em diferentes tecidos.

A Telmisartana é um bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina (BRA) (7), mas também é um agonista parcial PPAR gama (8), o que resulta em inúmeros efeitos pleiotrópicos, como a melhora da obesidade, da resistência à insulina, da esteatose hepática e pancreática em modelos de roedores (9-11).

A redução da massa corporal (MC) e redistribuição da gordura corporal são frequentemente observadas no tratamento com telmisartana em roedores, estando relacionada ao aumento do gasto energético e o metabolismo do tecido adiposo (12). Embora a telmisartana seja descrita como um agonista parcial PPAR-gama, ela foi capaz de ativar PPAR-alfa no fígado (13) e PPAR beta/delta no músculo

esquelético e no TAB (14, 15), atuando de forma fundamental contra a esteatose hepática, resistência à insulina periférica e obesidade. Porém, não há estudos sobre os efeitos da telmisartana após a ativação de PPAR-alfa no TAB e TAM e/ou PPAR-beta/delta no TAM, sendo cruciais para elucidar os caminhos pelos quais a telmisartana aumenta o gasto energético e alivia a resistência à insulina.

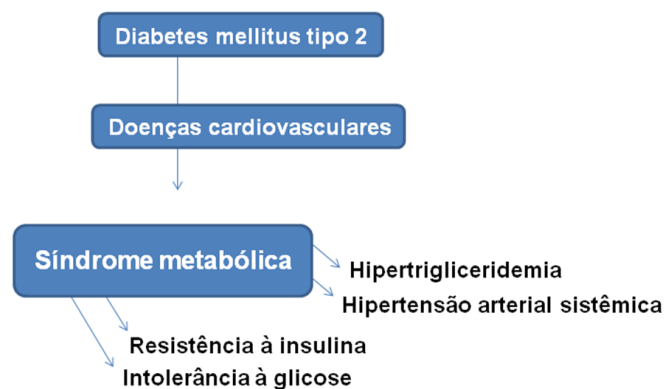
O presente estudo teve como objetivo avaliar se a telmisartana foi capaz de ativar as outras isoformas de PPARs no TAB e TAM, bem como abordar seus efeitos sobre resistência à insulina, perfil das adipocinas e a via da termogênese adaptativa.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade, síndrome metabólica e tecido adiposo branco

A obesidade é um grande problema no mundo e tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas. Conseqüentemente, a obesidade e seus distúrbios associados constituem uma série de riscos para a saúde da população. A obesidade está associada com uma variedade de fatores incluindo doenças cardiovasculares, DM2 e resistência à insulina (16). O acúmulo tecido adipo central, observado no aumento da circunferência da cintura, dislipidemia, hiperglicemia, e hipertensão arterial quando associados são definidos como SM e tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública (1, 17), como esquematizado na Figura 1.

Figura 1 - Obesidade e comorbidades associadas



Legenda: A obesidade desencadeia uma série de comorbidades, que resulta na síndrome metabólica.
Fonte: O autor, 2014.

Seus componentes refletem a má nutrição, o estilo de vida sedentário e conseqüentemente um alto índice de adiposidade. Já o excesso da gordura intra-abdominal em detrimento da gordura subcutânea está associado a um estado pró-inflamatório crônico (4, 18).

A obesidade versa o aumento total da massa de tecido adiposo causado pelo aumento do número e do tamanho das células adiposas, os chamados adipócitos,

os quais armazenam triglicerídeos. O corpo funciona dentro dos princípios da termodinâmica onde o gasto energético composto pela taxa metabólica basal e do gasto envolvido nas atividades físicas como um todo é semelhante a energia ingerida através dos alimentos. O aumento da ingestão energética e a diminuição do gasto, devido ao sedentarismo, levam a um balanço energético positivo, fazendo com que o organismo, em desequilíbrio, estoque mais gordura (19).

Além desses fatores mencionados, a obesidade tem causa multifatorial, dentre elas estão à genética e os fatores endócrinos, incluindo os tratamentos nutricionais, farmacológicos e comportamentais, podendo estar relacionados ou não (11).

O tecido adiposo é responsável por secretar proteínas que são denominadas adipocinas ou citocinas. Estas desempenham um papel central na homeostase energética e vascular, bem como na imunidade.

Em meados de 1990, foi descrito que camundongos obesos com maior expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no TA apresentavam relação com a inflamação da obesidade e resistência à insulina. Após um ano, com a descoberta da leptina, adipocina secretada unicamente pelos adipócitos, observou-se que ela atuava como um hormônio controlador no balanço energético corporal e, assim, o TA foi efetivamente reconhecido como um órgão endócrino (20, 21). Muitas adipocinas estão envolvidas na inflamação do TA e na resistência à insulina, as quais são produzidas em excesso com o aumento da adiposidade corporal, promovendo assim complicações metabólicas (figura 2). Porém, existem aquelas que possuem papel antiinflamatório e estão relacionadas ao aumento da sensibilidade à insulina, como a adiponectina, a qual encontra-se reduzida na vigência de inflamação (22).

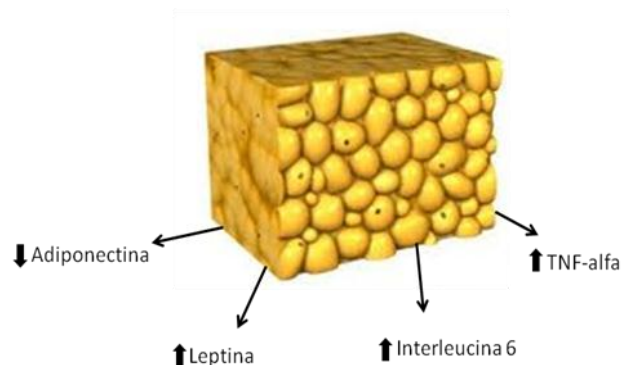
Os níveis circulantes de TNF-alfa são elevados em indivíduos obesos, além de ser abundante no TA desses indivíduos e expressos também pelos macrófagos (4, 23). O TNF-alfa é mediado por um fator de transcrição que está envolvido na inflamação e resistência à insulina, o chamado fator nuclear kappa b (NFkB). Essa via é ativada por muitos dos mesmos estímulos pró-inflamatórios, incluindo as citocinas. Assim, níveis baixos de NFkb e TNF-alfa causam um aumento significativo da utilização periférica da glicose em resposta à insulina, demonstrando que essa citocina está relacionada a resistência à insulina e DM2 (20, 24).

A leptina produzida no TA é secretada na circulação em níveis proporcionais à massa desse tecido, tendo influências pró-inflamatórias quando produzida em excesso. Também tem ação no sistema nervoso central, onde desempenha um papel importante regulando a ingestão alimentar, conseqüentemente o gasto energético e, com isso, o peso corporal, promovendo ainda, ativação do sistema nervoso simpático na termogênese (25, 26).

A adiponectina, uma citocina antiinflamatória, é uma proteína de 30 kDa produzida abundantemente pelo TA (27), Em contraste com a maioria das outras citocinas, a adiponectina está inversamente relacionada com o índice de massa corporal (IMC) (28), apresentando-se diminuída em indivíduos com DM2 e obesos, tal citocina também está envolvida com a insulina, promovendo sensibilidade à insulina (4).

Outra citocina inflamatória, a interleucina 6 (IL-6) é produzida por diferentes células, inclusive pelos adipócitos. Os níveis circulantes de IL-6 e a produção no TA estão aumentadas na obesidade, assim a resistência à insulina e suas complicações se relacionam também com esta citocina (29).

Figura 2 – Tecido adiposo e síndrome metabólica



Legenda: O tecido adiposo é capaz de secretar citocinas, na síndrome metabólica os níveis de citocinas inflamatórias aumentam causando diversas comorbidades, inclusive resistência à insulina.

Fonte: O autor, 2014.

Assim, ao longo das últimas duas décadas o conceito de tecido adiposo sofreu uma grande mudança, passando de um tecido de armazenamento de energia para um órgão endócrino ativo. O tecido adiposo se relaciona com órgãos centrais e periféricos, sintetiza e secreta uma série de moléculas. Os níveis dessas citocinas

correlacionam-se com estados metabólicos específicos e tem potencial para impactar diretamente sobre a homeostase metabólica. A desregulação dessas citocinas, além de estar presente na obesidade e DM2, atua também na hipertensão e em doenças cardiovasculares (30, 31).

1.2 Resistência à insulina e intolerância à glicose

A resistência à insulina não é uniforme em todos os tecidos, no entanto, é vista como situação patológica ao organismo. A mobilização das reservas de gordura e redução na demanda de glicose pelos tecidos não dependentes de glicose seria facilitada pela sinalização da insulina. No mundo moderno, o excedente crônico de energia combinado com a redução da atividade física resulta em excesso de gordura nos tecidos não adiposos e a inflamação do tecido adiposo, os quais contribuem para a resistência à insulina e aumento da obesidade, facilitando o desenvolvimento da intolerância à glicose (32, 33).

A insulina, um hormônio polipeptídico anabólico essencial produzido no pâncreas, foi descoberta em 1921 e é ativada pelo aumento dos níveis de glicose circulante (34). Está envolvida no aumento da captação periférica de glicose pelo tecido adiposo e muscular, relacionada com a degradação de proteínas, além da redução da lipólise e estímulo da lipogênese nos adipócitos, entre outros mecanismos (35).

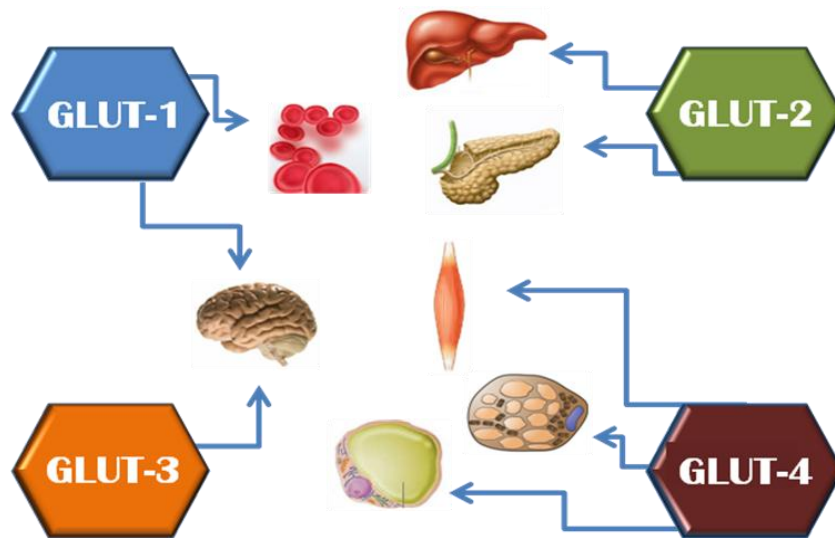
Em um organismo saudável, quantidades pequenas de insulina são secretadas no organismo após cada refeição, permitindo assim, o transporte de glicose para o interior das células. Na resistência à insulina ocorre uma diminuição da resposta das células à glicose e, como estas necessitam de glicose, o organismo compensa com maiores quantidades de insulina, resultando em um excesso de insulina circulante e estimulação exacerbada dos tecidos. Com o tempo, esse processo provoca um desequilíbrio com efeitos nefastos ao organismo (36).

A distribuição de glicose pelos tecidos tem o seu controle por meio da regulação de diferentes formas dos transportadores de glicose nos tecidos. Os transportadores de glicose (GLUTs) compreendem uma família de proteínas

integrals que permitem a difusão facilitada da glicose por meio da membrana plasmática (37, 38).

Todas as isoformas de GLUTs diferem entre si em relação à especificidade do substrato, do tecido em que são expressos e de suas propriedades cinéticas. Assim, são divididas em três subclasses: a classe I que é constituída pelos transportadores de glicose (1-4), que são diferenciados com base nas suas distribuições teciduais, como se observa na figura 3; a classe II que é composta pelo transportador específico da frutose, o GLUT-5, que está presente no intestino delgado, rins, testículo, músculo, tecido adiposo e cérebro, e três proteínas relacionadas (GLUT-7, GLUT-9 e GLUT-11); e a Classe III que é composta pelos GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10 e GLUT-12 (39, 40).

Figura 3 – Classe I dos GLUTs



Legenda: O GLUT-1 é expresso nos eritrócitos e nos microvasos cerebrais; o GLUT-2 no fígado e nas células-beta do pâncreas; o GLUT-3 nas células neuronais; e o GLUT-4 no músculo, no tecido adiposo branco e marrom.

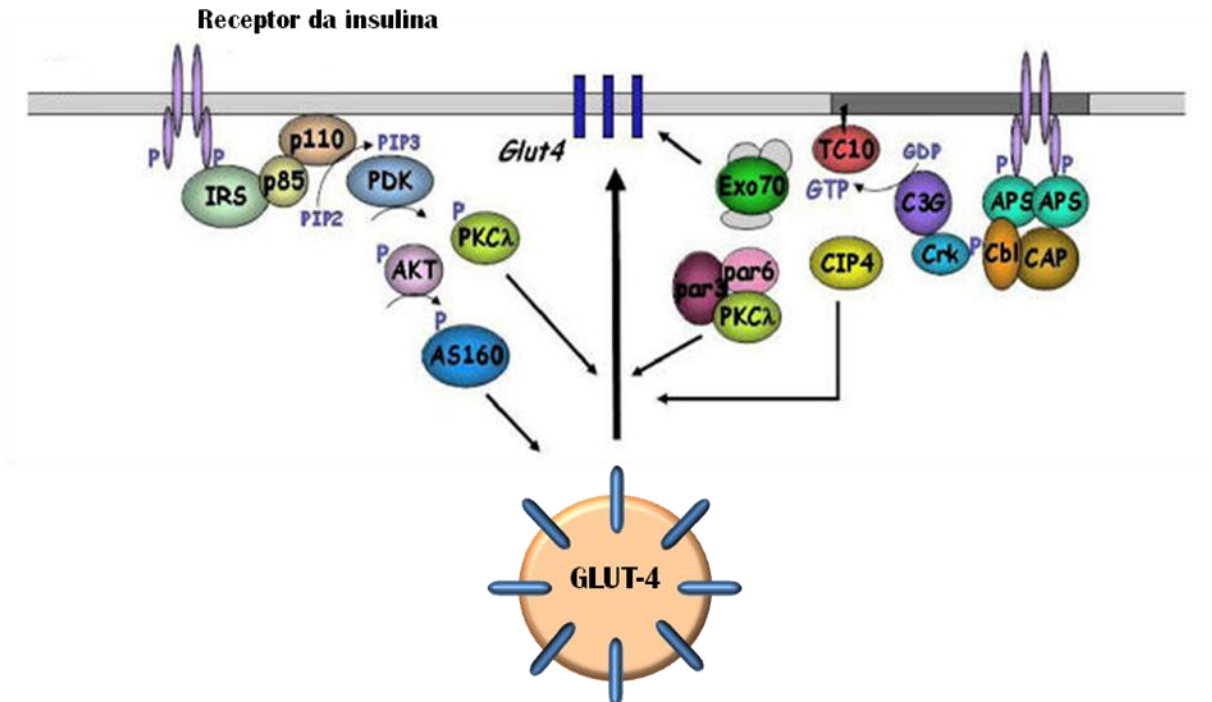
Fonte: O autor, 2014.

Um das vias mais importantes para a sinalização da insulina é a via PI3K, porém outros sinais são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose. Estes sinais envolvem a fosforilação do Cbl com associação da proteína adaptadora CAP. Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII, que está associada com a proteína C3G. A

C3G é uma proteína trocadora de nucleotídeos que ativa TC10, que causa um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT-4, em paralelo à ativação da via da PI3K (41, 42).

Assim, o estímulo da captação de glicose pela insulina no tecido adiposo e no músculo requer a translocação do GLUT-4, que se encontra localizado na membrana de vesículas intracelulares citoplasmáticas e da região perinuclear para a superfície celular. A ativação da proteína TC10 é essencial para a captação de glicose estimulada pela insulina (43, 44), figura 4.

Figura 4 - Via de sinalização da insulina



Legenda: Duas vias de sinalização são necessárias para a translocação dos transportadores de glicose pela insulina no tecido adiposo e no músculo. Após a ativação, TC10 estimula o GLUT-4 para a membrana.

Fonte: Adaptado de Chang, 2004.

Desse modo, a resistência à insulina juntamente com a intolerância a glicose, tornam-se uma característica marcante do DM2. Para estudos avaliativos da resistência à insulina, os índices simples baseados na medição de glicose e insulina, tanto no estado de jejum, como em resposta a um teste de tolerância à glicose, ou

insulina, é o *homeostasis model assessment-insulin resistance* (HOMA-IR), proporcionando dados que podem ser usados com confiança (45).

1.3 Ativação da termogênese e tecido adiposo marrom

O TAM é encontrado nas regiões subcutânea, intraperitoneal e sítios intratorácicos. A maior parte está na região interescapular, fazendo com que a parte superior do corpo seja um revestimento para aquecimento usado por baixo da pele. Depósitos intraperitoneais são encontrados principalmente em torno dos rins e glândulas supra-renais e os principais depósitos intratorácicos rodeiam os grandes vasos sanguíneos do coração, traquéia, esôfago e aorta (46).

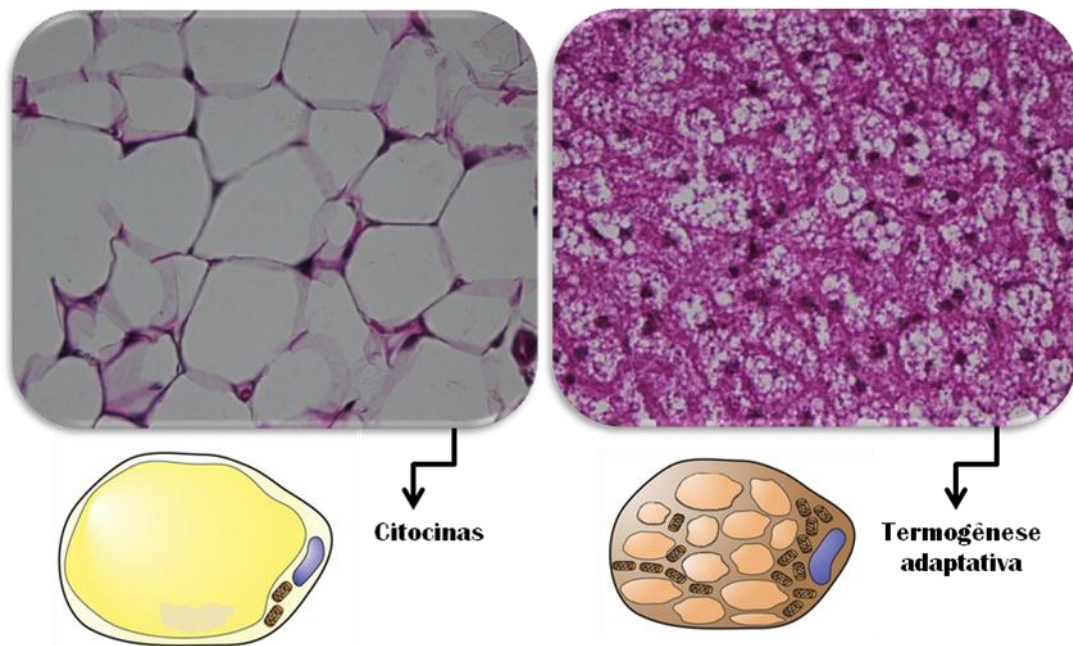
Em relação aos roedores, o que mais chama a atenção é o TAM interescapular (TAMi). O TAMi está organizado em dois lóbulos e tem como função primordial a dissipação de energia em forma de calor, conhecida como termogênese adaptativa. É densamente innervado para garantir oferta suficiente de oxigênio e substratos, além de redistribuir rapidamente o calor produzido para o corpo (47). A ativação é transmitida por nervos simpáticos pós-ganglionares que de forma independente innervam os dois lóbulos no TAMi. Estes nervos formam uma rede densa de fibras não mielinizadas dentro do tecido e, assim, podem atingir praticamente todas as células através da liberação da noradrenalina ou norepinefrina (48).

Os adipócitos marrons são caracterizados por apresentarem pequenas gotículas lipídicas (multilocular) em abundância, diferentemente dos adipócitos brancos, que possuem uma única gota lipídica (unilocular). Os adipócitos marrons apresentam ainda elevada quantidade de mitocôndrias, as quais conferem a cor amarronzada ao tecido (46, 49), figura 5.

É na mitocôndria que ocorre a respiração celular, sendo um fenômeno que consiste no processo de extração de energia acumulada nas moléculas de substâncias orgânicas. Nesse processo, verifica-se a oxidação de compostos orgânicos de alto teor energético, produzindo gás carbônico e água, além da liberação de energia, que é utilizada para as diversas formas de atividade celular. Na

respiração celular a molécula de glicose é degradada, originando substâncias mais simples. Essa quebra da molécula de glicose ocorre de forma gradativa e é através do processo aeróbio que a respiração acontece em três fases: a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória. É na respiração que grande parte da energia química liberada se transforma em calor (46, 50).

Figura 5 - Adipócitos



Legenda: Ao lado esquerdo uma fotomicrografia do TAB (unilocular), responsável pela produção de citocinas e abaixo a ilustração de um adipócito branco, no lado direito, uma fotomicrografia do TAM (multilocular), responsável pela termogênese adaptativa e abaixo uma ilustração de um adipócito marrom.

Fonte: O autor, 2014.

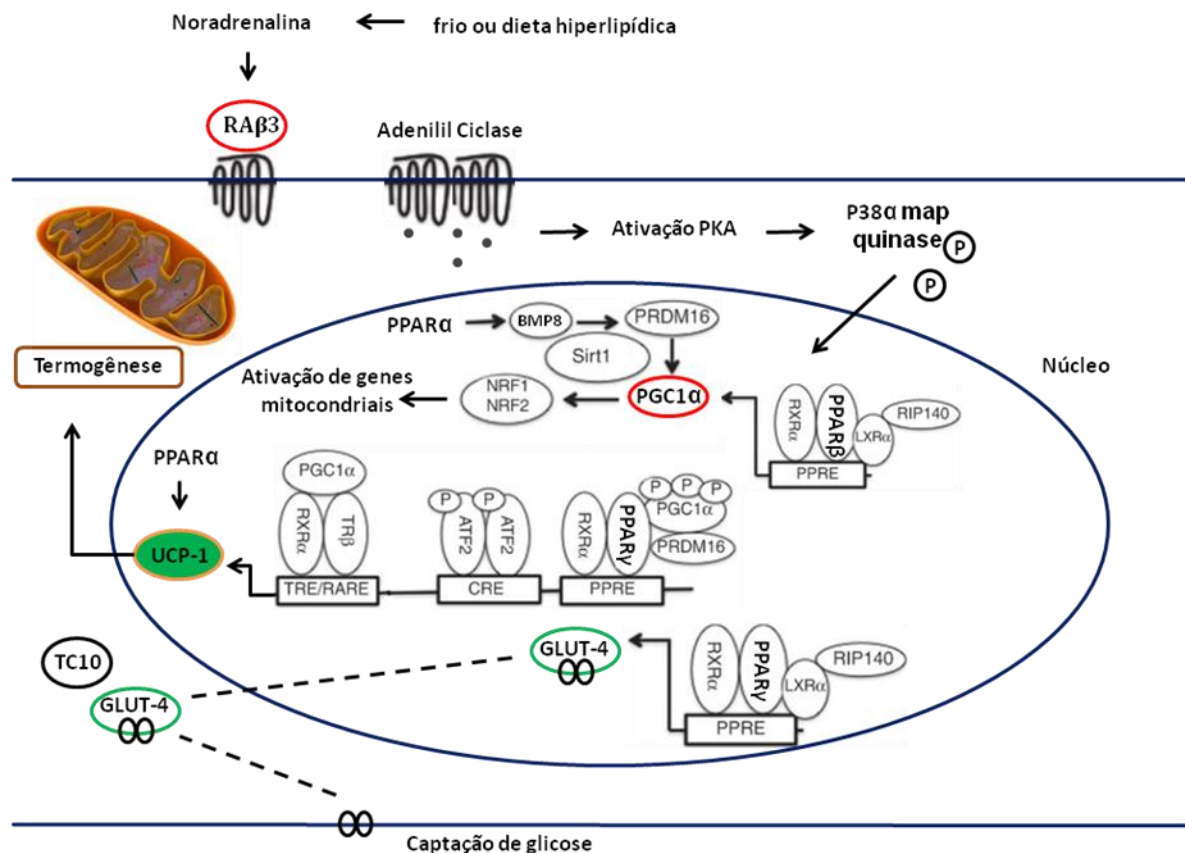
Atualmente está bem estabelecido que o vazamento de prótons nos adipócitos marrons é feita pela proteína desacopladora 1 (UCP-1), um membro da família de carreadores mitocondriais. A UCP-1 foi descoberta como uma proteína de ligação de nucleótidos de purina inserida na membrana mitocondrial interna, com peso molecular de 32 kD (51). A UCP-1 é de fato essencial para a função termogênica do TAM, e é encontrada exclusivamente nesses adipócitos. No estado ativado, a UCP-1 aumenta o vazamento de prótons e, assim, provoca o colapso da força motriz na membrana mitocondrial interna. Por desacoplamento, se torna responsável pela energia liberada em forma de calor (52, 53).

O mecanismo molecular do ácido graxo para induzir o desacoplamento de UCP-1 está intimamente ligado ao vazamento de prótons gerado. Possivelmente, a UCP-1 atua como um translocador direto que forma um canal com resíduos de aminoácidos carregados negativamente passando prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial. E assim, os ácidos graxos atuam como um cofator com o terminal carboxila servindo para fechar uma lacuna na cadeia de transporte de resíduos (54).

Roedores quando transferidos de uma temperatura ambiente para o frio (5 °C) sofrem vasoconstrição e uma ligeira queda na temperatura do corpo, resultando em redução da condutividade térmica e um aumento imediato na produção de calor para termorregulação através de tremores, além de ativar a termogênese adaptativa no TAM. Após a exposição ao frio ou dieta hiperlipídica, ocorre a liberação de noradrenalina, que ativa receptores adrenérgicos (RA) localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons. Existem três subtipos de RAβ conhecidos (β1, β2 e β3), porém o RAβ3 é o mais relevante para a ativação aguda da termogênese (55).

Este receptor é acoplado à proteína G, que ativa adenilil ciclase, uma enzima que converte o ATP para AMP cíclico, onde desencadeia diversos sinais que conduzem a ativação da proteína quinase A (PKA) até fosforilar P38-alfa map quinase. Assim, ocorre a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial. A ativação de PKA pelo RAβ3 através da cascata de sinalização leva um aumento da atividade lipolítica das gotículas lipídicas no adipócito marrom. Esses ácidos graxos atuam como combustível metabólico para a via de beta-oxidação mitocondrial, além de agirem como ativadores potentes de UCP-1 (56, 57), figura 6.

Figura 6 – Sinalização da termogênese



Legenda: Cascata de sinalização, induzida pelo frio ou dieta hiperlipídica, desencadeando uma série de reações para ativação da termogênese.

Fonte: Adaptado de Richard, 2010.

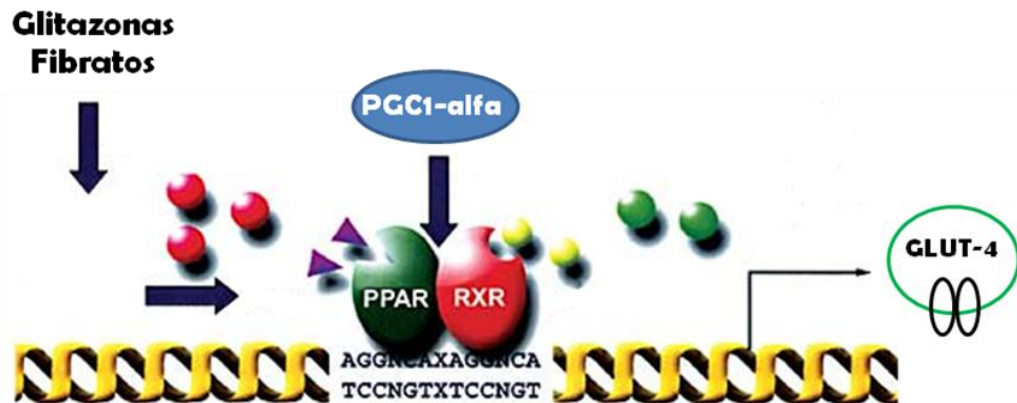
1.4 PPARs e Telmisartana

1.4.1 PPARs

Os receptores nucleares chamados de PPARs funcionam como sensores de lipídeos. Os PPARs formam um heterodímero com o receptor do retinóide X (RXR) que se liga a elementos de DNA reguladores, os elementos de resposta de proliferação perioxossomal (PPREs), e regulam a transcrição de uma variedade de genes, figura 7. Os PPREs foram detectados em diversos genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e balanço energético. Os ligantes naturais de PPAR pertencem a um grande grupo de substâncias lipofílicas e, além

disso, o PPAR possui ação bloqueadora em fatores de transcrição, como por exemplo o NFkB (6, 58).

Figura 7 – PPAR no núcleo



Legenda: Após ser ativado por seus ligantes, como as glitazonas e os fibratos, o PPAR heterodimeriza com o RXR no núcleo e se liga ao PPRE para fazer a transcrição.

Fonte: Adaptado de Duque, 2003.

Existem três isoformas de PPAR: alfa, beta/delta, e gama, que são expressos diferentemente em diversos tecidos. O PPAR-alfa foi o primeiro PPAR a ser descoberto, em 1990, sendo composto por 468 resíduos de aminoácidos. Está envolvido nos processos de oxidação, incluindo o metabolismo de ácidos graxos e vias vasculares, além de ser um agente anti-inflamatório (59-61). O PPAR-alfa é altamente expresso no músculo esquelético e fígado, que está correlacionado com a oxidação de ácidos graxos. Embora este fator de transcrição seja expresso em níveis baixos no TAB, o seu nível é altamente expresso no TAM, participando ativamente da termogênese (62). Na prática clínica, os agonistas de PPAR-alfa são os fibratos, que são utilizados para dislipidemia, diminuindo os níveis de triglicerídeos e aumentando os de HDL (63).

O PPAR-beta/delta foi descoberto em 1992 e possui 491 aminoácidos, pode ser encontrado em quase todos os tipos de células e tecidos, o que sugere a sua importância em todo o organismo. Os efeitos metabólicos do PPAR-beta/delta estão correlacionados com o aumento da oxidação dos ácidos graxos, o consumo de energia, termogênese adaptativa, além de participar da organogênese (64). Os

agonistas do PPAR-beta/delta não são atualmente utilizados na prática clínica, embora existam alguns estudos clínicos com agonista PPAR-beta/delta que mostram vantagens metabólicas especialmente em relação ao não ganho de peso e em modelos experimentais nota-se a melhora com a sensibilidade à insulina (65, 66).

O PPAR-gama, descoberto em 1995 possui 479 aminoácidos e é altamente expresso nos adipócitos, músculo esquelético, fígado e rim. É conhecido por regular a expressão dos genes que medeiam o metabolismo energético, tais como a diferenciação dos adipócitos e ação da insulina. O PPAR-gama está correlacionado com o aumento da sensibilidade à insulina, captação de glicose, adiponectina, e a absorção de ácidos graxos, além de estar envolvido na transcrição da UCP-1 (53, 67). Os agonistas para PPAR-gama são as tiazolidinodionas amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento de DM2. No entanto, o uso das tiazolidinedionas requer cuidados porque alguns destes fármacos apresentaram efeitos colaterais indesejáveis, tais como retenção hídrica, edema periférico e insuficiência cardíaca (68, 69).

1.4.2 Telmisartana

A telmisartana é um BRA no músculo liso vascular e na suprarrenal, bloqueando assim os efeitos vasoconstritores e da secreção da aldosterona da angiotensina II, mas também é um agonista parcial PPAR-gama. Já foi visto que além de ser um anti-hipertensivo, a telmisartana é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir a incidência do DM2 em pacientes com hipertensão sistólica sistêmica (70).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona tem como principal função a regulação da pressão sanguínea. A primeira ação da Angiotensina II ocorre no sistema circulatório, especificamente nas veias. As veias contêm 70% de todo o sangue do corpo e as células musculares lisas presentes no sistema venoso possuem receptores para a Angiotensina II. A angiotensina II tem como função a vasoconstrição, aumentando a pressão dentro do sistema. Assim, mais sangue chega ao coração do do direito. Depois de passar pela circulação pulmonar, há o

aumento de volume e a pressão chega ao coração esquerdo fazendo as células do miocárdio distenderem-se. Dessa maneira, há aumento do débito cardíaco e aumento da pressão sistólica (71).

A disfunção da angiotensina II ou da insulina pode levar ao desenvolvimento de doenças, muitas vezes associadas, como o DM2 e a hipertensão arterial sistêmica. Estudos mostram que a sinalização intracelular de insulina e angiotensina II influenciam um ao outro. Esta comunicação molecular ocorre em diferentes etapas da sinalização celular e é importante para vários fenômenos fisiológicos. No nível extracelular, a enzima de conversão de angiotensina regula a síntese de angiotensina II e o acúmulo de bradicinina, e ambos desempenham papel regulador sobre a sinalização da insulina. E no nível intracelular, a angiotensina II, atua através da cascata JAK-2/IRS-1/PI3-quinase, JNK e ERK, provocando a fosforilação em serina e a conseqüente inibição de elementos chave da via de sinalização da insulina (72).

Considerando que os agonistas totais do PPAR-gama, como a rosiglitazona e a pioglitazona, promovem ganho de peso, os agonistas parciais têm a capacidade de impedir o ganho de peso, e promover a diferenciação dos adipócitos em roedores (73), além de melhorar os sintomas da SM em humanos (74).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos pleiotrópicos da telmisartana, mediados por uma possível ação pan-PPAR, no tecido adiposo branco e marrom em um modelo experimental de obesidade induzida por dieta.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito da telmisartana sobre:

- a) a expressão das três isoformas de PPARs no tecido adiposo branco e marrom;
- b) o parâmetro morfológico do tecido adiposo branco;
- c) a termogênese do tecido adiposo marrom através da expressão proteica e gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dietas

Foram utilizados 40 camundongos machos, da linhagem C57BL/6, com três meses de idade, oriundos do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais foram mantidos em ciclo invertido claro/escuro (12h/12h), umidade ($60\pm 10\%$) e temperatura ambiente ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de exaustão de ar (15min/h) controlados. Os protocolos de experimentação e manuseios foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro que foi aprovado com o número 054/2012. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes tradicionais para experimentação com animais, “Guia para o uso de cuidado de animais de laboratório” (Publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1996, USA). Os animais foram agrupados em cinco e mantidos em caixas, com acesso livre à comida e à água e foram avaliados no que diz respeito às condições de saúde e aceitação da dieta diariamente.

Os animais receberam dieta padrão (*standard-chow*, total energético de 15 kJ/g) ou dieta rica em gordura saturada pelo acréscimo de banha de porco (*high-fat*, total energético de 21 kJ/g) de acordo com as normas do Instituto Americano de Nutrição (AIN93M) (75). As dietas foram produzidas pela empresa PragSoluções (Jau, São Paulo, Brasil) e a composição está demonstrada na Tabela 1.

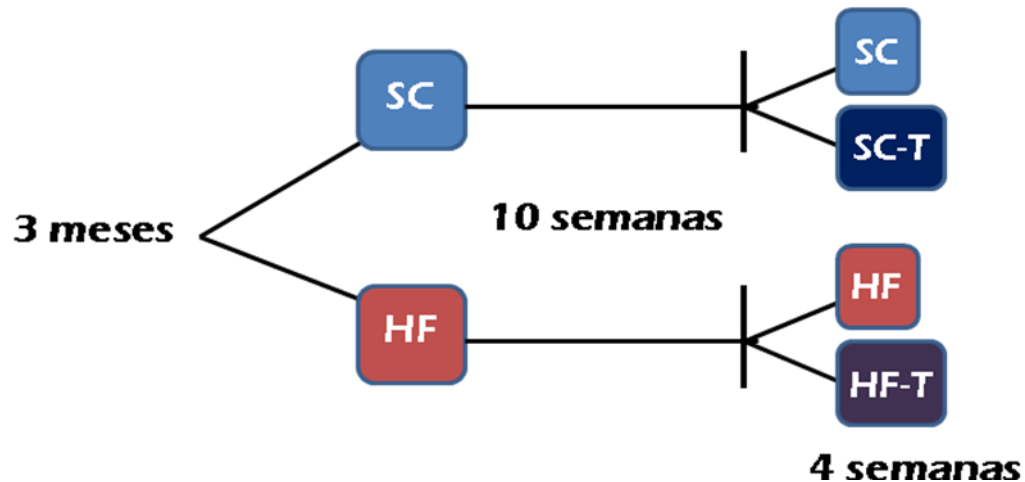
Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais

Ingredientes	Dieta (g/kg)	
	SC	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 (kJ/g)	15	21
Carboidrato (% Energia)	76	36
Proteína (% Energia)	14	14
Gordura (% Energia)	10	50

Após o período de dez semanas da administração das dietas experimentais, o tratamento com o fármaco iniciou-se e estendeu-se por quatro semanas (figura 8). A telmisartana (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi adicionada às dietas na dose de 10mg/kg. Os camundongos alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos que seguem:

- a) **Grupo SC** (n = 10), não tratado;
- b) **Grupo SC-T** (n = 10), dieta padrão com telmisartana (10mg/kg/dia);
- c) **Grupo HF** (n = 10), não tratado;
- d) **Grupo HF-T** (n = 10), dieta hiperlipídica com telmisartana (10mg/kg/dia).

Figura 8 - Esquema do desenho experimental



Legenda: Aos três meses de idade os camundongos machos foram divididos em dois grandes grupos, um grupo que recebeu dieta padrão (SC) e outro que recebeu dieta hiperlipídica (HF). Após dez semanas de administração da dieta, esses grupos foram redivididos perfazendo quatro grupos, o grupo SC, o grupo SC-T, que recebeu tratamento, o grupo HF e o grupo HF-T que recebeu tratamento. O tratamento com telmisartana durou quatro semanas.

Fonte: O autor, 2014.

A dose de telmisartana administrada (10mg/Kg) durante o tratamento foi baseada em estudos prévios com roedores com o objetivo de ativar PPAR-gama (11, 12). Quando comparados com estudos epidemiológicos, os estudos experimentais utilizam doses de fármacos acima das recomendações. Todavia, Regan-Shaw *et al.* (76) apontam uma transposição de dose por um método alométrico que permite o cálculo de doses de medicamentos em várias espécies comparando-as à dose humana. Para este cálculo, utiliza-se o fator K_m do animal que é obtido pela massa corporal (Kg)/área da superfície corporal (m^2). Desta forma, quando comparamos a dose utilizada (10mg/Kg) com a dose empregada em humanos (40-80mg/dia) observamos que a dose escolhida foi menor que a utilizada na clínica, não indicando uma superdosagem dos animais.

A fórmula para o cálculo da dose é apresentada a seguir:

$$\text{Dose Humana (mg/Kg)} = \text{Dose animal (mg/Kg)} \times (\text{Km do animal/Km do humano})$$

Sendo:

- a) Dose Humana (mg/Kg) = Entre 0,67 e 1,33 (40 e 80 mg/dia considerando um adulto de 60kg)
- b) K_m do animal ≈ 3 (0,02Kg/0,007m²)
- c) K_m do humano adulto ≈ 37 (60Kg/1,6m²)

Então:

$$1,33 \text{ mg/Kg} = \text{Dose animal (mg/Kg)} \times (3/37)$$

$$\text{Dose animal (mg/Kg)} = 1,33\text{mg/Kg}/0,08$$

$$\text{Dose máxima para animais} \approx 16,6 \text{ mg/Kg}$$

$$0,67 \text{ mg/Kg} = \text{Dose animal (mg/Kg)} \times (3/37)$$

$$\text{Dose animal (mg/Kg)} = 0,67\text{mg/Kg}/0,08$$

$$\text{Dose mínima para animais} \approx 8,37 \text{ mg/Kg} \text{ — Dose utilizada —} \longrightarrow \mathbf{10\text{mg/kg}}$$

Desta forma, a dose administrada nos animais se torna compatível com a dose em humanos, tornando o nosso estudo translacional.

3.2 Massa corporal e ingestão alimentar

Ao longo de todo experimento, a MC dos animais foi aferida semanalmente em balança de precisão 0,1g (Marte A-1500), às segundas feiras (10 horas da manhã). O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente e a ingestão energética foi obtida através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em kJ da respectiva dieta.

3.3 Pressão arterial Sistólica (PAS)

Para minimizar o estresse, os animais foram previamente adaptados durante duas semanas antes do início da verificação da PAS. Posteriormente, a PAS foi

mensurada semanalmente, através do método não invasivo de pletismografiada artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha). A média de três aferições em cada momento foi utilizada.

3.4 Calorimetria indireta

Na última semana de tratamento, o quociente respiratório (QR) foi medido utilizando o sistema Oxylet (Panlab/Harvard, Barcelona, Espanha), que avalia o metabolismo respiratório por meio da calorimetria indireta. O sistema é composto por quatro câmaras arquitetadas para o monitoramento contínuo de até quatro camundongos simultaneamente, com livre acesso a comida e água. O QR estima a utilização dos substratos (carboidrato ou lipídeo) para a produção de energia e foi calculado pela razão entre o VO_2 e VCO_2 . Os dados de aclimação foram excluídos das análises. Os dados foram recolhidos durante um período de 26 horas (a cada 15 minutos, sendo três minutos para cada gaiola).

3.5 Teste de tolerância oral à glicose

Ao final do experimento, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose (TOTG). Para este procedimento foi administrada uma quantidade de glicose conhecida (1g de glicose/Kg), após os animais passarem por um período de 6 horas de jejum, por gavagem orogástrica. A amostra de sangue foi obtida por ordenha a partir da ponta da cauda. A glicemia foi aferida com auxílio do glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) nos tempos zero (jejum) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose.

A ASC foi calculada (u.a.) para considerando o tempo total de zero a 120 minutos. Para tanto, utilizou-se a ferramenta do programa GraphPad Prism (versão 6.02 para Windows, GraphPadSoftware, CA, EUA) com objetivo de avaliar a intolerância à glicose.

3.6 Sacrifício

Após seis horas de jejum, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Thiopental, o tórax foi exposto e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do átrio direito para análises. O tecido adiposo branco retroperitoneal, epididimal, inguinal e o tecido adiposo marrom interescapular foram dissecados e pesados, fixados em formalina de Millonig e processados para microscopia de luz, além do congelamento (-80°C) para *Western blot* e PCR em tempo real.

3.7 Extração dos tecidos

Depois de 14 semanas de dieta (incluindo as quatro semanas de tratamento), os animais foram mantidos em jejum por seis horas e, em seguida, foram profundamente anestesiados (pentobarbital de sódio, 150mg/kg via intraperitoneal). Amostras de sangue foram coletadas e o plasma foi separado por centrifugação (120g durante 15min), este foi usado para medir a glicose e armazenados a -80 ° C até a realização de outras análises. A gordura inguinal localizada entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa foi considerada gordura subcutânea. A gordura retroperitoneal (ligado à parede abdominal posterior perto dos rins e a porção abdominal dos ureteres) e a gordura epididimal (localizada na parte inferior do abdômen e ligado ao epidídimo) foram consideradas gordura intra-abdominal, o TAMi foi obtido por meio de dissecação meticulosa da região interescapular . Portanto, após os animais serem mortos, a gorduras subcutânea, intra-abdominal e marrom foram cuidadosamente dissecadas e pesadas . O índice de adiposidade foi determinado com a razão entre a soma das gorduras intra-abdominal e subcutânea, dividido pelo total da MC, apresentado como porcentagem.

3.8 Análise plasmática

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120g por 15min) e estocado em freezer -80°C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de insulina, leptina, interleucina 6 e adiponectina foram mensuradas através dos painéis de imunoensaio específico para camundongos (MADPK-71K-07 e MADPK-71K-ADPN, Millipore, Multiplex, MA, EUA).

O cálculo do HOMA-IR (“*homeostasis model assessment-insulin resistance*”) foi realizado com a glicemia de jejum (mmol/L) multiplicado pelo nível de insulina em jejum (mIU/mL), dividido por 22,5 (77).

3.9 Tecido adiposo branco

3.9.1 Morfometria

O TAB epididimal foi fixado em formalina tamponada preparada em 4% w/v 0,1M, em tampão fosfato com pH 7,2 durante quarenta e oito horas e, em seguida, incorporado em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seccionado em 5 um e corado com hematoxilina-eosina. Dez campos microscópicos não consecutivos foram analisados por animal usando um microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus America Inc., Miami, EUA) e imagens digitais foram tiradas (formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels). Foram medidos, pelo menos, 50 adipócitos por animal para calcular o diâmetro médio (Imagem Pro mais software versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) (78).

3.10 **Western blot**

Os depósitos de gordura branca epididimária (100mg) e o tecido adiposo marrom (30mg) foram adicionados ao tampão de lise RIPA (Tris-NaCl) com inibidor

de protease, homogeneizados e centrifugados (10000 g durante 30 minutos a 4 °C) para posterior quantificação da concentração proteica (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific). Após desnaturação (cinco minutos a 100 °C), quantidades iguais de proteínas (~30-80µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência *semi-dry*. A membrana foi então bloqueada por incubação em 6% (w/v) de leite em pó desnatado Molico®, diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] em temperatura ambiente, durante uma hora para evitar ligações inespecíficas.

Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário overnight, a 4°C para: Adiponectina (A6354, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), leptina (L3410, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), NFκB (SC-109, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e TNF alpha (SC-1350, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) para TAB e RAβ3 (SC-1473, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e UCP-1 (SC-6529, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), para TAM e PPAR alfa (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), PPAR gama (SC-7273, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), TC10 (T8950, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e GLUT4 (07-1404, Millipore, California, EUA) para ambos os tecidos. No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para sua origem. A reação foi revelada por quimioluminescência e as imagens obtidas com o sistema ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade da banda foi quantificada usando o software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA).

O complexo de ligação do anticorpo foi retirado e a membrana foi remarcada com beta-actina (SC81178, Santa Cruz Biotechnology), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos pelo *Western blot*.

3.11 RT- PCR em tempo real

Parte do TAB (30mg) e TAM (30mg) tiveram seu RNA total extraídos utilizando 700µl de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Em seguida, adicionaram-se 100µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 RPM, durante dez minutos a 4°C),

retirou-se o sobrenadante da fase aquosa, que corresponde ao RNA. A esse, adicionaram-se 250 μL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (11.200 RPM, durante 10 minutos a 4 °C) e formação de um pellet de RNA. Então, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspensando com 500 μL de etanol 70% e seguido de centrifugação (11.200 RPM, durante cinco minutos a 4°C). O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspensado em 40 μL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1 μg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, USA). Os primers foram gerados utilizando o software online Primer3, e estão indicados na Tabela 2. Os controles endógenos beta-actina, GAPDH e TBP foram utilizados para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95°C), foram realizados 44 ciclos, cada ciclo consistindo em 95°C durante 10s e 60°C durante 15s, seguidos por uma curva de melting (60 a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que ΔC_T expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos.

Tabela 2 - Sequência dos *primers*

Genes	5'-3'	Primers
Beta-actina	FW	CTCCGGCATGTGCAA
	RV	CCCACCATCACACCCT
GAPDH	FW	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
	RV	GGATGCAGGGATGATGTTCT
PPAR-alfa	FW	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT
	RV	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
PPAR-beta/delta	FW	TGGAGCTCGATGACAGTGAC
	RV	GGTTGACCTGCAGAYGGAAT
PPAR-gama ₂	FW	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT
	RV	CATCGAGGACATCCAAGACA
RA β 3	FW	ACAGGAATGCCACTCCAATC
	RV	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG
TBP	FW	CAGCCTTCCACCTTATGCTC
	RV	CCGTAAGGCATCATTGGACT
UCP-1	FW	TCTCAGCCGGCTTAATGACT
	RV	TGCATTCTGACCTTCACGAC

Abreviações: GAPDH, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PPAR, receptores ativadores de proliferação peroxissomal alfa, beta/delta e gama isoforma 2; RA β 3, receptor adrenérgico beta 3; TBP, TATA box binding protein; UCP-1, proteína desacopladora.

3.12 Análise estatística

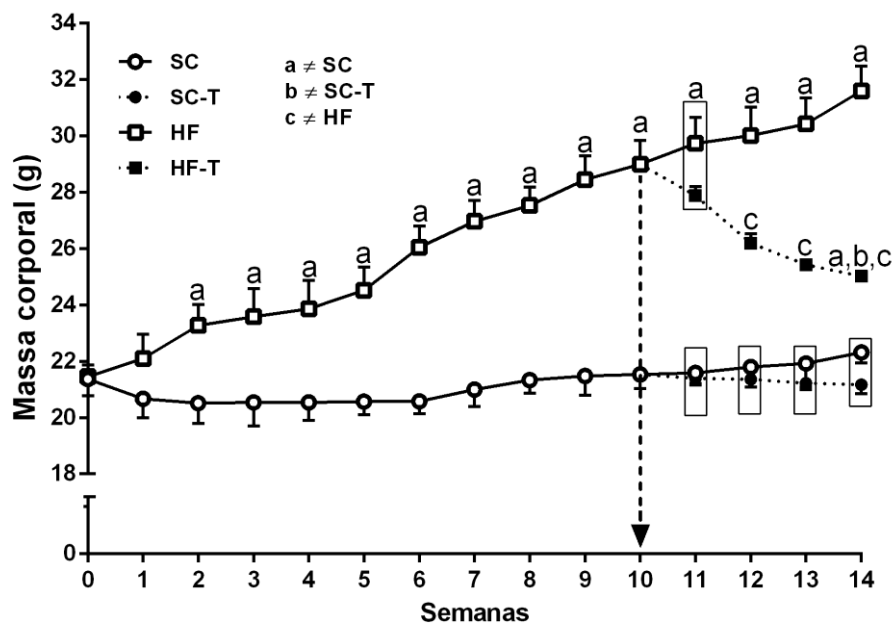
Diferenças nos dados quantitativos foram testados para distribuição normal e analisados por ANOVA com pós-teste de Holm Sidak. Em todos os casos foi usado o índice de significância menor ou igual a 0,05 (GraphPadPrism 6.01, CA, EUA), sendo os resultados expressos com média e erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal

No início do experimento, o grupo SC tinha MC de $21,93 \pm 0,7g$ (média \pm EPM) e o grupo HF tinha uma MC de $22,92 \pm 0,7g$, sem diferença significativa entre os grupos. Depois de duas semanas com suas respectivas dietas experimentais, o grupo HF demonstrou maior MC do que o grupo SC (+16%, $P < 0,05$) e a diferença na MC continuou a aumentar durante as 10 semanas de dieta (+34%, $P < 0,001$). No final do protocolo experimental (após quatro semanas de tratamento), o grupo HF-T mostrou diminuição significativa da MC (-24%, $P < 0,0001$) quando comparado ao grupo HF. O grupo SC-T não teve diferença estatística significativa em relação ao grupo SC, conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9 - Evolução da MC no período experimental



Legenda: Primeiras semanas (um a dez) correspondem ao período de indução da obesidade, e as semanas posteriores (dez a quatorze) correspondem à fase de tratamento. Os valores são apresentados como médias \pm EPM, $n = 5$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T; c \neq HF, conforme determinado pelo one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

A ingestão alimentar em gramatura não apresentou diferença entre os grupos SC, SC-T e HF, mas o HF-T diminuiu sua ingestão alimentar ($P < 0,01$) em relação aos demais grupos. Convertendo para a energia que as dietas forneceram, com base em sua densidade energética, dieta padrão (15,884 KJ/g) e dieta hiperlipídica (20,90 KJ/g), percebeu-se que o grupo HF apresentou uma ingestão energética maior em relação aos demais grupos SC, SC-T e HF-T ($P < 0,01$), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Ingestão alimentar e energética

Grupos	Ingestão alimentar (g/animal/dia)	Ingestão energética (kJ/animal/dia)
SC	2,30 ± 0,03	7,31 ± 0,47
SC-T	2,09 ± 0,04	6,64 ± 0,57
HF	2,20 ± 0,05	9,20 ± 1,09 ^[a]
HF-T	1,73 ± 0,13 ^[a,b,c]	7,24 ± 2,61 ^[c]

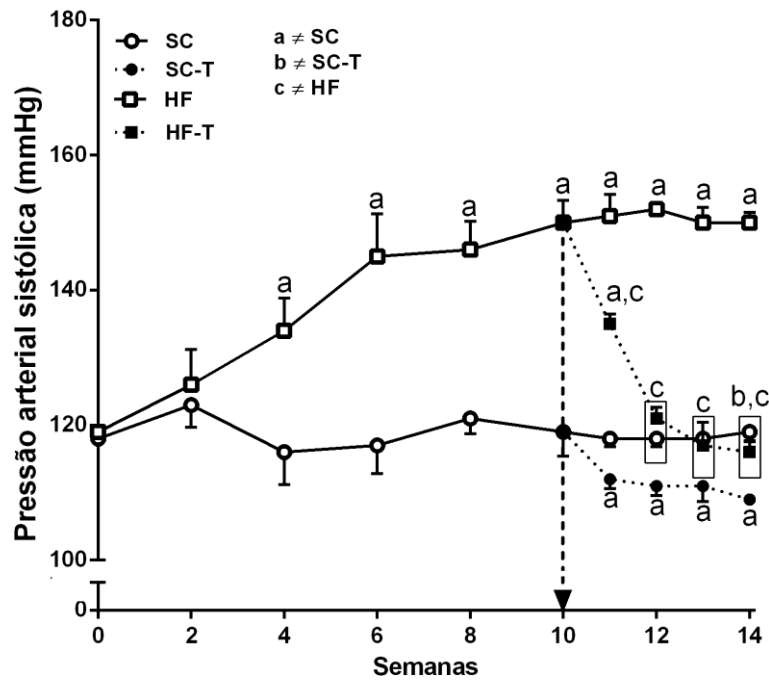
Legenda: Valores representados como média ± EPM, n=5 por grupo. $P < 0,05$ quando comparado com o grupo SC [a], SC-T [b] e HF [c] (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak).

4.2 Pressão arterial sistólica

A partir da quarta semana de administração da dieta hiperlipídica (HF) observou-se elevação na (PAS) em comparação ao grupo SC (+15%, $P < 0,01$), a qual se manteve alta até o final do experimento. No período de tratamento foi observado que o grupo HF-T apresentou redução de 23% na PAS ($P < 0,001$), quando comparado ao grupo HF se assemelhando ao grupo SC. O grupo SC-T teve

uma redução de 8% ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo SC, conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10 - Evolução da pressão arterial sistólica



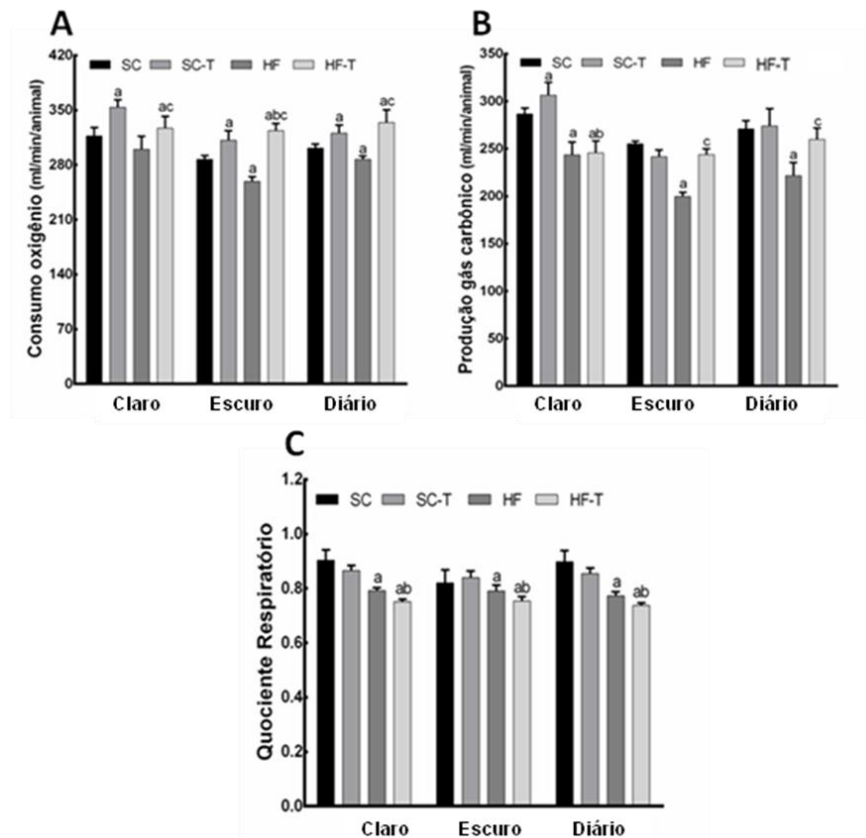
Legendas: Primeiras semanas (um a dez) correspondem ao período de indução da obesidade, e as semanas posteriores (oito a quatorze) correspondem à fase de tratamento. Os valores são apresentados como médias \pm EPM, $n = 5$. Diferenças significativas entre os grupos são indicados com os símbolos ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T e c \neq HF, conforme determinado pelo *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak.

4.3 Calorimetria indireta

As análises por calorimetria indireta, observadas através do consumo de VO_2 e produção de VCO_2 , indicaram diminuição tanto no consumo de O_2 quanto na produção de CO_2 no grupo HF quando comparado ao grupo SC ($P < 0,05$). O consumo de O_2 e produção de CO_2 foram aumentados em ambos os grupos que receberam tratamento em comparação com os seus respectivos controles ($P < 0,01$). Animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram redução significativa no

QR, quando comparado com animais alimentados com dieta padrão, esta redução foi ainda maior no grupo HF-T ($P<0,05$), figura 11.

Figura 11 – Calorimetria indireta

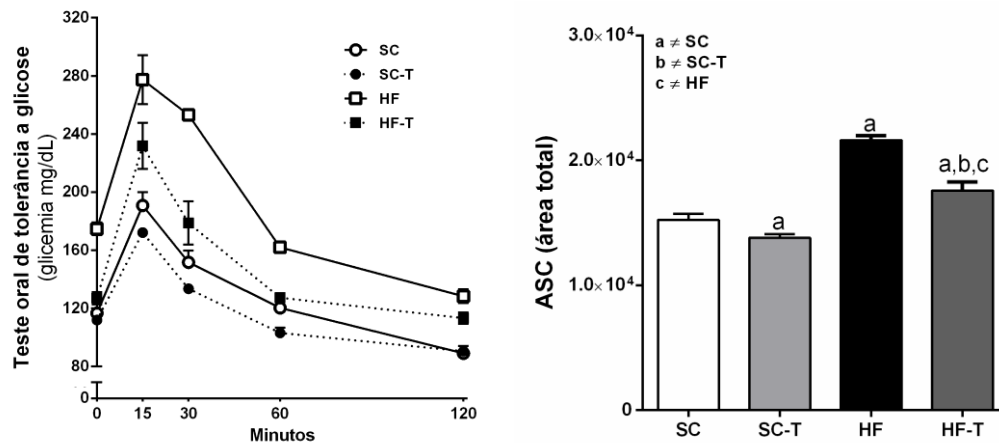


Legenda: Valores representados como média \pm EPM, $n=5$ por grupo. $P<0,05$ quando comparado com o grupo SC [a], SC-T [b] e HF [c] (*one-way ANOVA* e pós-teste de Holm-Sidak).

4.4 Tolerância à glicose

No que tange ao perfil glicídico, o grupo HF (glicemia de jejum: 174,8 mg/dL) apresentou maior ASC no TOTG com diferença significativa quando comparado ao grupo SC (116,8 mg/dL), $P<0,0001$. O grupo HF-T (127,2 mg/dL) apresentou redução deste parâmetro quando comparado ao HF ($P<0,001$). Da mesma forma, o grupo SC-T (112,0 mg/dL) também apresentou diminuição deste parâmetro quando comparado ao grupo SC, ambos visualizados na figura 12.

Figura 12 – Tolerância à glicose



Legenda: Curva do TOTG na 13ª semana e área sob a curva correspondente (média ± EPM), onde $P < 0,05$ quando comparado ao SC ≠ a, SC-T ≠ b, HF ≠ c, n=5.

4.5 Parâmetros metabólicos

Os animais do grupo HF apresentaram hipoadiponectinemia em relação ao grupo SC ($P < 0,001$, tabela 5) e o tratamento com telmisartana elevou os níveis plasmáticos de adiponectina nos grupos SC-T e HF-T em relação aos seus respectivos controles ($P < 0,05$). Uma vez que a adiponectina atua como agente sensibilizador à ação da insulina, os resultados obtidos pelas análises do metabolismo da glicose estão em conformidade. Ou seja, os animais alimentados com a dieta hiperlipídica tiveram níveis elevados de insulina plasmática e HOMA-IR ($P < 0,0001$), em relação ao grupo SC. Porém, o grupo HF-T apresentou esses parâmetros reduzidos. Os grupos SC e SC-T não tiveram diferença estatística. Além disso, o HOMA-IR indicou um aumento da RI no grupo HF quando comparado ao grupo SC (+429%, $P < 0,0001$) e o tratamento com telmisartana melhorou este parâmetro no grupo HF-T (-46%, $P < 0,001$). Quanto aos níveis de leptina, estes foram maiores no grupo HF quando comparado ao grupo SC ($P < 0,0001$) e o tratamento fez com que o grupo HF-T reduzisse esse parâmetro quando comparado ao grupo HF ($P < 0,001$). Esses achados estabelecem relação com os resultados de MC, ingestão alimentar e sensibilidade à insulina, todos os efeitos estão envolvidos com ação da leptina.

Tabela 4 - Hormônios e perfil glicídico

	SC	SC-T	HF	HF-T
Hormônios				
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	7,95±0,79	10,21±0,34 ^[a]	3,14±0,70 ^[a]	5,76±0,62 ^[a,b,c]
Leptina (pg/mL)	2223±767	1716±280	19396±1355 ^[a]	6823±970 ^[a,b,c]
Interleucina 6 (pg/mL)	9,78±1,49	7,69±1,06	35,95±2,82 ^[a]	19,87±1,09 ^[a,b,c]
Perfil glicídico				
Glicemia (mg/dL)	117±1,39	105±3,02 ^[a]	174±4,37 ^[a]	130±3,67 ^[a,b,c]
Insulina (μIU/L)	12,60±1,24	15,29±3,40	46,97±3,92 ^[a]	33,84±2,71 ^[a,b,c]
HOMA-IR	3,69±0,51	4,24±0,98	19,54±2,33 ^[a]	10,47±0,89 ^[a,b,c]

Legenda: Os valores estão apresentados como média ± EPM, n = 5 por grupo. $P < 0,05$ quando comparado com os grupos SC [a], SC-T [b] e HF-T [c] (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak).

4.6 Tecido adiposo branco

4.6.1 Biometria e morfologia

Como apresentado na tabela 5, o grupo HF apresentou maior índice de adiposidade e maior razão entre a gordura intra-abdominal e subcutânea quando comparado ao grupo SC. O grupo HF-T reverteu esses parâmetros se igualando aos grupos que receberam dieta padrão. O grupo SC-T não apresentou diferença quando comparado ao grupo SC.

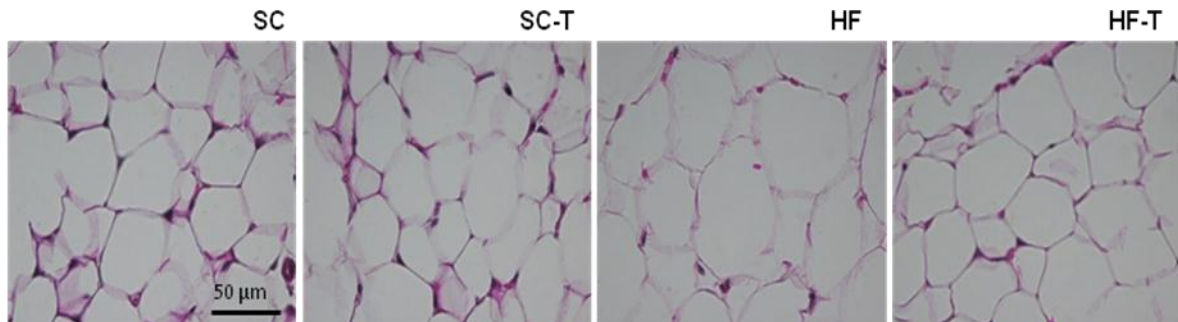
Tabela 5 – Parâmetros do tecido adiposo branco

Dados	SC	SC-T	HF	HF-T
Razão gordura intra-abdominal/subcutânea	4,86±0,21	4,83±0,44	7,89±0,55 ^[a]	5,01±0,40 ^[c]
Índice de adiposidade (%)	2,94±0,15	2,69±0,90	6,04±0,63 ^[a]	3,07±0,98 ^[c]
Diâmetro do adipócito (µm)	44,59±2,42	41,68±2,50	66,57±3,76 ^[a]	54,70±1,67 ^[a,b,c]

Legenda: Valores representados com média e EPM, n=5 por grupo, $P<0,05$ quando comparado com o grupo SC [a], grupo SC-T [b] e grupo HF [c] (one-way ANOVA e pós teste de Holm-Sidak).

No aspecto morfométrico, associado aos dados já apresentados, a análise das imagens realizadas pela microscopia de luz avaliando a morfometria dos adipócitos da gordura epididimal, percebe-se hipertrofia nos adipócitos com aumento do diâmetro no grupo HF (66,57µm) quando comparado com o grupo SC (44,59 µm), $P<0,001$ e uma redução do grupo HF-T (54,70µm) quando comparado ao grupo HF, $P<0,05$. Enquanto que o grupo SC-T (41,68µm) não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo SC (figura 13).

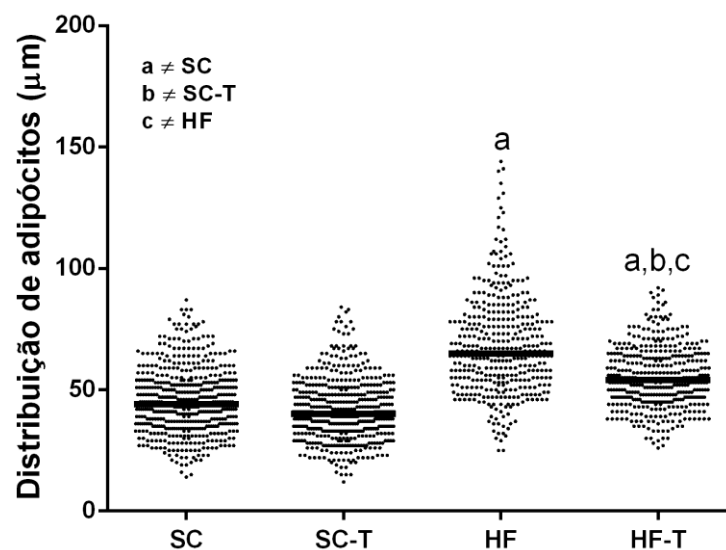
Figura 13 - Diâmetro médio dos adipócitos



Legenda: Morfometria dos adipócitos do TAB epididimal, fotos representativas nos grupos SC, SC-T, HF e HF-T.

Em relação à distribuição do diâmetro dos adipócitos, o grupo HF apresentou maior número de adipócitos aumentados quando comparado ao grupo SC ($P < 0,0001$), devido à hipertrofia desses adipócitos. No entanto, o grupo HF-T apresentou maior quantidade de adipócitos menores do que o grupo HF ($P < 0,0001$). Os grupos que receberam dieta padrão não apresentaram diferença estatística. O diâmetro dos adipócitos pode ser observado na figura 14.

Figura 14 – Distribuição do diâmetro dos adipócitos



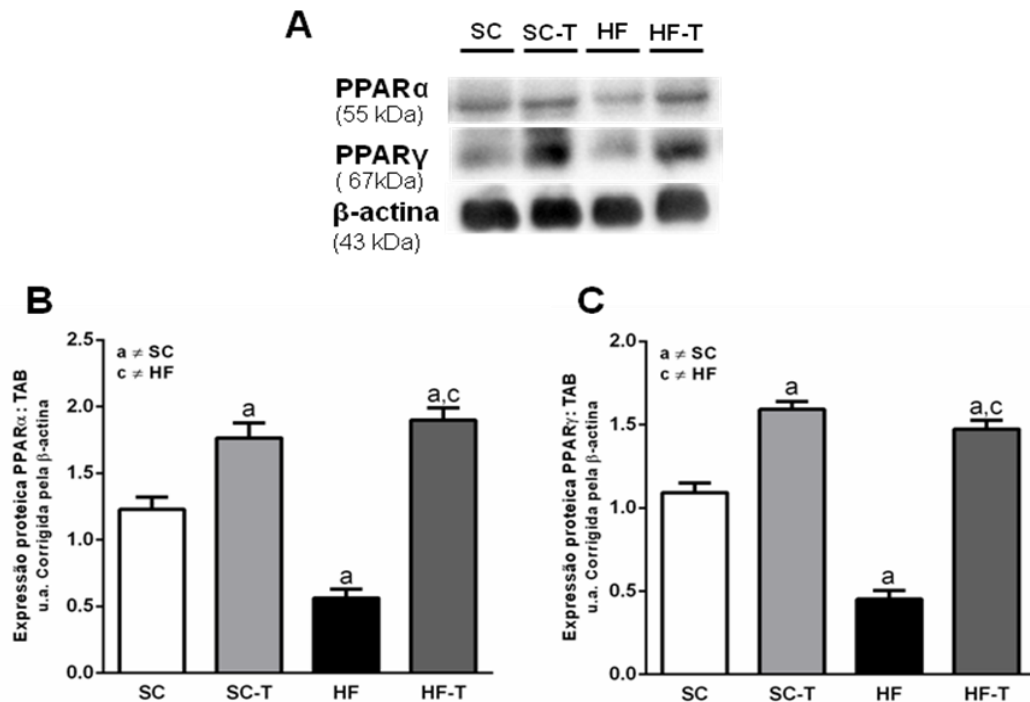
Legenda: Distribuição do diâmetro dos adipócitos com mediana (barra preta). $n=5$ por grupo, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo SC [a], grupo SC-T [b] e grupo HF [c] (one-way ANOVA e pós teste de Holm-Sidak).

4.6.2 Western blot

Os níveis proteicos do grupo SC, SC-T, HF e HF-T foram expressos após normalização pela proteína constitutiva beta-actina, utilizada como controle interno das amostras.

Houve um aumento da expressão das duas isoformas de PPARs (alfa e gama) que foram ativadas em ambos os grupos tratados, quando comparados com seus respectivos controles, no grupo SC-T (+43% e +51%, respectivamente, $P < 0,001$) e no grupo HF-T (+237% e +196%, respectivamente, $P < 0,0001$). O grupo HF teve menor expressão das duas isoformas quando comparado com o grupo SC (-54% e -73%, respectivamente, $P < 0,001$), figura 15.

Figura 15 - Nível proteico de PPAR-alfa e PPAR-gama no TAB

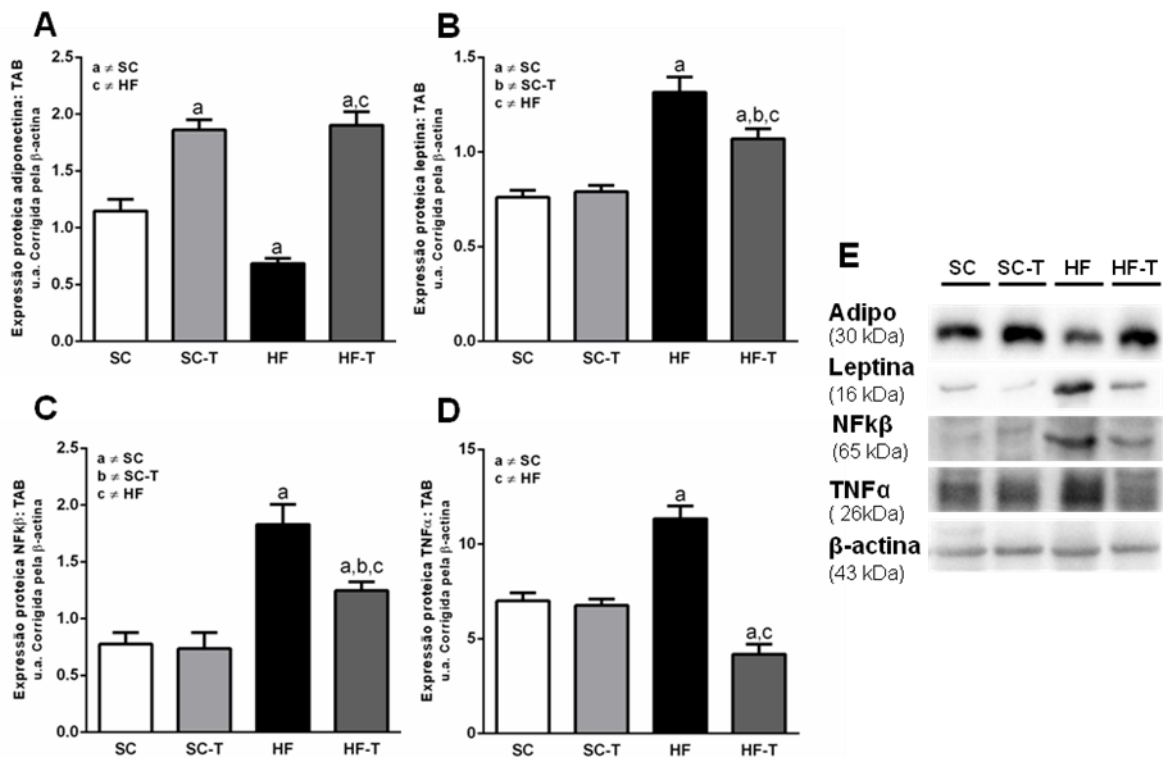


Legendas: Representação dos *blots* (A) pela análise proteica de PPAR-alfa (B) e PPAR-gama (C) no TAB. Dados apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T e c \neq HF.

O tratamento com telmisartana aumentou a expressão de adiponectina em ambos os grupos tratados quando comparado aos seus respectivos controles (+62%

e +177% no grupo SC-T e no grupo HF-T comparados ao grupo SC e ao grupo HF, respectivamente, $P < 0,001$) e a expressão de adiponectina no grupo HF foi menor quando comparado ao grupo SC (-40%, $P < 0,01$). Por outro lado, houve diminuição da expressão de NFkB no grupo HF-T quando comparado ao grupo HF (-31%, $P < 0,05$), o qual apresentou maior expressão deste fator nuclear quando comparado ao grupo SC (+135%, $P < 0,001$). Ademais, a expressão de leptina e TNF-alfa foi maior no grupo HF quando comparado ao grupo SC (+72% e +62%, respectivamente, $P < 0,001$) e diminuída no grupo HF-T quando comparado ao grupo HF (-63% e -18%, $P < 0,01$). Em ambos os parâmetros não houve diferença nos grupos controles, figura 16.

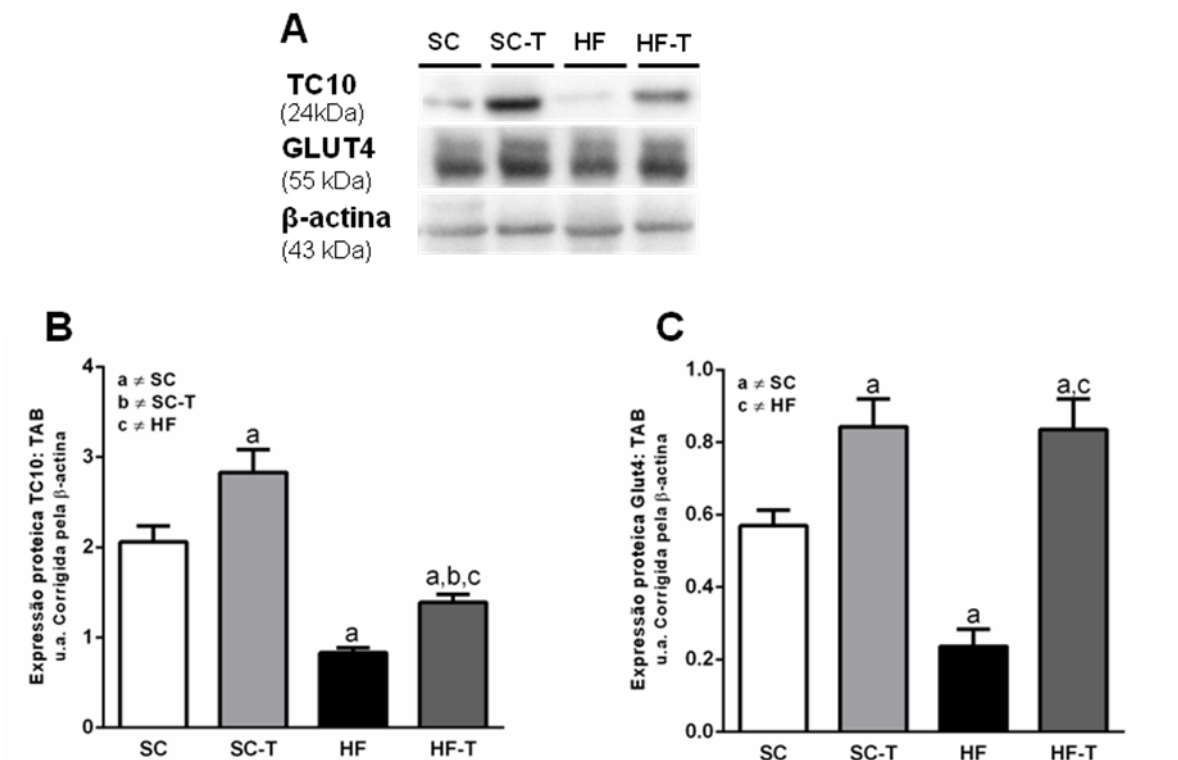
Figura 16 - Nível proteico de Adiponectina, Leptina, NFkB e TNF-alfa no TAB



Legenda: Análises de densitometria para (A) Adiponectina, (B) Leptina e (C) NFkB (D) TNF-alfa e bandas representativas de *Western blot* no TAB para Adiponectina, Leptina, NFkB, TNF-alfa e beta-actina (E). Os dados são apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way* ANOVA e pós teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): [a] em comparação com SC; [b] em comparação com SC-T; e [c] em comparação HF.

A expressão proteica de GLUT4 nos grupos tratados com telmisartana e TC10, que é responsável por translocar o GLUT4 para membrana, foi aumentada no grupo SC-T (+37% e 48%, respectivamente, $P < 0,05$) e no grupo HF-T (+66% e +253%, respectivamente, $P < 0,05$) quando comparada com seus respectivos controles. O grupo HF apresentou diminuição em ambas proteínas estudadas (-59% e 58%, $P < 0,01$) quando comparado ao grupo SC, figura 17.

Figura 17 - Nível proteico de TC10 e GLUT4 no TAB



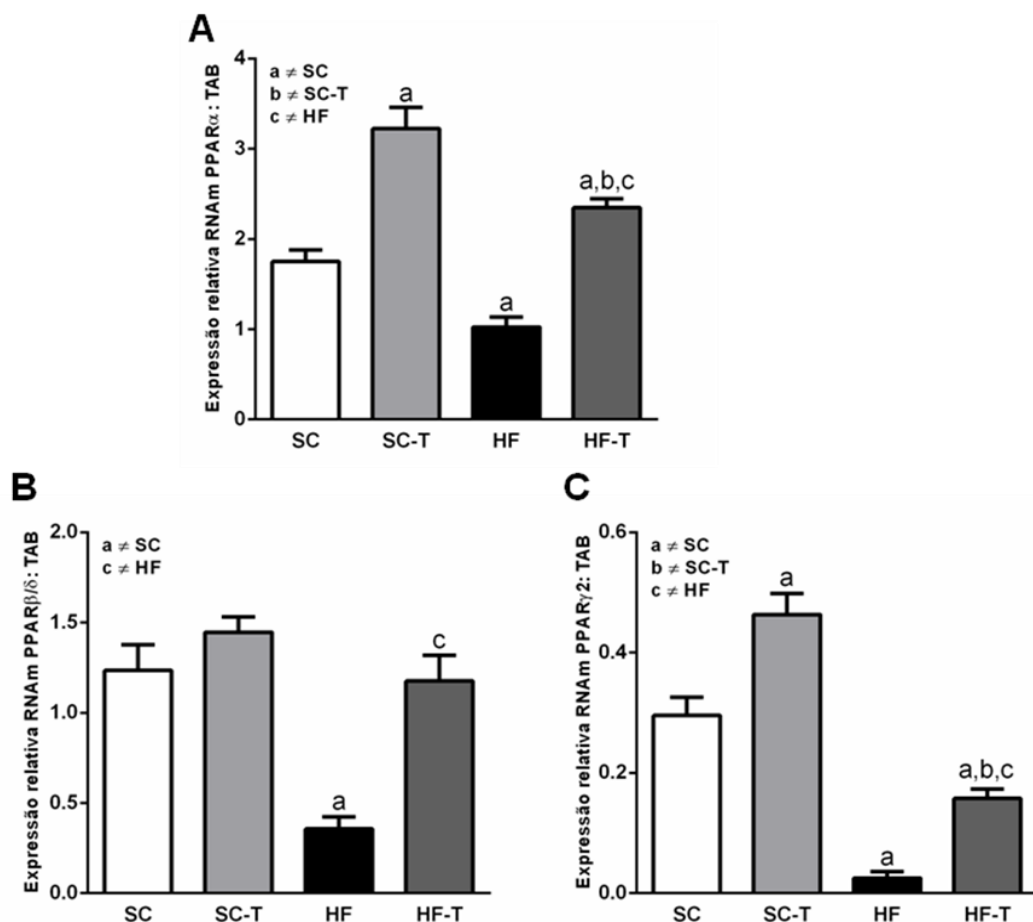
Legenda: Bandas representativas de *Western blot* no TAB para TC10, GLUT4 e beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – TC10; C – GLUT4). Os dados são apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way* ANOVA e pós teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): [a] em comparação com SC; [b] em comparação com SC-T; e [c] em comparação HF.

4.6.3 RT-PCR em tempo real

Ao analisarmos as expressões gênicas das três isoformas de PPARs foi possível observar que o tratamento com telmisartana aumentou a expressão do

RNAm de PPAR-alfa no grupo SC-T quando comparado ao grupo SC (+84%, $P < 0,0001$) e do grupo HF-T quando comparado ao grupo HF (+129%, $P < 0,0001$). A expressão de PPAR-alfa apresentou-se diminuída no grupo HF quando comparado ao grupo SC (-41%, $P < 0,01$). Em relação à expressão de PPAR beta/delta, foi verificado que o RNAm estava diminuído no grupo HF quando comparado ao grupo SC (-80%, $P < 0,001$) e o tratamento foi capaz de aumentar essa expressão no grupo HF-T quando comparado ao grupo HF (+262%, $P < 0,001$). Já a expressão de PPAR-gama foi aumentada em ambos os grupos tratados, SC-T e HF-T, quando comparados aos seus respectivos controles (+56% e +559%, respectivamente, $P < 0,01$). Sendo a expressão reduzida no grupo HF quando comparado ao grupo SC (-91%, $P < 0,0001$), figura 18.

Figura 18 – Expressão gênica dos PPARs no TAB



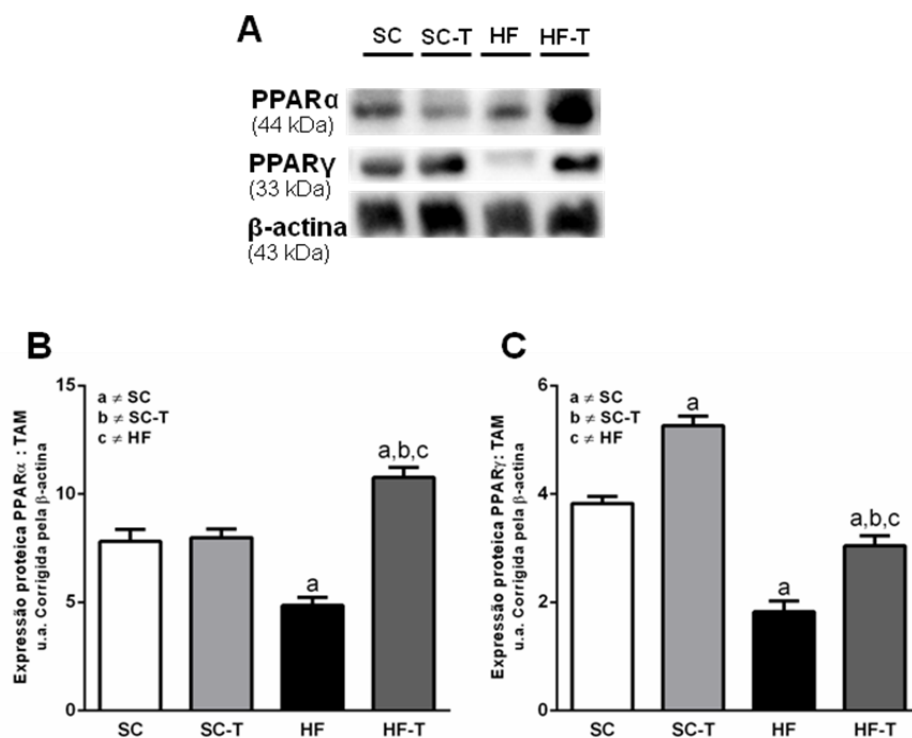
Legendas: Análises realizadas por RT-PCR em tempo real do TAB para PPAR-alfa (A), PPAR-beta/delta (B) e PPAR-gama₂ (C). Dados apresentados como média \pm EPM ($n = 5$ em cada grupo); utilizando-se *one way* ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T e c \neq HF.

4.7 Tecido adiposo marrom

4.7.1 *Western blot*

Os níveis proteicos dos grupos foram expressos após normalização pela proteína constitutiva beta-actina, que foi utilizada como controle interno das amostras. O grupo SC-T apresentou maior expressão de PPAR-gama quando comparado ao grupo SC (+37%, $P < 0,0001$), já o grupo HF-T apresentou diferença em ambas as isoformas, PPAR alfa e gama, quando comparado ao grupo HF (+121% e +66%, respectivamente, $P < 0,0001$). Ressalta-se que o grupo HF teve uma menor expressão dos dois PPARs quando comparado ao grupo SC (-37% e -52%, respectivamente, $P < 0,0001$), figura 19.

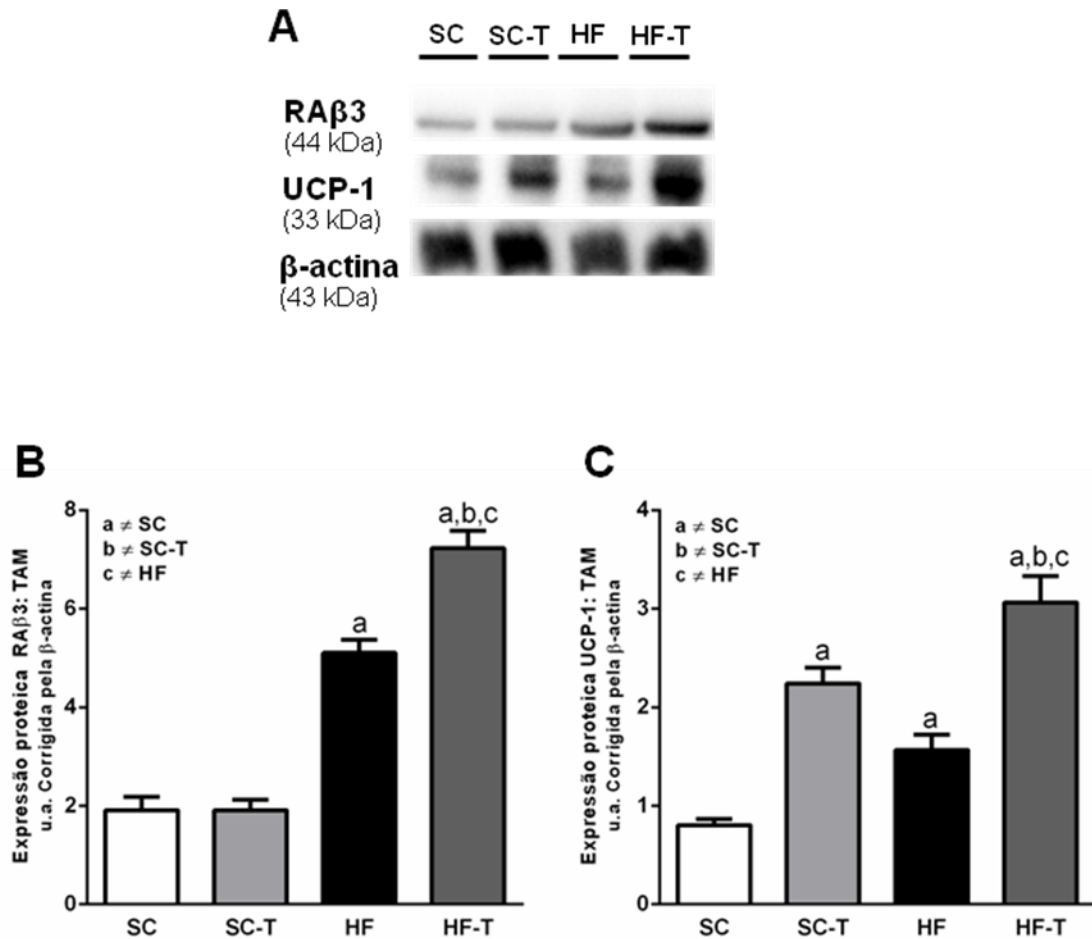
Figura 19 - Nível proteico de PPAR-alfa e PPAR-gama no TAM



Legenda: Bandas representativas de *Western blot* no TAM para PPAR α , PPAR γ e beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – PPAR α ; C – PPAR γ). Os dados são apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way* ANOVA e pós teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): [a] em comparação com SC; [b] em comparação com SC-T; e [c] em comparação HF.

No TAM a expressão proteica do RA β 3 foi maior no grupo HF quando comparado ao grupo SC (+167%, $P < 0,0001$) e o grupo HF-T apresentou maior expressão quando comparado ao grupo HF (+41%, $P < 0,0001$). Os grupos que receberam dieta padrão não apresentaram diferença. A expressão proteica de UCP-1 foi maior nos grupos tratados quando comparados aos grupos que não receberam tratamento (+179% no grupo SC-T, $P < 0,0001$ e +95% no grupo HF-T, $P < 0,001$), e no grupo HF em comparação ao grupo SC (+94%, $P < 0,001$), figura 20.

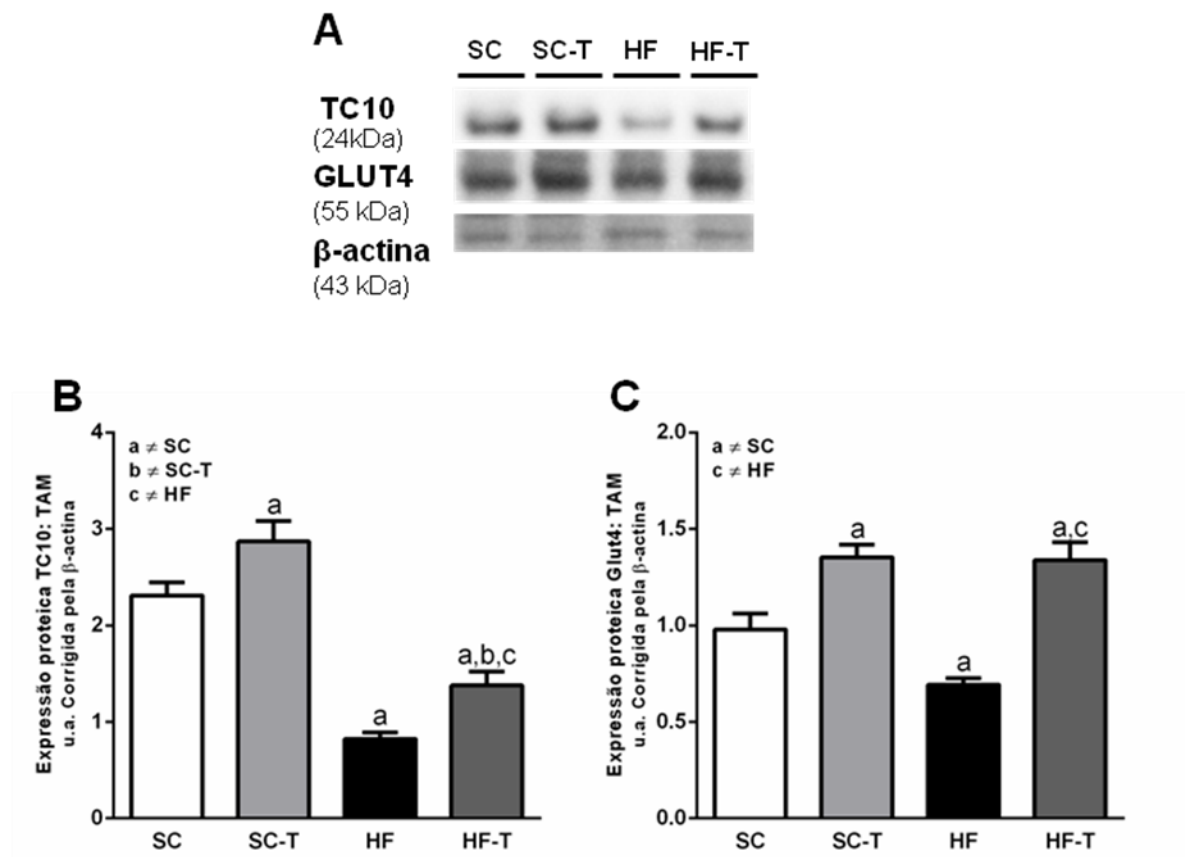
Figura 20 - Nível proteico de RA β 3 e UCP-1 no TAM



Legenda: Bandas representativas de *Western blot* no TAM para RA β 3, UCP-1 e beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – RA β 3; C – UCP-1). Os dados são apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way ANOVA* e pós teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): [a] em comparação com SC; [b] em comparação com SC-T; e [c] em comparação HF.

As expressões proteicas de TC10 e GLUT4 no TAM foram maiores nos grupos tratados, com aumentos respectivamente de 24% e 38% no grupo SC-T e de 67% e 93% no grupo HF-T ($P < 0,05$). O grupo HF teve diminuição da expressão dessas proteínas quando comparado ao grupo SC (-64% e -29%, respectivamente, $P < 0,05$), figura 21.

Figura 21 - Nível proteico de TC10 e GLUT-4 no TAM



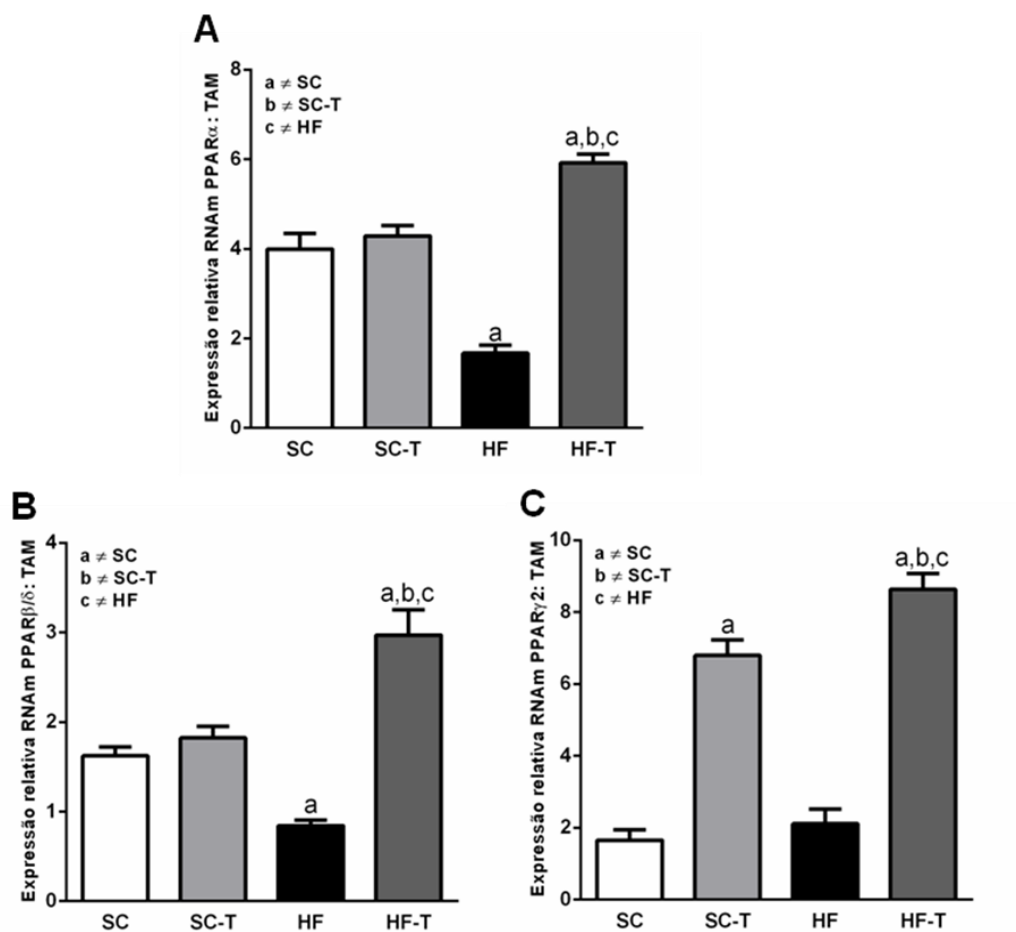
Legenda: Bandas representativas de *Western blot* no TAM para TC10, GLUT4 e beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – TC10; C – GLUT4). Os dados são apresentados como média \pm EPM, $n = 5$ em cada grupo. Estatística feita por *one-way ANOVA* e pós teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): [a] em comparação com SC; [b] em comparação com SC-T; e [c] em comparação HF.

4.7.2 RT-PCR em tempo real

Em relação às expressões gênicas de PPAR alfa, beta/delta e gama, notou-se um aumento das três isoformas no grupo HF-T quando comparado ao grupo HF

(+275%, +252% e +309%, respectivamente, $P < 0,0001$) e apenas aumento da expressão gênica de PPAR-gama no grupo SC-T quando comparado ao grupo SC (+310%, $P < 0,0001$). A expressão de PPAR-gama não apresentou diferença estatística quando comparamos o grupo SC e o grupo HF, porém nas outras isoformas, o grupo HF teve uma diminuição na expressão quando comparado com o grupo SC (-51% e -48%, $P < 0,05$), figura 22.

Figura 22 - Expressão gênica dos PPARs no TAM

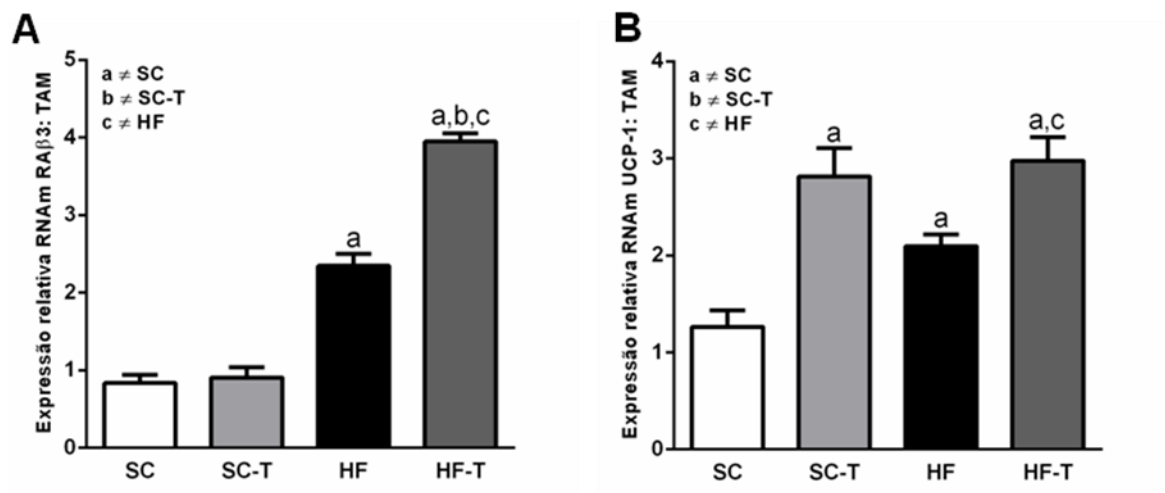


Legenda: Análises realizadas por RT-PCR em tempo real do TAM para PPAR-alfa (A), PPAR-beta/delta(B) e PPAR-gama (C). Dados apresentados como média \pm EPM (n = 5 em cada grupo); utilizando-se *oneway* ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T e c \neq HF.

Ao analisarmos os genes relacionados à termogênese no TAM observou-se que a expressão de RNAm do RA β 3 foi maior no grupo HF-T quando comparado ao grupo HF (+181%, $P < 0,0001$) e os grupos que receberam dieta padrão não

apresentaram diferença entre eles, mostrando expressões gênicas menores de RA β 3 ($P < 0,01$). A expressão gênica de UCP-1 nos grupos SC-T e HF-T apresentou-se elevada quando comparada aos grupos SC e HF (+121% e +42%, respectivamente, $P < 0,05$) e o grupo HF teve maior expressão quando comparado ao grupo SC (+66%, $P < 0,05$), figura 23.

Figura 23 - Expressão gênica da termogênese no TAM



Legenda: Análises realizadas por RT-PCR em tempo real do TAM para RA β 3 (A) e UCP-1 (B). Dados apresentados como média \pm EPM ($n = 5$ em cada grupo); utilizando-se *oneway* ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$): a \neq SC; b \neq SC-T e c \neq HF.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, usamos a telmisartana que possui efeitos anti-hipertensivos, todavia, o nosso objetivo foi estudar os efeitos pleiotrópicos deste fármaco em camundongos machos obesos induzidos por dieta. A administração da dieta hiperlipídica provocou sobrepeso e alterações metabólicas. Apesar de os dados de ingestão em gramatura não mostrarem diferença entre os grupos antes do tratamento, a dieta hiperlipídica apresentava alta densidade energética, refletindo em uma maior ingestão energética (KJ) e conseqüente sobrepeso.

Observamos que a telmisartana teve efeitos benéficos em um modelo experimental de obesidade induzido por dieta. A dieta hiperlipídica causou além do sobrepeso, aumento da hipertensão arterial sistêmica e resistência à insulina, todas as quais foram amenizadas pela administração de telmisartana, que também foi capaz de ativar a termogênese adaptativa. É interessante notar que muitos dos efeitos pleiotrópicos da telmisartana são devido à ativação parcial de PPAR-gama. No entanto, além de ativar PPAR-gama, a telmisartana também ativou PPAR-alfa e PPAR-beta/delta no TAB e TAM causando resultados satisfatórios.

A telmisartana foi previamente associada à diminuição da MC em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (11, 12), o que foi confirmado por nossos resultados. Os níveis proteicos no TAB e plasmáticos de leptina que estavam aumentados foram diminuídos nos camundongos obesos tratados com telmisartana. A resistência à leptina nos animais que receberam dieta hiperlipídica gerou danos a saciedade e diminuição do gasto energético, que foram revertidos com o tratamento. A leptina, uma adipocina capaz de regular o apetite e o metabolismo energético em humanos e roedores, está associada positivamente com o índice de adiposidade (79), se relacionando com o acúmulo do TAB na obesidade. Em níveis fisiológicos, a leptina inibe a liberação de insulina das células beta pancreáticas no estado pós-prandial, evitando, assim, a hiperinsulinemia e a hiperfagia (80).

Conforme esperado, os camundongos que foram tratados com telmisartana diminuíram a PAS para níveis normotensos, mas também tiveram outros efeitos, tais como a melhora da tolerância à glicose. O grupo HF-T apresentou melhora na sensibilidade à insulina, em parte devido aos níveis elevados de adiponectina no plasma, além da maior expressão dessa proteína no TAB. A adiponectina, uma

adipocina anti-inflamatória e secretada pelo TAB, é um gene alvo do PPAR-gama. Após a transcrição pelo PPARgama, a adiponectina é capaz de regular o metabolismo da glicose aumentando a sensibilidade à insulina (81).

A ativação de PPARgama também aumentou a transcrição do transportador de glicose-4 (GLUT-4) (82). A captação adequada da glicose dependente de insulina é estimulada pela translocação de GLUT-4 para a membrana celular, um acontecimento que depende da ativação de TC10, que é uma proteína que induz a translocação de GLUT-4, importante na regulação da absorção e utilização de glicose para o metabolismo celular (43), ambas as proteínas tiveram a expressão aumentada no TAB e TAM após a administração de telmisartana, resultando num aumento da sensibilidade à insulina. Estes efeitos foram observados através da redução do cálculo do HOMA-IR e diminuição dos níveis séricos de insulina nos animais.

Além disso, a ativação parcial de PPAR-gama no TAB provoca a apoptose dos adipócitos maduros e grandes induzindo a formação de adipócitos pequenos (83), explicando assim a redução das gorduras intra-abdominal e subcutânea e do diâmetro dos adipócitos em camundongos obesos tratados com telmisartana.

A resistência à insulina e a obesidade estão associadas com a inflamação de baixo grau, o que poderia ser facilmente percebida com o aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias pelo TAB (84). A administração de telmisartana resultou numa melhora do perfil das adipocinas com redução dos níveis de adipocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF-alfa, as quais são genes alvo de NF-kB. Em níveis elevados, a IL-6 pode causar redução da síntese de glicogênio hepático insulino-dependente e captação de glicose em adipócitos por suprimir o sinal de insulina. Em roedores, o TNF-alfa também inibe o estímulo da insulina para a captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo, aumentando o perfil inflamatório do TAB (85). No entanto, a ativação de PPAR-beta/delta pela telmisartana no TAB reduz esta inflamação, característica da obesidade, através da inibição da via de NFkB com a subsequente redução da expressão dos genes alvo, IL-6 e TNF-alfa (86). PPAR-beta/delta possui ainda funções reguladoras no metabolismo e na homeostase energética com melhora do perfil lipídico e liberação de adipocinas no TAB (6). Além disso, PPAR-beta/delta pode prevenir a obesidade induzida por dieta em roedores porque induz o uso de lipídeos como combustível, em vez de carboidratos. (15).

A telmisartana também ativou PPAR-alfa no TAB, o qual está associado aos efeitos hipolipidêmicos (87), podendo controlar a expressão de enzimas envolvidas na beta-oxidação de ácidos graxos livres (5). Além disso, PPAR-alfa atua no metabolismo energético de todo o corpo (88). PPAR-alfa possui ainda propriedades anti-inflamatórias, que estão relacionadas com a interação entre PPAR-alfa/NFkBp65, formando um complexo nuclear, assim PPAR-alfa é capaz de controlar a transcrição de mediadores pro-inflamatórios de NFkB, restabelecendo a homeostase das citocinas inflamatórias (89).

No que diz respeito ao TAM, a telmisartana também ativou todas as isoformas de PPARs nos animais obesos tratados. A telmisartana foi previamente associada com aumento do gasto energético e indução da expressão de UCP-1. No entanto, o presente estudo demonstrou a ativação de PPAR-alfa e beta/delta após a administração de telmisartana no TAM.

PPAR-alfa é responsável por transcrever UCP-1, uma proteína encontrada unicamente nos adipócitos marrons, cuja expressão está ligada à termogênese adaptativa (90, 91). A importância da termogênese é permitir que através de uma via alternativa ocorra a fosforilação oxidativa, a qual resulta na dispersão de energia na forma de calor, com aumento do gasto energético, podendo ser uma abordagem promissora para controlar a MC (53, 92). No presente estudo, animais tratados com telmisartana tiveram maior expressão de PPAR-alfa, com consequente aumento da expressão proteica e gênica da UCP-1. Este mecanismo de regulação transcricional permite também que PPAR-alfa coordene as vias de beta-oxidação e termogênica no TAM (36).

Além da UCP-1, o RA β 3, que é o iniciador de termogênese, tem a sua sensibilidade aumentada através da ativação de PPAR-beta/delta no TAM (6). O frio e a dieta hiperlipídica atuam como ativadores do sistema nervoso simpático e a liberação de noradrenalina resultante atinge o RA β 3 nos adipócitos marrons, que são densamente inervados pelo sistema nervoso simpático, regulando assim a atividade metabólica e termogênica (93).

Notou-se que a termogênese adaptativa foi maior no grupo HF, quando comparado com o grupo SC devido à estimulação adrenérgica sustentada pela exposição a uma dieta rica em gordura. No entanto, nos animais obesos não tratados, a ativação da termogênese não foi suficiente para promover um retorno à homeostase.

A expressão do RA β 3 e UCP-1 no TAM foi maior nos animais obesos tratados com diminuição da MC, sugerindo que a telmisartana atua na ativação da termogênese, porém o aumento significativo do consumo de O₂ e produção de CO₂ no grupo HF-T sugerem o aumento do gasto energético com concomitante ativação da termogênese adaptativa. O QR diminuído nos grupos que receberam dieta hiperlipídica é explicado devido à maior utilização de lipídeos em detrimento dos carboidratos (94, 95), no entanto, o grupo HF-T apresentou diminuição mais expressiva do QR, propondo que houve a oxidação da gordura endógena e exógena, causando redução de reservas lipídicas ectópicas, como descrito anteriormente (9, 10).

O aumento da expressão de PPAR-gama foi capaz de aumentar pela via clássica a transcrição de UCP-1, além de participar no aumento da captação da glicose para a utilização do substrato nas atividades celulares (96)

É importante ressaltar o fato de que alguns dos efeitos observados no grupo HF-T não serem observados no grupo SC-T. Camundongos magros tratados não exigem ativação da termogênese para voltar a homeostase, visto que não apresentavam sobrepeso. O grupo SC-T, onde os animais não são obesos e não apresentavam nenhum quadro inflamatório no início do tratamento, a ativação de PPAR-alfa e PPARbeta/delta não diferiu do grupo SC, mesmo com a administração de telmisartana.

Assim, a novidade do presente estudo é a constatação de que a telmisartana aumenta a expressão gênica e proteica pan-PPAR no TAB e TAM num modelo experimental de obesidade induzida por dieta. Os efeitos resultantes da ativação das três isoformas de PPARs compreendem a melhora do perfil inflamatório, redução do índice de adiposidade, melhora da captação de glicose no TAB e aumento da termogênese adaptativa no TAM. O aumento da utilização de lipídios como combustível para o metabolismo celular, juntamente com a diminuição do consumo de energia produzindo um balanço energético negativo em animais obesos tratados. O conhecimento de que uma droga, atualmente usada para tratar a hipertensão arterial sistêmica, pode desencadear a termogênese adaptativa e também combater a resistência à insulina e a inflamação associada à obesidade em roedores pode resultar em novos alvos terapêuticos para o controle da obesidade e suas complicações.

CONCLUSÕES

Assim, observamos que a telmisartana aumenta a expressão gênica e proteica pan-PPAR no TAB e TAM em camundongos com obesidade induzida por dieta, com efeitos pleiotrópicos benéficos em ambos os tecidos.

No TAB houve:

- a) Ativação das três isoformas de PPARs nos camundongos obesos induzido por dieta;
- b) A melhora do perfil inflamatório e o aumento da sensibilidade à insulina;
- c) A redução da inflamação pelo aumento da expressão gênica e proteica de adiponectina e à redução da expressão proteica do NFKb;
- d) O aumento da utilização de glicose induzida pela insulina por meio de uma maior eficiência do GLUT4;
- e) Melhora do parâmetro morfológico.

No TAM, foi observado:

- a) Aumento da expressão dos PPARs nos camundongos obesos induzido por dieta;
- b) Aumento da expressão proteica e gênica de UCP-1 e RA β 3 com aumento da termogênese e concomitante aumento do gasto energético;
- c) Melhora da captação da glicose pela interação de GLUT-4 e TC10;
- d) Aumento da beta-oxidação dos ácidos graxos no tecido, combustível essencial para a ativação da termogênese.

Novos estudos experimentais e clínicos são necessários para esclarecerem os mecanismos precisos das vias dos PPARs. Porém, o uso deste fármaco para a obesidade e suas comorbidades apresenta um caráter promissor diante dos resultados apresentados, uma vez que recentemente foi descrito que uma grande fração dos humanos adultos apresenta TAM e que a obesidade já se tornou uma epidemia.

REFERÊNCIAS

1. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion*. 2011;83(1-2):124-33.
2. Weiss R, Kaufman FR. Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S310-6.
3. Bouret SG. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum Nutr*. 2010;63:84-93.
4. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jan 15;314(1):1-16.
5. Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Dec;14(10):439-41.
6. Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Molecular and cellular endocrinology*. [Review]. 2010 Apr 29;318(1-2):61-8.
7. Burnier M, Brunner HR. Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet*. 2000 Feb 19;355(9204):637-45.
8. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension*. 2004 May;43(5):993-1002.
9. 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)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Sep;119(6):239-50.
10. Souza-Mello V, Gregorio BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jul;40(5):715-22.
11. Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension*. 2006 Jul;48(1):51-7.
12. Sugimoto K, Qi NR, Kazdova L, Pravenec M, Ogihara T, Kurtz TW. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension*. 2006 May;47(5):1003-9.

13. Clemenz M, Frost N, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Bohm C, et al. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1405-13.
14. Li L, Luo Z, Yu H, Feng X, Wang P, Chen J, et al. Telmisartan improves insulin resistance of skeletal muscle through peroxisome proliferator-activated receptor-delta activation. *Diabetes*. 2013 Mar;62(3):762-74.
15. He H, Yang D, Ma L, Luo Z, Ma S, Feng X, et al. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension*. 2010 Apr;55(4):869-79.
16. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, et al. Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 May;15(5):1061-7.
17. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 Sep 24-30;366(9491):1059-62.
18. Renne U, Langhammer M, Brenmoehl J, Walz C, Zeissler A, Tuchscherer A, et al. Lifelong obesity in a polygenic mouse model prevents age- and diet-induced glucose intolerance- obesity is no road to late-onset diabetes in mice. *PLoS One*. 2013;8(11):e79788.
19. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep 25;65C:1229-37.
20. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
21. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
22. Rinaldi B, Di Filippo C, Capuano A, Donniacuo M, Sodano L, Ferraraccio F, et al. Adiponectin elevation by telmisartan ameliorates ischaemic myocardium in Zucker diabetic fatty rats with metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2012 Apr;14(4):320-8.
23. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Aug;83(8):2907-10.
24. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):117-31.

25. Le Drean G, Haure-Mirande V, Ferrier L, Bonnet C, Hulin P, de Coppet P, et al. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J*. 2013 Nov 15.
26. Volpato AM, Schultz A, Magalhaes-da-Costa E, Correia ML, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal High-Fat Diet Programs for Metabolic Disturbances in Offspring despite Leptin Sensitivity. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):272-84.
27. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Dec 10;270(45):26746-9.
28. Brichard SM, Delporte ML, Lambert M. Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res*. 2003 Jun;35(6):337-42.
29. Bastardo LA, Iruthayaraj J, Lundin M, Dedinaite A, Vareikis A, Makuska R, et al. Soluble complexes in aqueous mixtures of low charge density comb polyelectrolyte and oppositely charged surfactant probed by scattering and NMR. *J Colloid Interface Sci*. 2007 Aug 1;312(1):21-33.
30. Briffa JF, McAinch AJ, Poronnik P, Hryciw DH. Adipokines as a link between obesity and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Oct 9.
31. Olarescu NC, Ueland T, Godang K, Lindberg-Larsen R, Jorgensen JO, Bollerslev J. Inflammatory Adipokines Contribute to Insulin Resistance in Active Acromegaly and Respond Differently to Different Treatment Modalities. *Eur J Endocrinol*. 2013 Oct 3.
32. Houser DS, Champagne CD, Crocker DE. A Non-Traditional Model of the Metabolic Syndrome: The Adaptive Significance of Insulin Resistance in Fasting-Adapted Seals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:164.
33. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care*. 2004 Oct;27(10):2444-9.
34. Avruch S, Machlin S, Bonin P, Ullman F. The demographic characteristics of Medicaid-eligible uninsured children. *Am J Public Health*. 1998 Mar;88(3):445-7.
35. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1988 May 12;318(19):1231-9.
36. Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism*. 2013 May;62(5):622-33.
37. Jahn MP, Jacob MH, Gomes LF, Duarte R, Araujo AS, Bello-Klein A, et al. The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide

and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 May;120(1):38-44.

38. Teixeira SS, Tamrakar AK, Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Klip A, Nunes MT. Triiodothyronine (T3) acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1 or GLUT3. *Thyroid.* 2012 Mar 10.
39. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Aug;295(2):E227-37.
40. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 2007 Apr;5(4):237-52.
41. Ribon V, Herrera R, Kay BK, Saltiel AR. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):4073-80.
42. Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J.* 1997 Jun 15;324 (Pt 3):839-45.
43. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature.* 2001 Apr 19;410(6831):944-8.
44. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med.* 2004 Jul-Dec;10(7-12):65-71.
45. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005 Apr;48(4):634-42.
46. Klingenspor M, Herzig S, Pfeifer A. Brown fat develops a brite future. *Obes Facts.* 2012;5(6):890-6.
47. Foster DO, Frydman ML. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978 Feb;56(1):110-22.
48. Bargmann W, von Hehn G, Lindner E. [On the cells of the brown fatty tissue and their innervation]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;85(4):601-13.
49. Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 2007 Jan;48(1):41-51.
50. Stroud DA, Ryan MT. Mitochondria: Organization of Respiratory Chain Complexes Becomes Cristae-lized. *Curr Biol.* 2013 Nov 4;23(21):R969-71.


51. Ricquier D, Kader JC. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Dec 6;73(3):577-83.
52. Cannon B, Nedergaard J. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. *Proc Nutr Soc*. 2009 Nov;68(4):401-7.
53. Crowley V, Vidal-Puig AJ. Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001 Feb;11(1):70-5.
54. Winkler E, Klingenberg M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2508-15.
55. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res*. 1993 Jul;34(7):1057-91.
56. Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Dec;34 Suppl 2:S59-66.
57. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004 Nov 19;306(5700):1383-6.
58. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):926-35.
59. Seok H, Cha BS. Refocusing Peroxisome Proliferator Activated Receptor-alpha: A New Insight for Therapeutic Roles in Diabetes. *Diabetes Metab J*. 2013 Oct;37(5):326-32.
60. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):518-33.
61. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
62. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012 May 11;149(4):871-85.
63. Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovascular diabetology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012;11:125.
64. Tenenbaum A, Fisman EZ. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:140.

65. Serrano-Marco L, Rodriguez-Calvo R, El Kochairi I, Palomer X, Michalik L, Wahli W, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/-delta (PPAR-beta/-delta) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes*. 2011 Jul;60(7):1990-9.
66. Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*. 2003 Dec;17(12):2477-93.
67. Festuccia WT, Blanchard PG, Deshaies Y. Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPARgamma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:84.
68. Ferwana M, Firwana B, Hasan R, Al-Mallah MH, Kim S, Montori VM, et al. Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med*. 2013 Sep;30(9):1026-32.
69. Song SO, Kim KJ, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Lee HC. The risk of bladder cancer in korean diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Metab J*. 2012 Oct;36(5):371-8.
70. Vitale C, Mercurio G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, et al. Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 May 15;4:6.
71. Frantz ED, Crespo-Mascarenhas C, Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2013;8(7):e67192.
72. Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. [Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Mar;51(2):195-203.
73. Ushijima K, Takuma M, Ando H, Ishikawa-Kobayashi E, Nozawa M, Maekawa T, et al. Effects of telmisartan and valsartan on insulin sensitivity in obese diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 5;698(1-3):505-10.
74. Takagi H, Niwa M, Mizuno Y, Goto SN, Umemoto T. Telmisartan as a metabolic sartan: the first meta-analysis of randomized controlled trials in metabolic syndrome. *J Am Soc Hypertens*. 2013 May-Jun;7(3):229-35.
75. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 Nov;123(11):1939-51.

76. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659-61.
77. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
78. 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(5):e64258.
79. Yadav A, Kataria MA, Saini V. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 18;417:80-4.
80. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol*. 2001 Aug;170(2):323-32.
81. Ziemke F, Mantzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jan;91(1):258S-61S.
82. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):467-72.
83. Hattori Y, Akimoto K, Gross SS, Hattori S, Kasai K. Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia*. 2005 Jun;48(6):1066-74.
84. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793-801.
85. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45777-84.
86. Serrano-Marco L, Chacon MR, Maymo-Masip E, Barroso E, Salvado L, Wabitsch M, et al. TNF-alpha inhibits PPARbeta/delta activity and SIRT1 expression through NF-kappaB in human adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1821(9):1177-85.
87. Aubert G, Burnier M, Dulloo A, Perregaux C, Mazzolai L, Pralong F, et al. Neuroendocrine characterization and anorexigenic effects of telmisartan in diet- and glitazone-induced weight gain. *Metabolism*. 2010 Jan;59(1):25-32.

88. Goto T, Lee JY, Teraminami A, Kim YI, Hirai S, Uemura T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res.* 2011 May;52(5):873-84.
89. Zuniga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, et al. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-alpha activation and PPAR-alpha/NF-kappaB interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 2011;6(12):e28502.
90. Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Hu R, et al. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells.* 2010 Feb;15(2):91-100.
91. Hondares E, Rosell M, Diaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 2011 Dec 16;286(50):43112-22.
92. Ricquier D. Biology of brown adipose tissue: view from the chair. *Int J Obes (Lond).* 2010 Oct;34 Suppl 1:S3-6.
93. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):652-60.
94. Arch JR, Trayhurn P. Detection of thermogenesis in rodents in response to anti-obesity drugs and genetic modification. *Front Physiol.* 2013;4:64.
95. Arch JR, Hislop D, Wang SJ, Speakman JR. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond).* 2006 Sep;30(9):1322-31.
96. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012 Jan 26;481(7382):463-8.

APÊNDICE – Comprovante de submissão de artigo científico

Experimental Physiology  **FI: 2.79**

Vanessa Souza-Mello (Author) [Queue Summary](#) [Reviewer Area](#) [Submit](#) [Submission History](#) [Help](#) [FAQ](#) [Feedback](#) [Log Out](#)

Under Review - Check Status

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

EXPPHYSIOL/2014/081596
Enhanced pan-PPAR gene and protein expression in diet-induced obese mice treated with Telmisartan
Aline Penna-de-Carvalho, Francielle Graus-Nunes, Júlia Rabelo-Andrade, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, and Vanessa Souza-Mello

Status: Under Review
Date Received: 25 Jun 2014
Subject Area: Neuroendocrinology/Endocrinology
Article Type: Research Paper
Corresponding Author: Vanessa Souza-Mello
Keywords: Adipose tissue; Obesity; Thermogenesis; PPAR
Supplemental Files: 0

ANEXO – Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/054/2012 sobre “EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TELMISARTANA SOBRE O GASTO ENERGÉTICO, TERMOGÊNESE E CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS À DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA”, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza-Mello**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **03/10/2012**. Este certificado expira em **03/10/2016**.

Rio de Janeiro, 03 de Outubro de 2012.

Mato

Patricia Cristina Lisboa

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Ass. Profa. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Dep. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matri. 34765-8

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

(21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br