



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAIARA FERREIRA TERRA

“Análise molecular e funcional da modulação da fosforilação do PPAR γ em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica”

“Molecular and functional analysis of PPAR γ phosphorylation modulation in mice fed with high-fat diet”

Campinas

2022



MAIARA FERREIRA TERRA

“ANÁLISE MOLECULAR E FUNCIONAL DA MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DO
PPAR γ EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA”

“MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF PPAR γ PHOSPHORYLATION
MODULATION IN MICE FED WITH HIGH-FAT DIET”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área
de Fisiologia.

SUPERVISOR/ORIENTADOR: DRA ANA CAROLINA MIGLIORINI FIGUEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MAIARA FERREIRA TERRA, E ORIENTADA
PELA PROF(A). DR(A). ANA CAROLINA MIGLIORINI FIGUEIRA

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T275a Terra, Maiara Ferreira, 1994-
Análise molecular e funcional da modulação da fosforilação do PPAR γ em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Maiara Ferreira Terra. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Ana Carolina Migliorini Figueira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. PPAR gama. 2. Resistência à insulina. 3. Lipídeos - Metabolismo. 4. Fosforilação. I. Figueira, Ana Carolina Migliorini, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional and molecular analysis of PPAR γ phosphorylation modulation in mice fed with high-fat diet

Palavras-chave em Inglês:

PPAR gamma

Insulin resistance

Lipid metabolism

Phosphorylation

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Ana Carolina Migliorini Figueira [Orientador]

Angélica Amorim Amato

Alice Cristina Rodrigues

Adriana Souza Torsoni

Francisco de Assis Rocha Neves

Data da defesa: 25-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4046-3352>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7858247664742589>



Campinas, 25 de Março de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (Orientadora)

Dra. Angélica Amorim Amato

Dra. Alice Cristina Rodrigues

Dra. Adriana Souza Torsoni

Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Funcional e Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.



AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – processo número 88882.329744/2010-01.

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu concluir mais uma etapa do meu desenvolvimento pessoal e profissional, que esteve ao meu lado em todos os momentos me dando sabedoria e força para continuar.

Agradeço imensamente à minha família, sem eles eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela força, apoio, amor e carinho de sempre! Amo muito vocês!!

Ao meu namorado Flávio por estar ao meu lado todo esse tempo, principalmente nos momentos difíceis, que não foram poucos. Te amo!

À minha orientadora Carol pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela confiança e pelo suporte nesses 4 anos.

Aos colegas de laboratório, pelo suporte de sempre, pelo aprendizado, pelas amizades que desenvolvi nesse período.

Ao CNPEM e LNBio pela infraestrutura para o desenvolvimento do meu projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular e a todos os docentes por fazerem desse curso um dos melhores do país.

À minha psicóloga e meu psiquiatra, principalmente por me fazerem acreditar em mim, sem vocês eu não conseguiria.

Aos meus gatos, pela companhia e carinho de sempre.

Aos meus amigos da vida que puderam acompanhar, seja de perto ou longe, mais uma etapa da minha vida.

Por fim, agradeço a mim mesma por ter conseguido chegar ao final dessa etapa, posso dizer que cresci muito, tanto na vida profissional, quanto na vida pessoal. Caí muitas vezes, mas consegui levantar mais forte para continuar. Os aprendizados foram muitos e levarei para a vida toda.



RESUMO

Obesidade é uma patologia caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo em proporções que afetam a saúde dos indivíduos e tem atingido proporções epidêmicas no mundo. Esses dados estão diretamente relacionados com o aumento na incidência de diabetes tipo 2, uma vez que a obesidade aumenta de 8 a 10 vezes o risco de desenvolvimento dessa doença. Um alvo de estudo comum no combate a essas patologias são os receptores ativadores de proliferação em peroxissomos (PPARs), mais especificamente a isoforma γ , que são fatores de transcrição relacionados com o metabolismo de lipídeos e carboidratos. Em 2010 a fosforilação na Ser273 do PPAR γ foi detectada e relacionada diretamente à resistência à insulina. Diante disso, diversos grupos de pesquisa buscaram pela modulação da atividade desse receptor através de ligantes que possam atuar bloqueando este sítio de fosforilação, promovendo sensibilidade à insulina, e impedindo seu agonismo total. Nesse contexto, esse projeto avaliou os efeitos da modulação dessa fosforilação no metabolismo de lipídeos e carboidratos em camundongos. Inicialmente desenvolvemos uma linhagem de camundongos *knockin* (KI), na qual mutamos a serina do PPAR γ por alanina, para o estudo dos efeitos fisiológicos do bloqueio da fosforilação do receptor. Além disso, avaliamos os efeitos do tratamento dos animais com diferentes doses de um ligante não-agonista de PPAR γ , o AM-879, o qual parece inibir a fosforilação do PPAR γ . Na caracterização da linhagem *knockin*, observamos que os animais apresentaram elevado peso corporal, são hiperglicêmicos e hipoinsulinêmicos no desmame. Além disso, após administração de dieta hiperlipídica, esses animais apresentam melhora da sensibilidade à insulina com reduzidos níveis plasmáticos de insulina e aumento de adiponectina, mas desenvolveram aumento da esteatose hepática e hipertrofia do tecido adiposo branco. Com relação ao tratamento com AM-879, observamos que a dose menor promove efeitos na via do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e em genes alvo do PPAR γ . No tratamento com a dose maior, observamos efeitos de melhora na sensibilidade à insulina, além de redução de consumo de dieta e triglicérides hepático. Esses resultados indicam que pelo fato do AM-879 atuar em duas vias, a dose escolhida vai determinar em qual delas a atuação do ligante será predominante, porém ele se mostrou como um modulador eficaz da sensibilidade à insulina sem efeitos colaterais.



ABSTRACT

Obesity is a pathology characterized by adipose tissue accumulation in proportions that influence on individual's health and it has reached pandemic rates in the world. These data are related with an increase on the incidence of people with type 2 diabetes, since obesity increases its risk by 8 to 10 times the development of this disease. A target on the study of these pathologies are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), more specifically γ isoform, which are transcriptional factors related with lipid and carbohydrate metabolism. In 2010 Serine 273 phosphorylation of PPAR γ was detected and related to insulin resistance. Accordingly, seeking the modulation of this receptor activity through ligands that block the phosphorylation site, promoting insulin sensitivity and avoiding its total agonism. In this context, this project aims to evaluate the effects of modulating this phosphorylation on lipid and carbohydrate metabolism in mice. We developed a *knockin* (KI) mouse model with a serine to alanine mutation, blocking the occurrence of this post-translational modification in order to study its physiological effects. Moreover, we evaluated the effects of different doses of a PPAR γ non-agonist, the AM-879, which seems to inhibit this receptor phosphorylation. On *knockin* lineage characterization, we observed that these animals have higher body weight, are hyperglycemic and hipoinsulinemic immediately after weaning. After high-fat diet administration, these animals had an improvement on insulin sensitivity with reduced insulin levels and increased adiponectin levels, but they developed an increase on hepatic steatosis and white adipose tissue hypertrophy. Regarding AM-879, we observed that the lower dose promotes more effects on the Crh pathway, mainly by gene expression alteration, but it still acts on target genes of PPAR γ . With the higher dose, there were effects on improving insulin sensitivity, as well as reduced food consumption and hepatic triglyceride content. These results indicate that, as AM-879 is involved in these two pathways described, the dose will determine in which of them the ligand action will be predominant, and it revealed as an efficient modulator on insulin sensitivity without side effects.



ABREVIATURAS

AUC- Área abaixo da curva

CAP- Proteína associada à Cbl

Cas- Proteínas nucleases associadas a CRISPR

CD36- Cluster de diferenciação 36

CDK- Quinase dependente de Ciclina

CEUA- Comitê de Ética em Experimentação Animal

CoAs- Coativadores

CoRs- Correpressores

Crh- Hormônio liberador de corticotropina

CRISPR -Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas

crRNA- RNA CRISPR

DBD- Domínio de interação com DNA

DSB- Dupla Quebra das fitas de DNA

DT2- Diabetes tipo 2

ERK- Quinases reguladas por sinais Extracelulares

ERs- Receptores Esteróides

FABP4- Proteína ligadora de Ácidos Graxos

FBS- Soro Fetal Bovino

GK- Glicerol Kinase

GLUT- Transportador de glicose

HAT- Complexos de Histonas Acetilases

HDAC- Complexos de Histonas Desacetilases

HDR- Recombinação Homóloga

HE- Hematoxilina Eosina

HFD- Dieta hiperlipídica



IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDF- Federação Internacional de Diabetes

IL- Interleucina

IRS2- Substrato 2 da Insulina

ITT- Teste de Sensibilidade à Insulina

KI- *Knockin*

KITT- Taxa de decaimento da glicose

LBD- Domínio de interação com ligante

LMG- Laboratório de Modificação do Genoma

MAPK- Proteína Quinase ativada por Mitógeno

NHEJ- Recombinação não homóloga

NLS- Sequência de Localização Nuclear

Npy- Neuropeptídeo Y

Nr1d2- Rev-ErbA β

OMS- Organização Mundial da Saúde

PEPCK- Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase

PPARs- Receptores ativadores de Proliferação em Peroxissomos

PPREs- Elementos de Resposta dos PPARs

RAR- Receptores de Ácido Retinóico

RNs- Receptores Nucleares

RXR- Receptor de Ácido Retinóico X

sgRNA- RNA guia

TALENs- Nucleases Efetoras da Ativação da Transcrição

TNF- Fator de Necrose Tumoral

tracrRNA- RNA Transativador Auxiliar

TRs- Receptores de Hormônios Tireoidianos



Txnip- Proteína que interage com Tioredoxina

TZDs- Tiazolidineidionas

ZFNs- Nucleases “Zinc Fingers”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos da ativação do PPAR γ em diversos órgãos (Adaptado de [19]).	22
Figura 2. Via de ativação da CDK5 e fosforilação da Ser273 do PPAR γ , indicando a atuação dos ligantes anti-diabéticos (Adaptado de Choi et al., 2010 [28]).	24
Figura 3. Estrutura do ligante AM-879, obtida do PubChem.	25
Figura 4. Esquema das vias de atuação do AM-879: CRH e PPAR γ , com os principais órgãos envolvidos e analisados, sendo eles: hipotálamo, fígado, tecido adiposo marrom (BAT) e branco (WAT).	27
Figura 5. Esquema da quebra de dupla fita de DNA (DSB) promovida pela Cas9 e direcionada pelo sgRNA e os mecanismos de reparo por não-homologia (NHEJ) ou por homologia (HDR) que podem ser ativados (Adaptado de [58]).	29
Figura 6. Análise via CRISPOR de possíveis off-targets (destaque em vermelho).	32
Figura 7. Desenho experimental do estudo, no qual os animais, com 6 semanas de idade, foram subdivididos em um grupo alimentado com dieta normal ou com dieta hiperlipídica, por 16 semanas (com 22 semanas de idade). Nesse ponto, realizamos o teste de sensibilidade à insulina (ITT), pré-tratamento. Na 22ª semana de idade, os camundongos foram divididos de acordo com cada tratamento, sendo eles veículo, AM-879 ou Rosilgitazona), por 2 semanas, sendo repetido o ITT no 13º dia de tratamento e a eutanásia na 24ª semana de idade, onde foram coletados sangue, tecidos como coração, fígado, tecido adiposo branco e marrom e músculo gastrocnêmico).	34
Figura 8. Tratamento oral voluntário dos camundongos C56Bl/6J com gelatina, segundo descrito [59].	35
Figura 9. Desenho do sgRNA, oligo doador e mutações específicas: em azul, mutações silenciosas na sequência alvo do oligo doador para evitar sua clivagem pela Cas9; em laranja, a sequência PAM (NGG) reconhecida pela Cas9; em vermelho, a mutação na Ser273 para Alanina e, em verde, mutação para inserção de sítio da enzima de restrição ScaI.	41
Figura 10. Gel de agarose 1% do ensaio T7 endonuclease I da primeira ninhada de camundongos após injeção. C- indica o controle negativo da reação, no qual a enzima não deve clivar, e C+ o controle positivo, o qual deve ser clivado pela T7. Sinais positivos indicam reação com a enzima, e negativos sem a enzima.	42
Figura 11. Eletroferograma da sequência genotipada, sendo o primeiro de um camundongo C57Bl/6J selvagem (WT) para comparação da sequência e do macho com a mutação em heterozigose (4A), nas fitas Forward (F) e Reverse (R), sendo em destaque de preto o sgRNA e nas setas as mutações na Ser273 e sítio da enzima de restrição ScaI, respectivamente.	43
Figura 12. (A) Eletroferograma dos camundongos mutados, das fitas Forward e Reverse, das duas fêmeas e dos dois machos. (B) Ensaio da enzima de restrição ScaI, com destaque para o Fundador macho 4A e os camundongos da geração F1 com a mutação, sendo as setas em rosa as clivagens pela enzima, nos tamanhos de ~400 e 200 pares de base.	44
Figura 13. (A) Eletroferograma demonstrativo de animais com a mutação em homozigose, heterozigose e selvagem, com as setas pretas indicando a região da Ser273 e o sítio da enzima de restrição, respectivamente. (B) Ensaio com a enzima de restrição ScaI mostrando 3 bandas no camundongo heterozigoto, duas bandas no homozigoto e uma banda no selvagem, com as setas vermelhas indicando as bandas de 400 e 200 pb resultantes da clivagem.	45
Figura 14. Árvore genealógica do fundador 4A, mostrando os heterozigotos na geração F1 e somente os homozigotos na geração F2.	45
Figura 15. Sequenciamento demonstrativo para o gene Sash3, em destaque para a região de pareamento com o RNA-guia, para análise de possíveis mutações.	46
Figura 16. Sequenciamento demonstrativo para o gene Gm14921, em destaque para a região de pareamento com o RNA-guia, para análise de possíveis mutações.	46

Figura 17. Caracterização animais WT e KI (oriundos da metodologia CRISPR/Cas9) no desmame, com 3 semanas de idade, com (A) peso corporal, (B) glicemia e (C) insulina plasmática; $n \geq 15$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$. 47

Figura 18. (A) Peso corporal absoluto dos animais a partir no desmame, a partir da 6ª semana de idade e semanalmente após 16 semanas de dieta hiperlipídica. (B) Percentual de ganho de peso e (C) consumo durante as 16 semanas de dieta hiperlipídica nos animais C57Bl/6J e KI. (D) Percentual de ganho de peso e (B) consumo de dieta por dia por camundongo durante as duas semanas de tratamento nos grupos C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney). 48

Figura 19. (A) Teste de resistência à insulina nos grupos C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e tratados com gelatina veículo por mais duas semanas, com respectiva área abaixo da curva dos gráficos de % ITT. (B) Taxa de decaimento da glicose (KITT). (C) Glicemia, (D) níveis plasmáticos de insulina e (E) adiponectina no estado alimentado; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ 49

Figura 20. Peso do fígado, tecido adiposo branco (WAT), rim, coração, músculo gastrocnêmico e tecido adiposo marrom (BAT) em relação ao comprimento da tíbia de cada animal C57Bl/6J ou KI após 16 semanas de dieta hiperlipídica e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$; $***p < 0,001$ 49

Figura 21. (A) Histologia hepática e (B) respectivo gráfico de percentual de acúmulo de lipídeos (esteatose), (C) níveis hepáticos de triglicérides dos animais C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ 50

Figura 22. Expressão gênica de PPAR γ em tecido adiposo branco (WAT) e fígado comparando animais C57Bl/6J e linhagem knockin alimentados com dieta normal ou hiperlipídica (HFD) por 16 semanas. Análise estatística Multiple Comparisons One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$; $n \geq 5$ por grupo. 51

Figura 23. Expressão relativa normalizada de diferentes genes no tecido adiposo branco (WAT) de animais C57Bl/6J e WT provenientes de CRISPR/Cas9, alimentados com dieta normal por 16 semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney). 52

Figura 24. Expressão de diferentes genes regulados pela fosforilação no tecido adiposo branco comparando animais C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$; $n \geq 5$ por grupo. 52

Figura 25. Expressão gênica nos animais C57Bl/6J e KI após 16 semanas de dieta hiperlipídica e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo. (A) Expressão relativa normalizada de genes-alvo do PPAR γ : Lep (leptina), Cfd (adipsina), Pdk4 (quinase piruvato desidrogenase 4) e Fabp4 (proteína ligadora de ácidos graxos). (B) Expressão relativa normalizada de Ucp1 (proteína desacopladora) no tecido adiposo branco (WAT) e marrom (BAT); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann Whitney), com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$ 53

Figura 26. Western Blotting do tecido adiposo branco (WAT) de animais C57Bl/6J e KI alimentados com dieta normal ou hiperlipídica por 16 semanas. (A) Figura representativa da expressão proteica de PPAR γ e Ser273 fosforilada, com duplicatas por grupo, utilizando a Vinculina como controle interno. Densitometria das bandas de Ser273 fosforilada normalizada pela vinculina comparando os grupos (B) C57Bl/6J alimentados com dieta normal e HFD, KI alimentados com dieta normal e HFD. (C) Densitometria das bandas de PPAR γ normalizada pela vinculina comparando os 4 grupos; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$ 54

Figura 27. Densitometria normalizada das bandas de Ser273 por vinculina e PPAR γ , nos grupos (A) C57 dieta normal e HFD, (B) C57 e KI dieta normal e (C) C57 e KI HFD; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$	54
Figura 28. (A) Percentual de ganho de peso e (B) consumo de dieta por dia por camundongo durante as duas semanas de tratamento nos diferentes grupos alimentados com dieta hiperlipídica e respectivos tratamentos por duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$	55
Figura 29. Peso do (A) fígado e tecido adiposo branco (WAT), (B) rim e coração e (C) músculo gastrocnêmico e tecido adiposo marrom (BAT) em relação ao comprimento da tíbia de cada animal após 16 semanas de dieta hiperlipídica e respectivo tratamento por duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$	56
Figura 30. (A) Teste de sensibilidade à insulina nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e respectivos tratamentos por 2 semanas, com respectiva área abaixo da curva dos gráficos de %ITT. (B) Taxa de decaimento da glicose (KITT); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA e two-way ANOVA no caso do %ITT, com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$	57
Figura 31. (A) Glicemia e (B) níveis plasmáticos de insulina no estado alimentado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica por 16 semanas e com seus respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$	58
Figura 32. Níveis plasmáticos de adiponectina dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$	58
Figura 33. (A) Histologia hepática e (B) respectivo gráfico de percentual de acúmulo de lipídeos (esteatose), (C) níveis hepáticos de triglicérides dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 4$ por grupo. Análise estatística por Multiple comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$	59
Figura 34. Análise histológica do tecido adiposo branco (WAT) dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas. Os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes realizados na espessura de 5 μm	60
Figura 35. Área, em μm^2 , dos adipócitos, identificando a média e o n amostral de cada um dos grupos após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.	61
Figura 36. Perímetro, em μm , dos adipócitos, identificando a média e o n amostral de cada um dos grupos após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas. ...	62
Figura 37. Análise da densidade de células em cada área de adipócito dos animais após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.	63
Figura 38. Análise da densidade de células em cada perímetro de adipócito dos animais após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.	64
Figura 39. Expressão relativa normalizada dos animais alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas, de genes regulados pela fosforilação da Ser273 (Nr1d2, Txnip e Gdf3) e da fosfatase Ppm1a responsável por defosforilar esse resíduo; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,0001$	65
Figura 40. Expressão gênica nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas. (A) Expressão relativa normalizada de genes envolvidos na via do PPAR γ e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo branco (WAT): Lep (leptina), Cfd (adipsina), Pdk4 (quinase piruvato desidrogenase 4) e Fabp4 (proteína ligadora de ácidos graxos). (B) Expressão relativa normalizada de Ucp1 (proteína desacopladora) no WAT e BAT; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t e Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$	66



Figura 41. Expressão relativa normalizada de genes hipotalâmicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas: Npy (neuropeptídeo Y) e Crh (hormônio liberador de corticotropina); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t e One-way ANOVA, com $*p < 0,05$	67
Figura 42. Níveis plasmáticos do hormônio corticosterona nos diferentes grupos de animais alimentados com dieta hiperlipídica; $n \geq 5$ por grupo.....	67
Figura 43. Esquema do mecanismo de ação do ligante AM-879 nas doses de 40mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, atuando tanto na via do PPAR γ através do bloqueio da fosforilação na Ser273 e, também, na via do hormônio liberador de corticotropina (Crh).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos efeitos do ligante não-agonista AM-879 em comparação à agonista Rosiglitazona [47].	26
Tabela 2. Composição da dieta hiperlipídica administrada aos camundongos, obtida da empresa PragSoluções e da dieta padrão, Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia).....	34
Tabela 3. Lista de genes avaliados, com respectivas sequências de primers Forward e Reverse, a referência utilizada no PubMed, concentração otimizada, percentual de eficiência e R ²	38
Tabela 4. Dados com relação à área e perímetro dos adipócitos em cada grupo após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas, com o n (número de células-adipócitos), média, primeiro e terceiro quartis e interquartil, sendo esse último utilizado como referência para remoção dos outliers (2*IQR).	60
Tabela 5. Efeitos resumidos dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e tratados com AM-879 em ambas as doses, Rosiglitazona e linhagem knockin com veículo.....	78



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Receptor ativador de proliferação em peroxissomos – PPAR.....	18
1.2. Obesidade e Diabetes	19
1.3. PPAR γ e os efeitos de sua ativação no contexto de Obesidade e Diabetes	20
1.4. PPAR γ e a fosforilação na Ser273.....	22
1.5. PPAR γ e AM-879, um ligante não-agonista.....	24
1.6. AM-879 e a via do hormônio liberador de corticotropina (Crh)	26
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	27
3. MÉTODOS	28
3.1. Mutação S273A através da metodologia CRISPR/Cas9.....	28
3.1.1. Desenho das sequências alvo e clonagem no vetor px330	29
3.1.2. Transcrição <i>in vitro</i>	31
3.1.3. Geração da linhagem murina contendo a mutação PPAR γ S273A	31
3.1.4. Genotipagem dos camundongos.....	31
3.1.5. Análise <i>off-targets</i>	32
3.2. Camundongos C57Bl/6J	33
3.2.1. Dieta hiperlipídica e indução de resistência à insulina	33
3.2.2. Tratamento oral voluntário com gelatina	34
3.4. Análises fisiológicas, metabólicas e moleculares.....	35
3.4.1. Medida de ingestão alimentar e ganho de peso	35
3.4.2. Teste de tolerância à insulina (ITT).....	35
3.4.3. Quantificação dos níveis de insulina, adiponectina e corticosterona por ELISA.....	36
3.4.4. Análise histológica de fígado	36
3.4.5. Quantificação dos níveis de triglicérides no fígado	36
3.4.6. Análise histológica do tecido adiposo branco.....	36
3.4.8. Expressão gênica: q-RT-PCR.....	37
3.4.9. Western Blotting.....	39
3.4.10. Análise estatística	40
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Estabelecimento da linhagem S273A	40
4.1.1. Análise do gene PPAR γ para desenho da estratégia de produção do <i>knockin</i>	40
4.1.2. Obtenção dos Fundadores	41
4.1.3. Geração F1- obtenção de heterozigotos.....	43
4.1.4. Geração F2- obtenção de homozigotos	44
4.1.5. Expansão da linhagem S273A	45
4.1.6. Análise <i>off-targets</i>	46



4.1.7. Caracterização do modelo <i>knockin</i>	46
4.2. Efeitos de diferentes doses do ligante AM-879 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	55
4.2.1- Análises fisiológicas.....	55
4.2.2- Sensibilidade à insulina e hormônios séricos	56
4.2.3- Análises morfométricas a partir de histoquímica e triglicérides hepático.....	58
4.2.4- Análise de expressão gênica	64
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	79
5. REFERÊNCIAS	81
6.ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Receptor ativador de proliferação em peroxissomos – PPAR

Os PPARs são fatores de transcrição que pertencem à superfamília dos receptores nucleares (RNs), os quais são importantes em diversos processos fisiológicos, como proliferação celular, desenvolvimento, imunidade, metabolismo e reprodução, sendo um importante alvo de modulação e estudos [1, 2]. Seus ligantes, no geral, podem induzir uma grande variedade de respostas, como agonismo total, parcial, antagonismo e agonismo inverso. No primeiro caso, os compostos promovem uma alteração conformacional de tal forma que o receptor se torna favorável à interação com coativadores (como SRC1), possibilitando sua ativação e uma resposta fisiológica elevada, como é o caso da Rosiglitazona com o PPAR γ . No agonismo parcial, ocorre também uma ativação, porém de forma menos intensa e com menores efeitos, enquanto que no antagonismo ocorre bloqueio da ativação do receptor, seja pelo recrutamento de correpresores (como NCoR), ou pelo bloqueio da interação com coativadores. Já no antagonismo, o ligante se liga ao LBD e previne a alteração conformacional, impedindo o recrutamento de coativadores e subsequente ativação da transcrição gênica. Por fim, no agonismo inverso, ocorre a ligação com um receptor ativo constitutivamente, desativando-o [3-5].

Além de estarem sujeitos a alterações com a ligação de um ligante, os RNs podem sofrer diversas modificações pós-traducionais, como metilação, fosforilação, sumoilação e acetilação, que consistem na ligação covalente de um grupo químico a resíduos de aminoácidos. Essas alterações podem levar a diversas consequências nas propriedades químicas das proteínas, podendo modular suas funções, além de regular diversos aspectos da proteína, como estabilidade, localização celular, interações, entre outros [6].

Os PPARs foram originalmente identificados na década de 1990 através da clonagem do gene em sapos do gênero *Xenopus* [7], sendo inicialmente caracterizados como mediadores da proliferação em peroxissomos [7, 8]. Posteriormente, após serem considerados como receptores órfãos devido à ausência de ligantes que pudessem interagir com eles, identificou-se os ácidos graxos e seus derivados como moléculas efetoras dos PPARs, atuando no metabolismo de lipídeos e glicose, proliferação celular, entre outros processos [9, 10].

Existem 3 isotipos de PPAR com diferentes distribuições nos tecidos, especificidade de ligantes e atividades regulatórias: PPAR α (NR1C1- codificado pelo gene PPARA), PPAR β/δ (NR1C2- codificado pelo gene PPARB) e PPAR γ (NR1C3- codificado pelo gene PPARG) [11].

Em linhas gerais, o PPAR α é altamente expresso em tecidos metabolicamente ativos, como fígado, rim e tecido adiposo marrom, além de células musculares e endoteliais, atuando na oxidação de ácidos graxos, montagem de lipoproteínas, gliconeogênese e ação anti-inflamatória [12, 13]. O PPAR β/δ é encontrado em altos níveis no cérebro, tecido adiposo, ilhotas pancreáticas e pele, com papel mais proeminente na proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, principalmente de queratinócitos [13]. Já o PPAR γ localiza-se no intestino, fígado, rim, tecido adiposo, entre outros, e possui duas isoformas distintas resultantes de variantes de splicing: PPAR γ 1 e γ 2, que diferem no tamanho da extremidade N-terminal e na localização, visto que o PPAR γ 2 é encontrado exclusivamente em adipócitos. Com isso, o PPAR γ possui papel essencial na obesidade, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina, além de possuir importante papel anti-inflamatório e na dissipação de energia no tecido adiposo marrom [12-14].

Os PPARs formam heterodímeros obrigatórios com o receptor de ácido retinóico X (RXR) e esse heterodímero se liga ao DNA através de sequências repetidas de AGGTCA separadas por um ou dois nucleotídeos (também chamadas de como DR-1 ou DR-2), sendo conhecidas como elementos de resposta dos proliferadores de peroxissomos (PPREs) [15]. No mecanismo clássico de ação dos PPARs, a ligação de um ligante no domínio LBD do receptor induz uma alteração conformacional no receptor, mais especificamente no domínio da região de ativação dependente de ligante (AF-2). Com isso, ocorre a liberação dos correpressores (CoRs) e dos complexos de histonas desacetilases (HDAC), assim como o recrutamento de coativadores (CoAs) e dos complexos de histonas acetilases (HAT). Já na ausência de ligante, os RNs estão presentes no citoplasma ou no núcleo ligados aos PPREs, formando um complexo repressor composto por proteínas CoRs e HDACs [16].

1.2. Obesidade e Diabetes

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo a causa prematura de pelo menos 4,7 milhões de mortes em 2017. Ainda, estima-se para 2025 que 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em pesquisa feita em 2019, o percentual de obesos mais que dobrou na população com mais de

20 anos, subindo de 12,2 % para 26,8 %, atingindo 41 milhões de pessoas no Brasil com obesidade. Já a proporção de indivíduos com sobrepeso passou de 43,3 % para 61,7 %, sendo que esses dados estão diretamente relacionados com o aumento na incidência de doenças como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares [17].

Quadros de obesidade são resultado, principalmente, de um desbalanço energético, ou seja, um desequilíbrio entre gasto e consumo de energia, além de fatores genéticos e ambientais, como qualidade da dieta e estilo de vida. Inicialmente, esse excesso de gordura é armazenado no tecido adiposo subcutâneo, porém quando esse tecido se torna sobrecarregado, ocorre o acúmulo desses lipídeos para outras regiões do corpo, ativando um processo inflamatório generalizado, que é característico de pessoas obesas. Com isso, ocorre um aumento de macrófagos e outras células inflamatórias, que secretam citocinas pró-inflamatórias, o que contribui diretamente para o desenvolvimento da resistência à insulina e, conseqüentemente, diabetes tipo 2 [18].

Existe uma correlação positiva entre obesidade e diabetes tipo 2, sendo que já foi demonstrado um aumento de 8-10 vezes na chance de desenvolvimento dessa patologia em indivíduos obesos [19]. Dados de 2021 da Federação Internacional de Diabetes (IDF) indicam que 537 milhões de adultos são diabéticos, sendo que esses números devem aumentar para 783 milhões em 2045. Além disso, essa doença foi responsável por 6,7 milhões de mortes no mundo, o que indica a importância da prevenção e tratamento, assim como a busca por desvendar os mecanismos por trás do seu desenvolvimento.

1.3. PPAR γ e os efeitos de sua ativação no contexto de Obesidade e Diabetes

Diante do importante papel do PPAR γ em diversos processos metabólicos, principalmente no metabolismo de lipídeos e glicose, esse RN é alvo de diversos estudos no contexto da obesidade e diabetes. Nesse cenário, em 1982 foram descobertos os efeitos anti-diabéticos das Tiazolidinedionas (TZDs), ou glitazonas, que atuam via modulação da atividade do PPAR γ e foram amplamente utilizadas para o tratamento de diabetes tipo 2 (DT2) [20]. A mais conhecida das TZDs é a Rosiglitazona, que foi sintetizada em 1988 e tem um papel mais potente na sensibilização à insulina, sendo em 1999 liberada para tratamento de DT2, porém foi retirada do mercado tempos depois devido ao aumento no risco de infarto do miocárdio, câncer de bexiga, ganho de peso, entre outros efeitos colaterais [4, 21]. Posteriormente, foi demonstrado que o agonismo total dessas moléculas era responsável pela maioria dos efeitos adversos associado ao uso desses fármacos [22]. Outra TZD que vale mencionar é a Pioglitazona, que

diferentemente da Rosiglitazona, ainda é comercializada como tratamento para diabetes tipo 2 e utilizada também para fins de pesquisa, também promovendo melhora da sensibilidade à insulina, além de efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes, redução de ácidos graxos livres e triglicérides, entre outros efeitos [23-25].

O PPAR γ possui ação pleiotrópica em diversos tecidos (Figura 1), como no metabolismo da glicose, por atuar na captação da mesma, e de lipídeos, promovendo a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, aumento na secreção de adiponectina, além de efeitos neuroprotetores e regulação do processo inflamatório por uma interação direta com a via do NF- κ B [14, 26].

No que se refere ao metabolismo, o PPAR γ é responsável por regular a expressão de diversos genes. Nos adipócitos, a ativação desse receptor leva a um aumento na expressão de adiponectina, substrato 2 do receptor da insulina (IRS2), transportador 4 de glicose (GLUT4) e proteína associada à Cbl (CAP), que estão relacionados com sensibilidade à insulina e captação de glicose. Além disso, o PPAR γ regula positivamente genes envolvidos no estoque de ácidos graxos e metabolismo de lipídeos, como a proteína translocadora de ácidos graxos CD36, perilipina, e proteína ligadora de ácidos graxos (FABP4); e no metabolismo de glicose, com a regulação da glicoquinase (GK) [27].

Entretanto, a ativação do PPAR γ também leva à repressão de diversos genes, como da leptina, fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina-6 (IL-6), além de reduzir os níveis de ácidos graxos livres no plasma e aumentar o número de pequenos adipócitos, concomitantemente com uma redução no número de grandes adipócitos no tecido adiposo branco. Fora este tecido, a ativação desse receptor no fígado e em células β -pancreáticas leva ao aumento na expressão de genes que codificam a enzima GK e o transportador 2 de glicose (GLUT2), respectivamente [27].

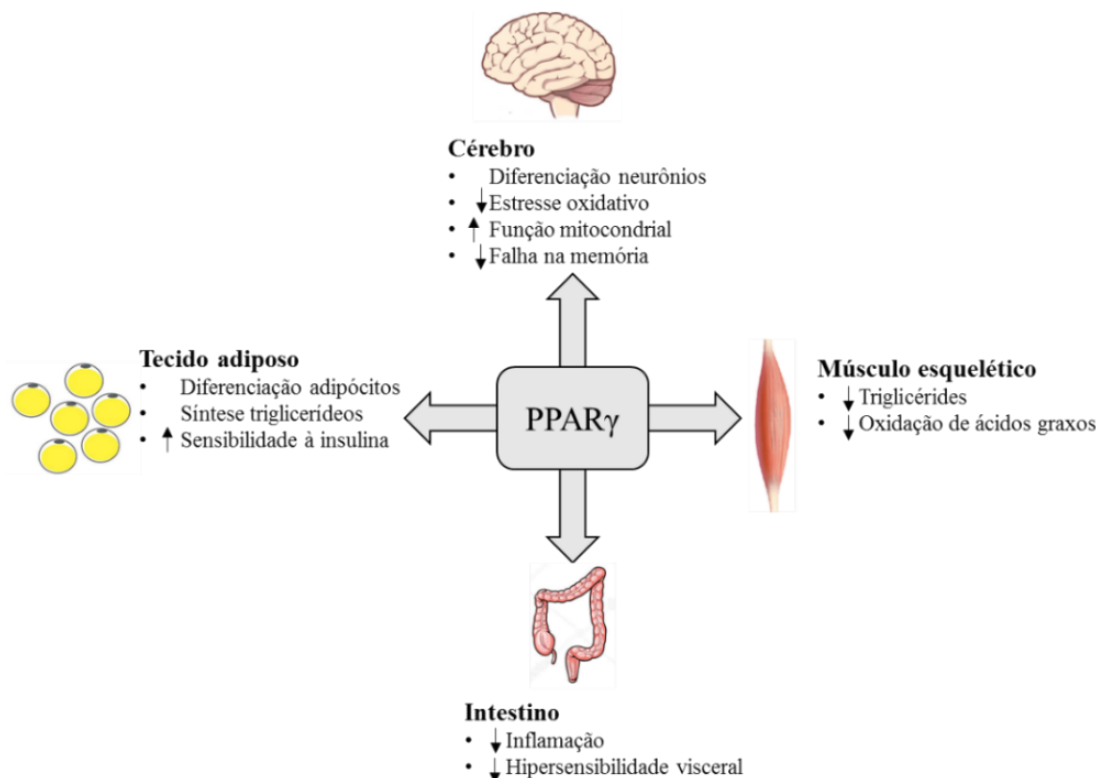


Figura 1. Efeitos da ativação do PPAR γ em diversos órgãos (Adaptado de [19]).

Diante dos diversos efeitos da ativação do PPAR γ , e consequente transcrição de seus genes-alvo, e efeitos adversos, a busca por novos compostos que modulem esse RN tornou-se recorrente, porém por moléculas que atuem como agonistas parciais ou moduladores seletivos, e até mesmo antagonistas, de forma a interagir de uma maneira distinta ao LBD do receptor, causando um recrutamento ou desacoplamento diferencial de correguladores. Os agonistas parciais e antagonistas atuam de forma estruturalmente distinta dos agonistas, exibindo reduzida ou nenhuma atividade transcricional, porém mantendo a alta afinidade ao receptor. Com isso, os efeitos colaterais seriam reduzidos, mas os efeitos anti-diabéticos mantidos, obtendo um balanço entre a potência e o agonismo do receptor [4, 28, 29].

1.4. PPAR γ e a fosforilação na Ser273

Dentre as diversas modificações pós-traducionais às quais o PPAR γ está sujeito, a fosforilação vem sendo a mais estudada. Trabalhos anteriores [30, 31] já mostraram que a fosforilação na Ser112 na região N-terminal do domínio AF-1 da isoforma 2 do receptor, pela MAPK quinase, inibe sua atividade transcricional por controlar a interação do ligante com o

domínio LBD do receptor ou recrutamento de correguladores, sendo que estudos *in vitro* observaram que a mutação desse resíduo para Alanina leva a uma maior ativação do PPAR γ . Além disso, *in vivo*, essa mutação em homozigose protegeu os animais alimentados com dieta hiperlipídica de desenvolverem resistência à insulina, apesar de continuarem obesos [32].

Em 2009, em meio às diversas discussões sobre os efeitos deletérios das TZDs, um estudo revelou uma nova fosforilação, que ocorre no resíduo da Serina 273 (Ser273) do PPAR γ , sendo uma das principais responsáveis pela resistência à insulina. Foi demonstrado que esses fármacos atuam bloqueando a fosforilação desse resíduo, modificando a estrutura do PPAR γ de uma forma distinta que estaria relacionada com a sensibilização à insulina [22].

Essa fosforilação é mediada principalmente pela proteína quinase Cdk5, mas também pela quinase ERK [33], sendo que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um quadro de obesidade induzem um processo inflamatório que promove a clivagem da proteína p35 em p25 no citoplasma. Esta é responsável por ativar a Cdk5 no núcleo, que fosforila o PPAR γ no resíduo de Ser273 [34]. Essa modificação no receptor leva à desregulação de uma grande quantidade de genes, os quais apresentam níveis de expressão alterados durante a obesidade, promovendo resistência à insulina. Dentre os 17 genes descritos em 2010 como regulados pela fosforilação da Ser273 do PPAR, podemos citar o *Nr1d2*, componente molecular chave do relógio circadiano, com papel na regulação do gasto energético e consumo de dieta [35], e o *Txnip*, que codifica uma proteína reguladora do estresse oxidativo na célula, sendo induzida por hiperglicemia, inibindo a captação de glicose e sugerindo um papel da patogênese da DT2 [36], ambos avaliados nesse projeto.

Em um trabalho recente do nosso grupo [37] foi visto que essas alterações provocadas pela fosforilação da Ser273 podem ser explicadas devido a um recrutamento diferencial de correguladores, mais especificamente devido a um aumento no recrutamento de CoRs (NCoR e SMRT), uma vez que essa fosforilação não altera a ocupância do receptor na cromatina (Figura 2) [22, 34, 38].

Além disso, em 2020 foi publicado um trabalho em que camundongos com uma mutação *knockin* pontual na Ser273 do PPAR γ , impedindo sua fosforilação. Neste trabalho, os animais não desenvolvem resistência à insulina quando submetidos à dieta hiperlipídica. Ainda, verificaram a expressão diferencial do gene *Gdf3*, uma proteína membro da família do TGF- β ,

a qual tem expressão reduzida no tecido adiposo branco dos animais mutantes, indicando um alvo promissor no contexto de modulação da fosforilação do PPAR γ , diabetes e obesidade [39].

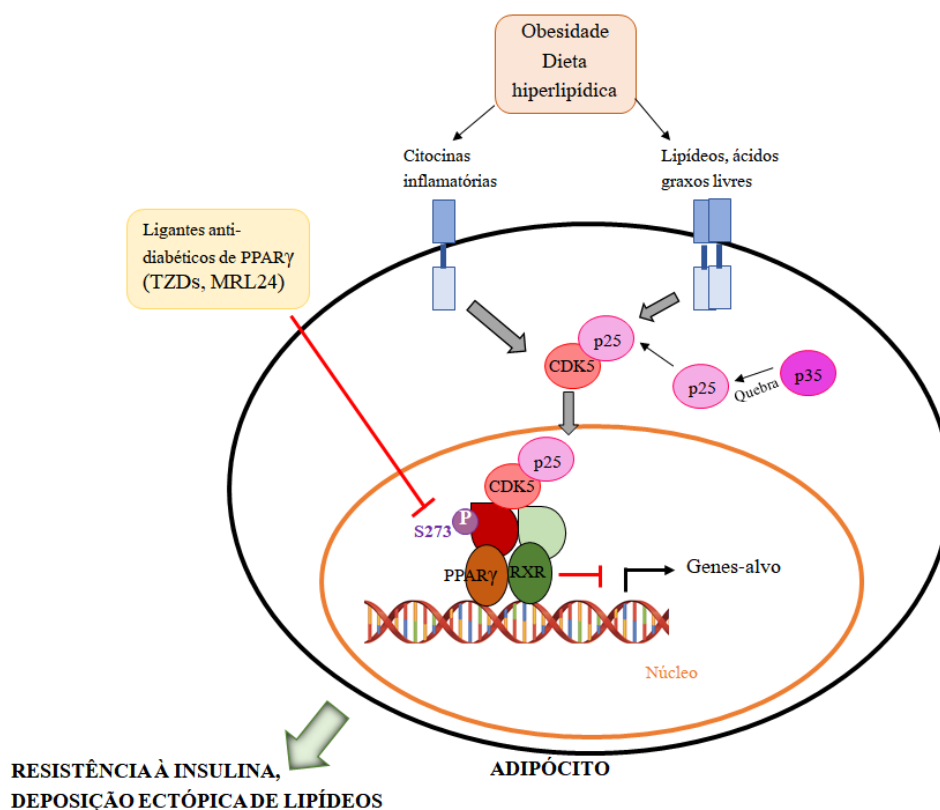


Figura 2. Via de ativação da CDK5 e fosforilação da Ser273 do PPAR γ , indicando a atuação dos ligantes anti-diabéticos (Adaptado de Choi et al., 2010 [28]).

Diante disso, surge a hipótese de que o desenvolvimento de um bom fármaco sensibilizador à insulina seria focado em uma molécula capaz de estabilizar o sítio de ligação do receptor, impedindo a fosforilação na Ser273, sem causar a ativação transcricional do PPAR (como um agonista total). Ou seja, uma molécula capaz de se ligar ao sítio sem fazer contatos diretos com a hélice H12 do receptor e que seja capaz de prevenir a fosforilação [40, 41].

1.5. PPAR γ e AM-879, um ligante não-agonista

Até o momento, diversas plataformas de *screening* já foram desenhadas na busca por ligantes de PPAR γ , dentro das quais as metodologias baseadas em ensaios de transativação combinados com ensaios de afinidade são os mais bem estabelecidos para compostos que ativam esse receptor [42-44]. Contudo, ainda é restrito o número de técnicas utilizadas na busca por moléculas não-agonistas de PPAR γ [45, 46].

Dentro desses poucos estudos, nosso grupo identificou o ligante AM-879, com sua estrutura ilustrada na Figura 3 (4-methyl benzoic acid, AM-879-40965082, Specs), o qual se liga ao

PPAR γ , porém não tem capacidade de ativá-lo, ou seja, é uma molécula não-agonista do receptor [45]. Além disso, a interação desse ligante com o PPAR γ foi analisada, observando uma afinidade moderada ($K_d = 4,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$), quando comparado à Rosiglitazona, que possui elevada afinidade ao receptor ($K_d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Com relação à ativação, foi observado, através de curvas dose-resposta em ensaio com células 293T, que o AM-879 não ativa o PPAR até mesmo na concentração mais elevada [47].

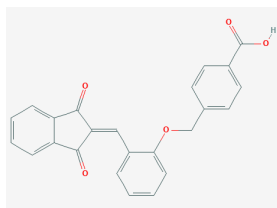


Figura 3. Estrutura do ligante AM-879, obtida do PubChem.

Nesse estudo também foi verificada a influência do AM-879 no recrutamento de correguladores, não favorecendo o acoplamento de CoAs, e também não induzindo a liberação de CoRs ligados ao PPAR γ . Além disso, através de ensaio de diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1 verificou-se a interferência do ligante nesse processo, sendo observado que o AM-879 não leva a um aumento no acúmulo de lipídeos, nem na diferenciação de adipócitos. Ainda, a partir desse ensaio foi analisada a expressão gênica de alvos do PPAR γ , no qual obteve-se uma redução nos níveis de Adipisina (*Cfd*), Adiponectina (*Adipoq*) e *CD36*, além de não ter alterado a expressão de *Pparg*, Leptina (*Lep*), proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT (*Cebpa*) e Lipase lipoproteica (*Lpl*), sendo que esses resultados diferem completamente do que é observado no tratamento com Rosiglitazona [47].

A redução ou não alteração na expressão desses genes indicam que o ligante AM-879 não induz marcadores relacionados à adipogênese, em contraste com os efeitos do agonismo da Rosiglitazona. Além disso, a diminuição na expressão de *Cd36*, o qual é responsável pela translocação de cadeias de ácidos graxos livres para o interior de adipócitos, sugere a ação desse não-agonista em limitar o influxo dessas cadeias. De forma mais surpreendente, a redução na expressão do gene que codifica para a adiponectina sugere uma competição com agonistas endógenos, como ácidos graxos, ou devido à modulação de outras vias de sinalização, porém os resultados em conjunto demonstram uma tendência do AM-879 em reduzir o processo de adipogênese [47].

Por fim, neste mesmo estudo foi verificado a relação do AM-879 com a fosforilação da Ser273 pela CDK5, observando que esse ligante reduz significativamente a fosforilação, assim

como a Rosiglitazona, quando comparado à proteína na ausência de ligante, indicando uma possível atuação na sensibilização à insulina (Tabela 1) [47].

Tabela 1. Comparação dos efeitos do ligante não-agonista AM-879 em comparação à agonista Rosiglitazona [47].

AM-879	Rosi
Menor afinidade	Maior afinidade
Não-agonista	Agonista
Não favorece coativadores	Favorece coativadores
Não libera correpressor	Reduz afinidade com correpressor
Não induz adipogênese	Induz adipogênese
Reduz fosforilação em 28 %	Reduz fosforilação em 22 %

1.6. AM-879 e a via do hormônio liberador de corticotropina (Crh)

Um estudo depositado em 2012 na plataforma online Pubchem identificou o AM-879 como uma molécula que interage com a via do hormônio liberador de corticotropina (Crh ou Crf) e seu receptor CrhR, a qual está relacionada principalmente com a via do estresse (PubChem AID 651639 e CID 1209375). Essa família de neuropeptídeos foi primeiramente caracterizada em 1981, sendo identificada como um importante regulador da resposta endócrina ao estresse, atuando na regulação da ingestão alimentar e saciedade, motilidade gastrointestinal, desenvolvimento vascular e função cardíaca [48].

A atuação dessas moléculas ocorre através de seus receptores, que pertencem à classe B de receptores acoplados à proteína G, chamados de CrfR1 e CrfR2, sendo produzidos por genes distintos com diversas variantes de splicing. O Crh é encontrado principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, no núcleo central da amígdala e em outras regiões do sistema nervoso central, além da tecidos periféricos como pele e glândula adrenal. Além de seus receptores, esse hormônio sofre regulação através da Crf-BP (proteína ligadora de Crf/Crh), a qual pode formar um dímero com essa molécula e modular sua atividade endócrina, inativando-a [48, 49].

Estudos já mostraram a direta relação entre a atuação do Crh e neuropeptídeo Y (Npy) no hipotálamo, juntamente com a leptina e grelina, participando principalmente dos mecanismos de controle da saciedade e ingestão alimentar. Nesse contexto, já foi descrito que o Npy atua aumentando a ingesta e reduzindo gasto energético [50, 51], enquanto que o Crh tem funções opostas [51, 52]. Além disso, a atuação da leptina, através do seu receptor hipotalâmico,

consiste em reduzir a síntese e/ou secreção de Npy e aumentar a síntese e/ou secreção de Crh, modulando o balanço energético de redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético [51].

Como forma de comprovar tal relação, estudos realizados em camundongos *ob/ob* deficientes para leptina demonstraram um aumento nos níveis de Npy no hipotálamo, enquanto que os níveis de Crh não se alteraram [53]. Ainda nesse contexto, a grelina também possui um importante papel por atuar diretamente na ativação do Npy hipotalâmico, aumentando a ingesta alimentar [54], indicando que essas 4 moléculas atuam em cooperação nos processos de consumo alimentar e gasto energético, sendo uma via alternativa de atuação do AM-879 (Figura 4).

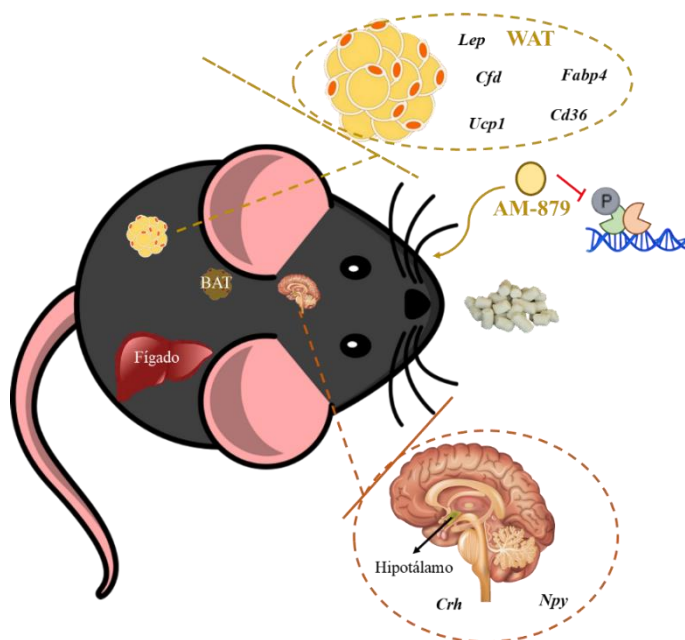


Figura 4. Esquema das vias de atuação do AM-879: CRH e PPAR γ , com os principais órgãos envolvidos e analisados, sendo eles: hipotálamo, fígado, tecido adiposo marrom (BAT) e branco (WAT).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

De acordo com as projeções mundiais, o aumento na incidência de diabetes juntamente com a obesidade, traz uma responsabilidade cada vez mais forte para a pesquisa de fármacos mais específicos e que tenham menores efeitos colaterais, não favorecendo o aumento de gordura

corporal. Nesse contexto, já se sabe a importância e relação do receptor nuclear PPAR γ e sua fosforilação no resíduo da Ser273 com a obesidade e sensibilização à insulina.

Diante disso, o modelo de estudo proposto poderá auxiliar na definição das bases fisiológicas e moleculares dessa fosforilação, visto que os trabalhos já existentes foram realizados *in vitro*, enquanto que este se trata de um modelo *in vivo*, podendo os dados de ambos serem comparados, a fim de se verificar se o que é visto na célula ocorre no organismo como um todo.

Além disso, estudos *in vitro* da interação PPAR γ -AM-879 mostraram que este ligante não causa um aumento na diferenciação de adipócitos ou acúmulo de lipídios, assim como não ativa o PPAR γ e reduz sua fosforilação na Ser273, indicando uma possível sensibilização à insulina [47]. Buscou-se, *in vivo*, analisar seus efeitos no que se refere à fisiologia do animal, ou seja, analisando os efeitos do possível bloqueio da fosforilação da Ser273 e sua atuação como não agonista de PPAR γ , comparando-o ao efeito já bem estabelecido em literatura da Rosiglitazona.

Assim, os objetivos desse trabalho foram:

- 1- Desenvolvimento, estabelecimento e caracterização da linhagem de camundongos *knockin* com a mutação pontual PPAR γ S273A, através do sistema CRISPR/Cas9;
- 2- Investigar os efeitos de diferentes doses do ligante AM-879 (dose escolhidas baseado em [55] e nos ensaios de afinidade de [47]) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e comparar os dados com os animais *knockin* S273A obtidos via CRISPR/Cas9;
- 3- Avaliar parâmetros como ingestão alimentar, peso corpóreo, níveis séricos de insulina, adiponectina, cortisol, triglicérides hepático e os efeitos na sensibilidade à insulina do camundongo tratado com veículo, AM-879 em duas doses (40 e 100 mg/kg/dia) e Rosiglitazona, além de comparar os níveis de expressão de genes regulados pela fosforilação através de q-RT-PCR no tecido adiposo branco, assim como genes-alvo do PPAR γ e genes relacionados à via do Crh no hipotálamo.

3. MÉTODOS

3.1. Mutação S273A através da metodologia CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 é baseado em um mecanismo de defesa adaptativo em Bactérias e Archaea contra a invasão de vírus e plasmídeos, no qual usa-se CRISPR (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) e proteínas nucleases Cas

(associadas a CRISPR) [56]. Essas repetições estão interespaçadas por sequências curtas derivadas do DNA exógeno alvo, chamadas de *protospacers*, constituindo o RNA CRISPR (crRNA). Após duas décadas de estudo, o sistema CRISPR/Cas9 foi otimizado para fins de edição específica do genoma e é fundamentado no uso de um RNA guia (sgRNA) que direciona a endonuclease Cas9 para o *locus* alvo de modificação [57]. O sgRNA contém uma sequência alvo de 20 nucleotídeos complementar à sequência do *locus* alvo e um RNA transativador auxiliar (tracrRNA), o qual participa do endereçamento da Cas9 para o sítio alvo de modificação, que deve ser precedido de uma sequência 5'-NGG PAM [58].

No DNA alvo, a Cas9, por ser uma nuclease, gera uma quebra na dupla fita de DNA (DSB), a qual pode ser reparada pelo mecanismo não-homólogo (NHEJ), ou pelo mecanismo de homologia (HDR). Na ausência de um DNA homólogo ao *locus* alvo (DNA molde), a via NHEJ é ativada e pode ocasionar inserções e/ou deleções. Estas, por sua vez, podem resultar em mudança do códon de leitura do ribossomo e/ou na criação de um códon de parada prematuro, resultando em um *knockout* gênico. Por outro lado, na presença de um DNA molde, o mecanismo HDR é ativado e, como apresenta maior fidelidade, permite que a edição do genoma seja feita da forma desejada, inserindo, por exemplo, mutações específicas (*knockin*) ou genes repórteres (Figura 5) [58].

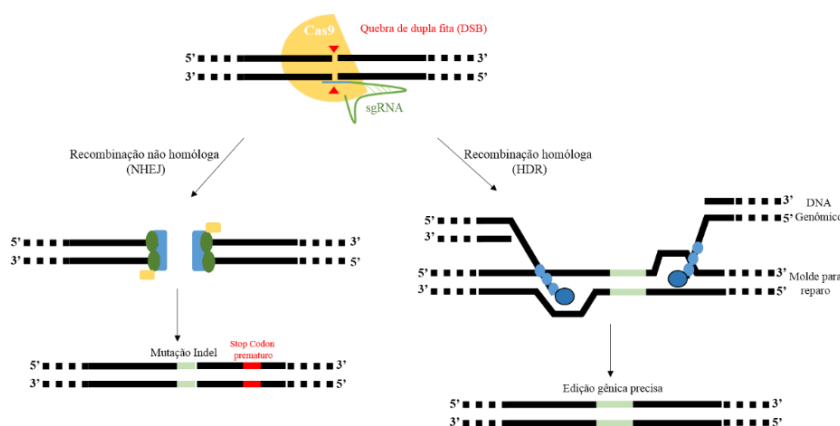


Figura 5. Esquema da quebra de dupla fita de DNA (DSB) promovida pela Cas9 e direcionada pelo sgRNA e os mecanismos de reparo por não-homologia (NHEJ) ou por homologia (HDR) que podem ser ativados (Adaptado de [58]).

3.1.1. Desenho das sequências alvo e clonagem no vetor px330

A ferramenta de análise MIT CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) é utilizada para identificar e classificar os sítios alvos mais adequados e computacionalmente prever os sítios *off-target* de cada sequência alvo. Se a sequência alvo de 20 nucleotídeos não iniciar com uma base guanidina, a eficiência de transcrição do promotor U6 pode ser reduzida.

Nesse caso, uma guanidina é adicionada na primeira posição da porção 5', formando uma sequência alvo de 21 bases [58].

Para a construção do sgRNA, dois oligonucleotídeos (oligo) – desenhados previamente – que correspondem à fita de DNA superior e à fita inferior da sequência alvo, foram anelados através de incubação de 1 μ L do oligo superior a 100 μ M, 1 μ L do oligo inferior a 100 μ M, 1 μ L de tampão 10x da T4 DNA ligase buffer (New England Biolab - NEB), 0,5 μ L de T4 PNK (NEB) e 6,5 μ L de água, nas seguintes condições: incubação a 37 °C por 30 min, 95 °C por 5 min, redução para 25 °C à 0,1°C/segundo, 25 °C por 5 min. Para clonagem do oligo anelado no vetor px330, o vetor foi digerido previamente com a enzima de restrição BbsI (NEB) e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina. O vetor purificado (100 ng) foi então ligado ao oligo anelado, utilizando 50 ng do vetor (0,43 μ L), 1 μ L do oligo anelado, 1 μ L de tampão da T4 DNA ligase, 0,5 μ L de T4 DNA ligase (NEB) e 7,07 μ L de água. A reação de ligação é incubada em banho-maria à 16 °C por 16 h.

Após esse processo, o oligo anelado ao vetor foi transformado em bactérias DH5 α quimiocompetentes, utilizando 10 μ L da reação de ligação e ~50 μ L de bactéria, realizando-se também uma placa controle somente com o vetor px330. A transformação foi realizada através de choque térmico, em que o oligo anelado ao vetor e a bactéria ficaram em contato por 25 minutos no gelo, depois 1 minuto à 42°C seguido por 1 minuto no gelo. Foi adicionado 300 μ L de meio SOC (rico em glicose) ao eppendorf para colocá-lo no shaker à 37°C por 1 hora. Após esse tempo, centrifugou-se à 5000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o excesso de meio SOC foi retirado e plaqueou-se em meio LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina, mantendo overnight à 37 °C.

Realizou-se então pré-inóculo de 10 colônias e, posteriormente, PCR de colônia líquida, utilizando tampão PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 mM dos primer F (promotor U6) e R (sgRNA anti-sense), 0,5 U Taq Polimerase, água e DNA da bactéria (controle negativo sem DNA). Utilizou-se o protocolo de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de: 94 °C 1 minuto, 57 °C 1 minuto e 72 °C 30 segundos, seguido de 72 °C por 10 minutos e finalizando à 4°C. Após o término da reação, foi feito um gel de agarose 1 % para verificação do resultado.

As colônias positivas foram selecionadas para realização da mini-prep com o objetivo de purificar o DNA plasmidial. O produto obtido foi quantificado no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Essas amostras foram enviadas para o sequenciamento de DNA para

a confirmação da clonagem, utilizando 0,5 μL do primer U6 seq F (GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTC), 1,5 μL do DNA plasmidial purificado, 4 μL de água, 3 μL de tampão e 1 μL de Big Dye.

3.1.2. Transcrição *in vitro*

Os RNAs guias foram gerados através de transcrição *in vitro* utilizando a enzima T7 RNA polimerase (MEGAscript T7 kit, Life Technologies) e o produto de PCR T7-sgRNA como molde. O mRNA da Cas9 foi gerado por transcrição *in vitro* utilizando o mMACHINE T7 ULTRA kit (Life Technologies) e o produto de PCR T7-Cas9 como molde.

3.1.3. Geração da linhagem murina contendo a mutação PPAR γ S273A

A linhagem murina com a mutação S273A no PPAR γ foi gerada no Laboratório de Modificação do Genoma (LMG/LNBio) em colaboração com a pesquisadora Dra. Ângela Saito. Em resumo, foram realizadas microinjeções em pró-núcleo de embrião a 0,5 dia pós-coito (dpc) de uma mistura contendo o mRNA da Cas9 (100 ng/ μL), o RNA guia (50 ng/ μL) e o oligo doador (100 ng/ μL). Para reduzir a frequência do mecanismo de reparo da célula pela via NHEJ (*Non homologous end joining*), os embriões microinjetados foram incubados em meio KSOM suplementado com 50 μM de SCR7 (um inibidor da T4 DNA ligase que participa da via NHEJ), por cerca de 16 horas em estufa, mantida a 37 °C e 5% CO₂. Por fim, os embriões no estágio de duas células foram transferidos para o útero de fêmeas pseudogravídas para que continuassem o processo de gestação.

3.1.4. Genotipagem dos camundongos

Os camundongos originados da microinjeção pró-nuclear dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 ou dos cruzamentos subsequentes foram genotipados através de extração de DNA genômico (gDNA) da cauda do animal utilizando um tampão de lise composto por: 100 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 5mM EDTA pH 8, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K e água, sendo 500 μL deste para cada cauda, incubando por overnight à 55 °C 600 rpm. Após esse processo, utilizou-se isopropanol para precipitar o DNA e etanol para lavá-lo, com posterior quantificação no Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Foi realizada PCR para amplificar as regiões de inserção utilizando a enzima Pfu DNA Polymerase, da Celco Biotec do Brasil (São Carlos, SP- Brasil), seguindo instruções do fabricante e utilizando os primers desenhados previamente para genotipagem: 5'-TCAGGTTTGGGCGGATGCCA-3' (Forward) e 5'-TGTGCCCACTTTGGACCTGGG-3'

3.2. Camundongos C57Bl/6J

Para o tratamento com o ligante AM-879, foram utilizados camundongos machos C57Bl/6J obtidos do biotério do Laboratório de Modificação do Genoma (LMG) do LNBio, de 6 semanas de idade e sendo mantidos em Biotério a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ com ciclos claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA)/CNPEM, protocolos número 58 e 72. A dose do ligante AM-879 foi escolhida com base nos ensaios *in vitro* de afinidade ao PPAR γ , uma vez que esta é 10 vezes menor que da Rosiglitazona (controle positivo), sua dose seria maior. Além disso, realizamos um estudo piloto *in vivo*, no qual observamos que a dose de 40mg/kg/dia se assemelhou mais ao controle positivo no ITT ao promover uma melhora na sensibilidade à insulina e não provocou alterações fisiológicas nos animais alimentados com dieta normal. Ainda, utilizamos também uma dose 25 vezes maior que da Rosiglitazona, uma vez que se trata de um ligante novo com menor afinidade e possível envolvimento em outra via.

Diante disso, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 1- Dieta normal com administração de veículo (Sucralose 20 % com 0,1 % Tween 80);
- 2- Dieta hiperlipídica com administração de veículo (Sucralose 20 % com 0,1 % Tween 80);
- 3- Dieta hiperlipídica com administração do ligante AM-879 na dose de 40 mg/kg/dia;
- 4- Dieta hiperlipídica com administração do ligante AM-879 na dose de 100 mg/kg/dia;
- 5- Dieta hiperlipídica com administração da Rosiglitazona na dose de 4 mg/kg/dia;
- 6- Camundongos *knockin* com dieta hiperlipídica e administração de veículo (Sucralose 20 % com 0,1 % Tween 80).

3.2.1. Dieta hiperlipídica e indução de resistência à insulina

Com 6 semanas de idade, iniciou-se a administração de dieta hiperlipídica (high-fat diet-HFD), ou de dieta normal, de acordo com a divisão de cada grupo de animais. A dieta hiperlipídica foi obtida da empresa PragSoluções (Jauá-São Paulo, Brasil), e a dieta padrão utilizada foi a Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia), com composições mostradas na Tabela 2. Para indução de um quadro de obesidade, os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica por 18 semanas a partir da 6^a semana de idade, sendo o tratamento feito nas duas últimas semanas de dieta (Figura 7).

Tabela 2. Composição da dieta hiperlipídica administrada aos camundongos, obtida da empresa PragSoluções e da dieta padrão, Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia).

% Valor energético total (VET)	Dieta hiperlipídica	Dieta padrão
Carboidratos	20	60
Proteínas	20	22
Gordura	60	5
Total Kcal	5217,3	3880

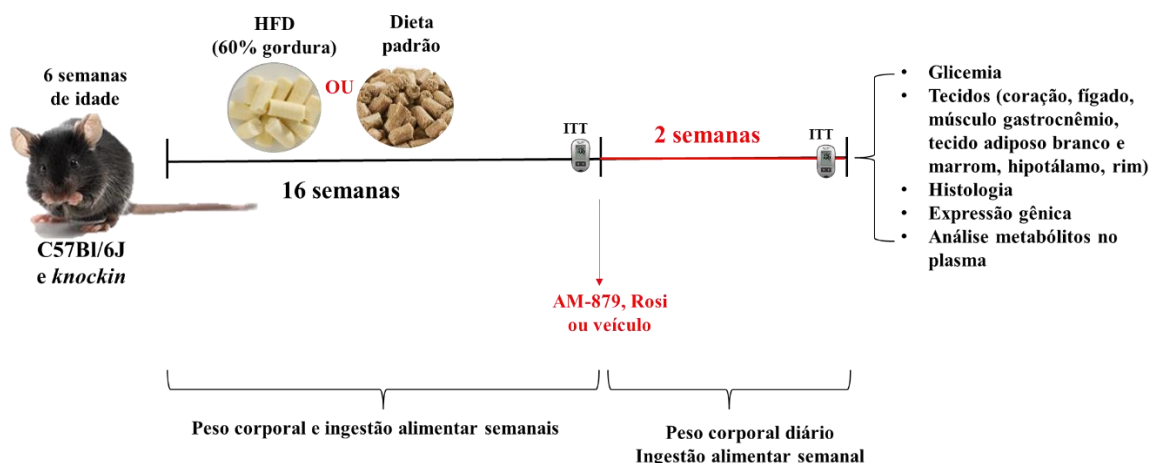


Figura 7. Desenho experimental do estudo, no qual os animais, com 6 semanas de idade, foram subdivididos em um grupo alimentado com dieta normal ou com dieta hiperlipídica, por 16 semanas (com 22 semanas de idade). Nesse ponto, realizamos o teste de sensibilidade à insulina (ITT), pré-tratamento. Na 22ª semana de idade, os camundongos foram divididos de acordo com cada tratamento, sendo eles veículo, AM-879 ou Rosilgitazona), por 2 semanas, sendo repetido o ITT no 13º dia de tratamento e a eutanásia na 24ª semana de idade, onde foram coletados sangue, tecidos como coração, fígado, tecido adiposo branco e marrom e músculo gastrocnêmico).

3.2.2. Tratamento oral voluntário com gelatina

Utilizamos uma metodologia baseada na ingestão voluntária do veículo ou ligante para o tratamento dos animais, de forma menos invasiva e estressante (Figura 8) [59]. Trata-se do uso de uma gelatina composta por uma solução de sucralose 20 % (Linea®, EIC do Brasil Indústria e Comércio Alimentos S/A- Anápolis, GO), gelatina sem sabor comestível e incolor 21 % (Royal®) e essência de chocolate (Arcolor®, Arco Íris Brasil Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda.- São Lourenço, São Paulo-SP).

Como descrito no artigo de Zhang, Lei 2011, para que os camundongos pudessem ingerir a gelatina, foi realizado um treinamento de 4 dias, no qual os animais ficaram em jejum por 16 horas e foi feita a primeira apresentação da gelatina. Nos três dias subsequentes, os animais tinham livre acesso à comida e a gelatina era apresentada, sendo esta ingerida de forma rápida pelos animais ao final do processo. Segundo o artigo, os animais permanecem condicionados à ingestão da gelatina, mesmo sem a apresentação da mesma, por 3 semanas [59], sendo que no nosso caso o início do tratamento foi feito uma semana após o treinamento. Vale ressaltar que foi descrito que, diferentemente da sacarose, a sucralose não estimula a secreção de insulina, nem altera a liberação de hormônios gástricos, permitindo sua utilização em estudos de metabolismo.



Figura 8. Tratamento oral voluntário dos camundongos C56Bl/6J com gelatina, segundo descrito [59].

3.4. Análises fisiológicas, metabólicas e moleculares

3.4.1. Medida de ingestão alimentar e ganho de peso

O ganho de peso foi feito através da pesagem semanal dos animais e a medida de ingestão alimentar foi realizada através da pesagem da ração disponibilizada aos camundongos semanalmente. Além disso, durante o tratamento, os animais foram pesados diariamente e a dieta a cada 2 dias.

3.4.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)

A insulina foi administrada via intraperitoneal na dose de 0,75 UI/kg do animal após um jejum de 12 horas, seguido de uma hora de alimentação e as glicemias analisadas nos tempos de 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 minutos. A taxa de decaimento da glicose (KITT) foi calculada como descrito previamente [60].

3.4.3. Quantificação dos níveis de insulina, adiponectina e corticosterona por ELISA

Os níveis de insulina e adiponectina foram medidos através de kits comerciais pelo método de ELISA, utilizando-se o Ultrasensitive Mouse Insulin and Adiponectin Kits (Crystal Chem®) e metodologia conforme descrita pelo fabricante. Os níveis de corticosterona foram mensurados através do Corticosterone Competitive ELISA Kit (EACORT- Thermo Fisher Scientific®), seguindo instruções do fabricante.

3.4.4. Análise histológica de fígado

No dia da eutanásia dos animais, coletou-se um lóbulo do fígado em cassetes histológicos e estes foram embebidos em solução de paraformaldeído 4 % por 24 horas à 4 °C para fixação dos tecidos. No dia seguinte, as amostras foram lavadas duas vezes de 10 minutos cada em PBS 1X e iniciou-se o processo de desidratação para inclusão dos tecidos em parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo (LEICA RM2255), na espessura de 5µm e foram feitos de forma seriada em 3 lâminas, espaçando em 100 µm cada corte, totalizando 3 lâminas com 3 cortes em cada por tecido. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), montadas e fotografadas no Microscópio Leica FS DM6. Em cada corte foram fotografados 5 campos em regiões distintas no aumento de 20X, sendo analisadas pelo processo de segmentação no software Fiji® (Weka segmentation) e quantificação com o Plugin MorphoLibJ, realizando uma média entre os 5 campos e, posteriormente, uma média por lâmina analisada.

3.4.5. Quantificação dos níveis de triglicérides no fígado

Para a extração dos lipídeos do fígado, utilizamos um protocolo estabelecido em literatura, sendo os tecidos pesados e homogeneizados com um Polytron® (PT1200 E) em uma mistura de clorofórmio:metanol:PBS, na proporção 4:3:0,8 [55, 61]. Os lipídeos estavam presentes na parte orgânica da separação de fases, que consiste no líquido da porção inferior do eppendorf, e foram dosados através do método enzimático em Espectrofotômetro utilizando-se os kits LaborLab Liquid Stable (LaborLab – SP/Brasil).

3.4.6. Análise histológica do tecido adiposo branco

No dia da eutanásia dos animais, coletou-se um pedaço do tecido adiposo branco perigonadal em cassetes histológicos e estes foram embebidos em solução de paraformaldeído 4 % por 24 horas à 4 °C para fixação dos tecidos. No dia seguinte, as amostras foram lavadas

duas vezes de 10 minutos cada em PBS 1X e iniciou-se o processo de desidratação para inclusão dos tecidos em parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo (LEICA RM2255), na espessura de 5 μm e foram feitos de forma seriada em 3 lâminas, espaçando em 100 μm cada corte, totalizando 3 lâminas com 3 cortes em cada por tecido. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), montadas e fotografadas no Microscópio Leica FS DM6. Em cada corte o tecido adiposo foi fotografado na versão panorâmica na magnificação de 10X, com o objetivo de capturar todo o tecido para análise.

Com o auxílio do Dr. Murilo Carvalho, desenvolvemos um comando Macro no software Fiji® para a segmentação das imagens e identificação dos adipócitos (Item 5.4 dos Anexos), as quais posteriormente foram submetidas a uma análise utilizando a ferramenta online Jupyter, onde os adipócitos foram quantificados em diversos parâmetros como área, perímetro e circularidade, sendo divididos de acordo com cada tratamento. Para finalizar a análise, foi desenvolvido um script no software R-Studio para análise dos dados finais e plotagem dos gráficos, além da análise estatística pela metodologia não paramétrica bayesiana ($\log\text{BF}_{10}$) através da biblioteca ‘ggstatsplot’ que utiliza o teste Wilcoxon rank sum (semelhante ao Mann-Whitney). Nesse caso, o script gera um gráfico comparando os grupos desejados através do fator bayesiano $\log\text{BF}_{10}$, sendo que quanto maior esse valor, mais forte é a evidência a favor da hipótese alternativa, ou seja, há diferenças relevantes entre os grupos. $\log\text{BF}_{10}$ entre 3 e 20 revela uma diferença positiva, entre 20 e 100 é forte e acima de 100 é extremamente forte [62, 63].

3.4.8. Expressão gênica: q-RT-PCR

Para o ensaio, o RNA dos tecidos adiposo branco, marrom, fígado e hipotálamo foi extraído utilizando o reagente TRIzol™ (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas utilizando um Polytron® (PT1200 E), sempre em gelo, e incubadas 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram centrifugadas por 10 minutos à 4 °C 12000g e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Adicionamos 200 μL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol™, incubamos 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugamos por 10 minutos à 4 °C por 12000g. Nessa etapa ocorre a separação das 3 fases, sendo DNA, RNA e proteína, estando o RNA presente na fase aquosa e transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 500 μL de álcool isopropílico gelado para cada 1 mL de TRIzol™, sendo invertidos 30X para precipitar o RNA, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos à 4 °C 12000g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com álcool etílico 75 % (1mL para cada 1mL de

TRIzol™, centrifugando 5 minutos à 4 °C em 7500g, descartando o sobrenadante. Os tubos com RNA foram deixados para secar de forma invertida em temperatura ambiente por 5 minutos e adicionou-se 50 µL de água ultrapura para ressuspender, quantificando-os no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

Para produção de cDNA, utilizamos o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, da Applied Biosystems™, utilizando 1 µg de RNA de cada amostra e seguindo instruções do fabricante. Para a técnica de qPCR, foi utilizado o reagente SYBR™ Green Master Mix, seguindo as indicações do fabricante. As concentrações de primers utilizadas foram obtidas após padronização (Tabela 3) em um volume final de reação de 12 µl. As amplificações foram conduzidas no termociclador ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o seguinte protocolo: 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (coleta dos dados).

Analizamos o tecido adiposo branco perigonadal para genes *Nr1d2*, *Txnip*, *Lep*, *Cfd*, *Cd36*, *Gdf3*, *Ppm1a*, *Ucp1*, *Pdk4*, *PPARγ* e *Fabp4*, o hipotálamo para os genes *Npy*, *Crh*, e *Ucp1* também no tecido adiposo marrom. Os genes de referência utilizados foram *Rpl27* e *36b4* (Tabela 3):

Tabela 3. Lista de genes avaliados, com respectivas sequências de primers Forward e Reverse, a referência utilizada no PubMed, concentração otimizada, percentual de eficiência e R².

Gene	Sequência primers (F e R)	Referência	Concentração otimizada	% eficiência	R ²
<i>Rpl27</i> (proteína ribossomal L27)- gene de referência	CTGGCCTTGCGCTTCAA TCATGCCCAAGGTACTCTGT	NM_011289.3	500nM	96,3	0,99
<i>36b4</i> (fosfoproteína ribossomal)- gene de referência	GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA AAGCAGGCTGACTTGGTTGC	NM_007475.5	300nM	99,6	0,99
<i>Txnip</i> (regulado pela fosforilação)	TATGTACGCCCTGAGTTCC GCTCACTGCACGTTGTTGTT	NM_001009935.2	300nM	104,99	0,99
<i>Nr1d2</i> (regulado pela fosforilação)	ATGTCACGAGATGCTGTTCG TGGTCTTCATTGCACTTTGC	NM_011584.4	500nM	104,9	0,99
<i>Lep</i> (Leptina)	GAGACCCCTGTGTGCGTTC CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG	NM_008493.3	500nM	98,3	0,98
<i>Cfd</i> (Adipsina)	AATCTGCGCACGTACCATGA AACCACACCTTCGACTGCAT	NM_001291915.2	500nM	95,4	0,99
<i>Gdf3</i>	AACTTCTGCCACCGTCATCA ATCAGAGCCTGCATGAAAGC	NM_008108.5	300nM	100	0,99
<i>Ppm1a</i>	TGAAATGGAGGACGCACACA CTCACAGCAGTATTTGGCAACC	NM_008910.3	600nM	100	0,99
<i>Npy</i> (Neuropeptídeo Y)	TCGTGTGTTTGGGCATTCTG TGAAATCAGTGTCTCAGGGCTG	NM_023456.3	500nM	97,9	0,99
<i>Ucp1</i>	TGTTTCATTGGGCAGCCTACA ACAAGCTTTCTGTGGTGGCT	NM_009463	300nM	98,5	0,98

<i>Crh</i> (hormônio liberador de corticotropina)	AGATGTACAGGGAGAGAGCCTA TCCTTGGGGGCCACATTTTCT	NM_205769.3	500nM	99,6	0,97
<i>Pdk4</i>	AGCCTATGTGCAAACCCAGA AACATTTACCCAAGCCTCG	NM_013743.2	300nM	97,4	0,99
<i>Fabp4</i>	AAAGAAGTGGGAGTGGGCTT CACGCCAGTTTGAAGGAAA	NM_024406.3	300nM	99,5	0,99
<i>CD36</i>	GCTGTGTTTGGAGGCATTCT TGCCACGTCATCTGGGTTTT	NM_001159555.1	600nM	97,3	0,99
<i>PPARγ</i>	AGGGCGATCTTGACAGGAAA TCGAAACTGGCACCCCTTGAA	NM_001127330.2	500nM	99,2	0,99

3.4.9. Western Blotting

Para verificar o estado de fosforilação do PPAR γ , realizamos a técnica de Western Blotting, separando as proteínas por tamanho através do gel SDS-PAGE, transferindo-as para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Premium Western blotting membranes, nitrocelulose, pore size 0.45 μ m) e identificando-as com anticorpos específicos. As proteínas foram extraídas do tecido adiposo branco dos animais, utilizando um tampão composto por EDTA 0,5 M pH8, Tris 1 M pH7,5, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, triton X-100 10%, PMSF (inibidor de serina protease), Cip 25X (coquetel inibidor de proteínas) e água, incubando-as uma hora em gelo após maceração do tecido com Polytron® (PT1200 E), sendo posteriormente centrifugadas e feita a coleta do sobrenadante. A quantificação das proteínas foi feita utilizando a metodologia colorimétrica Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific™).

Após a corrida em gel SDS 10 %, as amostras foram transferidas para a membrana de celulose pelo método de transferência úmida, por uma hora e bloqueadas com solução de BSA 5 % em TBS-T (1,37 M NaCl, 0,027M KCl e 0,25 M Tris com 0,05 % Tween-20 pH7,4) por uma hora à temperatura ambiente para evitar reações inespecíficas. A incubação com o anticorpo primário, diluído em BSA 2 % com 0,02 % azida de sódio, foi realizada de acordo com cada anticorpo, seguindo instruções do fabricante. Utilizamos os seguintes anticorpos primários: anti-PPAR γ (diluição 1:1000, Anti-PPAR γ Antibody (E-8): sc-7273- Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-fosfoserina PPAR γ (diluição 1:400, BS-4888R, Bioss) e anti-vinculina (diluição 1:1000, ab18058- Abcam). As membranas foram incubadas overnight à 4 °C sob agitação, sendo lavadas no dia seguinte, por 3 vezes, durante 20 minutos com solução de TBS-T.

Em seguida, as membranas foram incubadas por uma hora e meia sob agitação em temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário na diluição 1:5000: anti-rabbit IgG para os primários anti-PPAR γ e anti-vinculina (A0545, Sigma-Aldrich) e anti-mouse IgG

(401253, *Calbiochem*®). Novamente as membranas foram lavadas três vezes durante 20 minutos cada em solução de TBS-T, sendo reveladas através da reação de peroxidase utilizando o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent®-GE.

A quantificação das bandas foi realizada pelo método de densitometria utilizando o software Fiji/ImageJ®.

3.4.10. Análise estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por Multiple Comparison one-way ANOVA com post-test Dunnett ou two-way ANOVA com post-test Sidak ou teste t não paramétrico (Mann-Whitney), sendo $P < 0.05$ tomado como critério de significância mínimo, sendo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

4. RESULTADOS

4.1. Estabelecimento da linhagem S273A

4.1.1. Análise do gene PPAR γ para desenho da estratégia de produção do *knockin*

Para a proposição deste projeto, fizemos uma extensa análise do gene que expressa o PPAR γ . A Ser273 mutada durante este projeto localiza-se ao final do éxon 5 do gene *Nr1c3* (PPAR γ), de acordo com análises realizadas em banco de dados de genoma (Gene Bank e Pubmed Gene). Nesta análise verificamos íntrons e éxons, localização cromossomal, variantes de splicing alternativo entre outras características. Foi também identificada na sequência do cDNA (NCBI CCDS), a posição e sequência correta do códon que receberá a mutação.

Em seguida, utilizando da ferramenta online MIT CRISPR Design Tool, uma sequência alvo de 20 bases que compõe o RNA guia foi escolhida através da busca de um fragmento de 123 pb do gene que continha a região a ser mutada (sgRNA, <http://crispr.mit.edu/>). Dentre as 22 possíveis sequências alvo, foi escolhida uma sequência gerada pelo software que apresentasse alto score, devido à menor quantidade de possíveis *off-targets* no genoma murino que pudessem ocasionar pareamento incorreto (sequência escolhida Guide #1: AAGGCGAGGGCGATCTTGACAGG, com qualidade de score 91, que apresentou 48 *off-targets*, sendo que apenas 4 ocorreriam dentro de genes).

Após a determinação de sequência do RNA guia, identificamos a sequência NGG necessária para a atividade da enzima Cas9, iniciamos as análises de sequência para definição dos braços de homologia, desenho do oligo doador contendo a mutação S273A (TCA > GCA), e inserção de um sítio da enzima de restrição ScaI (AGTTCT > AGTACT) no íntron 5. Esta inserção

ocorreu, pois a região de análise do éxon não apresentava uma sequência capaz de ser modificada para um sítio enzimático sem gerar mutação na sequência de aminoácidos do PPAR. Além disso, inserimos três mutações silenciosas na sequência alvo para evitar a clivagem do oligo doador pelo sistema CRISPR/Cas9 (Figura 9).

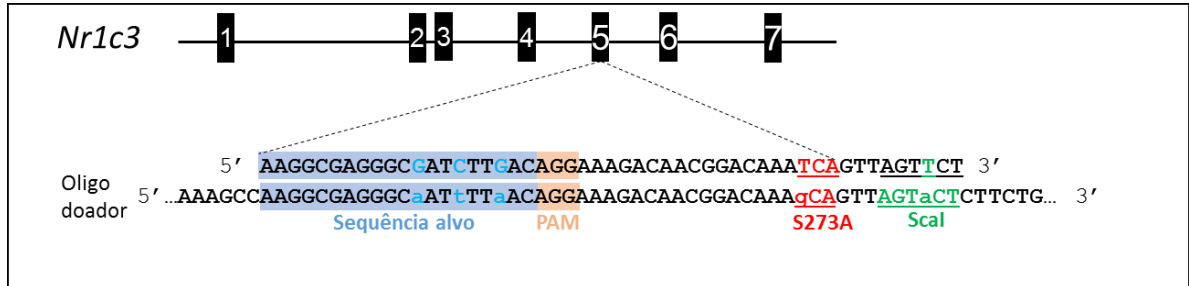


Figura 9. Desenho do sgRNA, oligo doador e mutações específicas: em azul, mutações silenciosas na sequência alvo do oligo doador para evitar sua clivagem pela Cas9; em laranja, a sequência PAM (NGG) reconhecida pela Cas9; em vermelho, a mutação na Ser273 para Alanina e, em verde, mutação para inserção de sítio da enzima de restrição *ScaI*.

O sgRNA foi clonado em vetor px330 e as colônias positivas foram utilizadas para extração do DNA plasmidial, o qual foi utilizado como molde para transcrição *in vitro* sgRNA PPAR γ S273A. O mesmo procedimento foi realizado para transcrição *in vitro* do mRNA Cas9. Obtivemos 619 ng/ μ L de mRNA Cas9 e 726,4 ng/ μ L de sgRNA PPAR γ S273A, os quais foram utilizados para a microinjeção descrita na metodologia.

4.1.2. Obtenção dos Fundadores

Obtivemos diversas ninhadas no decorrer de 2018 e 2019, sendo feita a extração do DNA genômico a partir da cauda dos animais e ensaios para averiguar a presença ou ausência da mutação desejada. Com o ensaio da T7 endonuclease, é possível saber se há pareamento incorreto de bases, o que pode ser um indício de que algum tipo de mutação ocorreu naquele gene, indicado por mais de uma banda presente no gel, exemplificado pelos machos 1 e 3 do gel abaixo (Figura 10).

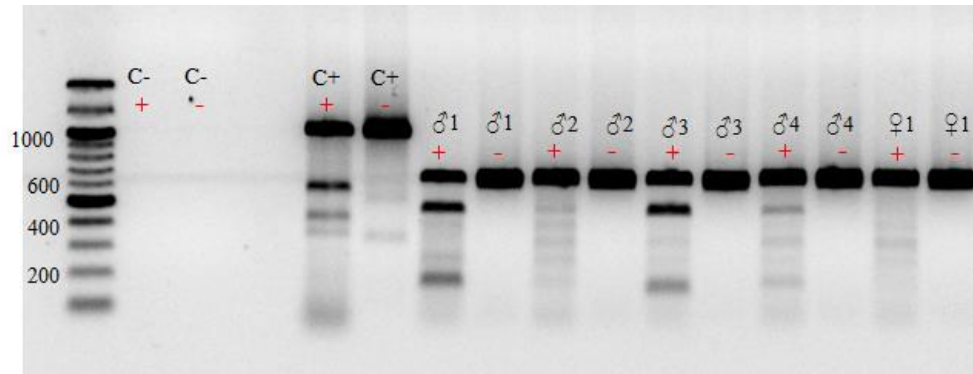


Figura 10. Gel de agarose 1% do ensaio T7 endonuclease I da primeira ninhada de camundongos após injeção. C- indica o controle negativo da reação, no qual a enzima não deve clivar, e C+ o controle positivo, o qual deve ser clivado pela T7. Sinais positivos indicam reação com a enzima, e negativos sem a enzima.

Adicionalmente, foi realizado o ensaio com a enzima de restrição ScaI, no qual a presença de mais de uma banda no gel indica a inserção do sítio da enzima e, possivelmente, inserção da mutação desejada. Por fim, para a confirmação exata de que obtivemos a mutação, as amostras foram sequenciadas e comparadas à sequência selvagem da região de interesse do PPAR γ . Dentre todos os animais oriundos das microinjeções, conseguimos um macho com a mutação em heterozigose, que é possível de distinguir devido à sobreposição de picos no eletroferograma (Figura 11), no qual podemos observar a sobreposição da base timina -T (vermelho) com guanina -G (preto), correspondente à mutação de interesse (S273A).

Ainda no eletroferograma, conseguimos garantir que a recombinação homóloga ocorreu de forma completa devido à presença das mutações silenciosas no sgRNA, em destaque em preto, as quais estavam presentes no oligo doador desenhado. Diante disso, montamos um casal com esse macho, denominado Fundador, e fêmea selvagem, com o objetivo de obter mais animais heterozigotos, na geração F1, para prosseguir com a geração da linhagem em homozigose.

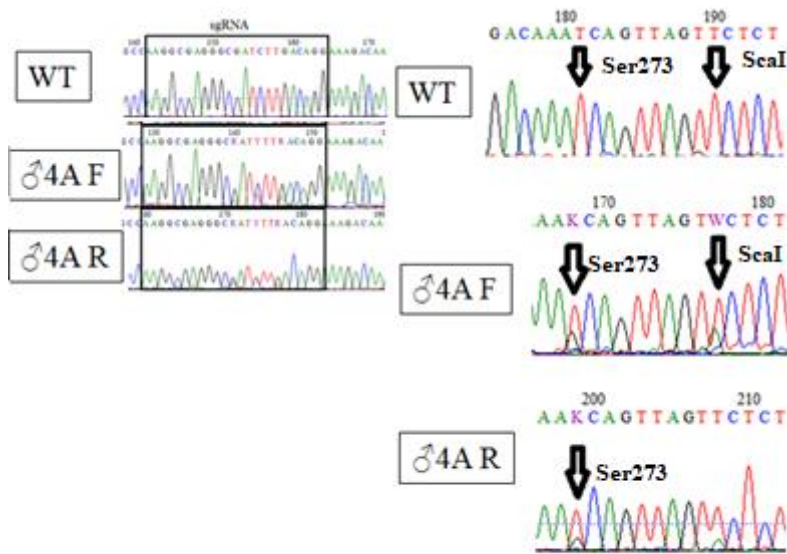


Figura 11. Eletroferograma da sequência genotipada, sendo o primeiro de um camundongo C57Bl/6J selvagem (WT) para comparação da sequência e do macho com a mutação em heterozigose (4A), nas fitas Forward (F) e Reverse (R), sendo em destaque de preto o sgRNA e nas setas as mutações na Ser273 e sítio da enzima de restrição ScaI, respectivamente.

4.1.3. Geração F1- obtenção de heterozigotos

Do casal formado, obtivemos 9 camundongos, 6 fêmeas e 3 machos, sendo que desses, 4 animais com a mutação em heterozigose foram encontrados. As mutações foram confirmadas pelo sequenciamento e ensaio de digestão com a enzima de restrição (Figura 12). Através da eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão observamos a mutação presente no Fundador (macho 4A) e também na geração F1 (fêmeas 2 e 3, machos 2 e 3). A partir desses animais, foram montados dois casais, um com a fêmea 2 e macho 2, e outro com a fêmea 3 e macho 3, com objetivo de obter os camundongos com a mutação em homozigose.

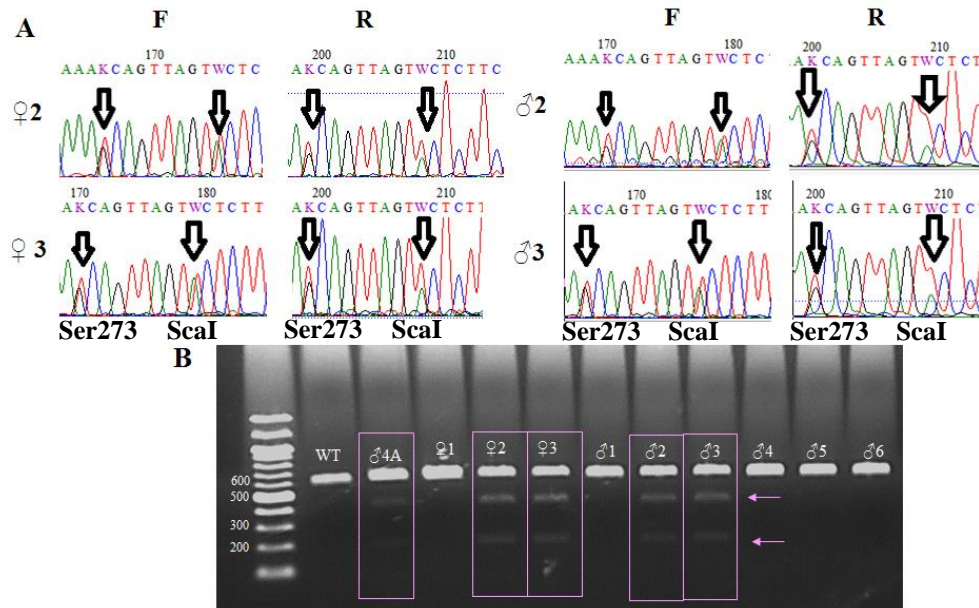


Figura 12. (A) Eletroferograma dos camundongos mutados, das fitas Forward e Reverse, das duas fêmeas e dos dois machos. (B) Ensaio da enzima de restrição ScaI, com destaque para o Fundador macho 4A e os camundongos da geração F1 com a mutação, sendo as setas em rosa as clivagens pela enzima, nos tamanhos de ~400 e 200 pares de base.

4.1.4. Geração F2- obtenção de homozigotos

A partir desse ponto, o objetivo foi o cruzamento dos camundongos heterozigotos para gerar os homozigotos (geração F2). Além disso, utilizamos os camundongos selvagens obtidos desses cruzamentos para a montagem de casais do grupo selvagem.

Obtivemos dois casais de heterozigotos (Casal 2 e 3), sendo que a primeira ninhada de cada um deles foi de 9 e 7 animais, respectivamente. Do casal 2, com 9 camundongos obtivemos 5 fêmeas, duas com a mutação em homozigose, duas em heterozigose, e uma selvagem; e 4 machos, dois homozigotos e dois heterozigotos.

Na Figura 13A, é possível ver a diferença dos eletroferogramas, sendo que no homozigoto encontramos somente um pico na região da Ser273, correspondente à G, mudando a Serina por Alanina (GCA); o heterozigoto com 2 picos sobrepostos (G/T), e o selvagem com um pico correspondente à T (TCA). Já na Figura 13B, o ensaio com a enzima de restrição mostra 3 bandas nos heterozigotos, duas bandas no homozigoto e somente uma banda no selvagem, que era o esperado.

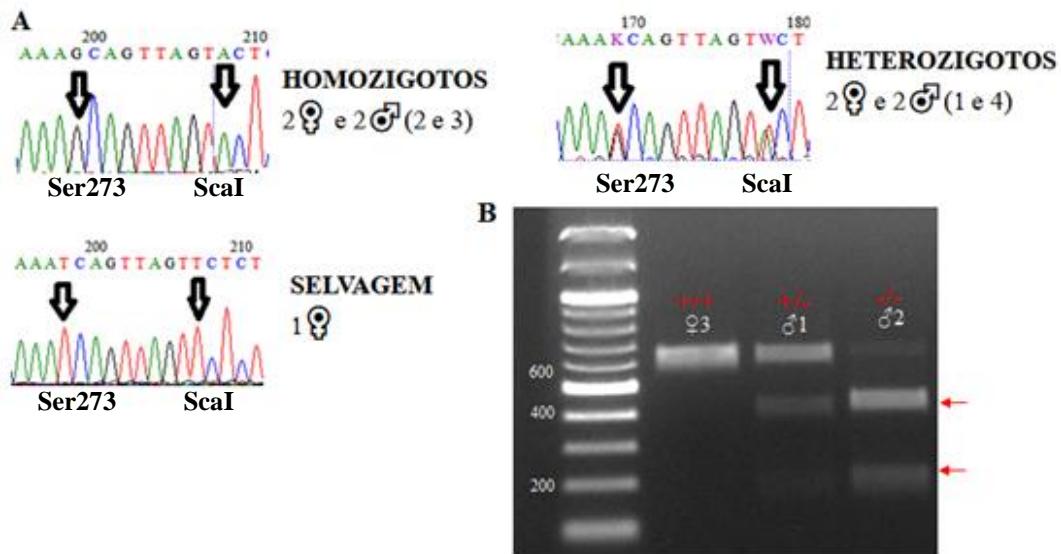


Figura 13. (A) Eletroferograma demonstrativo de animais com a mutação em homozigose, heterozigose e selvagem, com as setas pretas indicando a região da Ser273 e o sítio da enzima de restrição, respectivamente. (B) Ensaio com a enzima de restrição ScaI mostrando 3 bandas no camundongo heterozigoto, duas bandas no homozigoto e uma banda no selvagem, com as setas vermelhas indicando as bandas de 400 e 200 pb resultantes da clivagem.

4.1.5. Expansão da linhagem S273A

Para expansão da linhagem, montamos 5 casais homozigotos, denominados PPAR γ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5, dos quais as caudas foram coletadas com 3 semanas de idade para confirmar a presença da mutação na Ser273. A Figura 14 demonstra a árvore genealógica do fundador 4A, mostrando os heterozigotos na geração F1 e somente os homozigotos na geração F2, casais a partir dos quais obteremos os animais a serem utilizados no projeto.

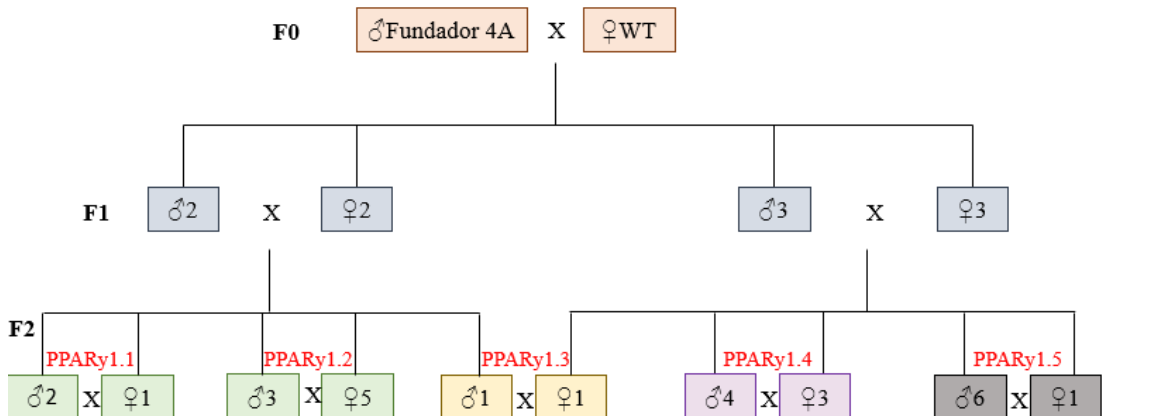


Figura 14. Árvore genealógica do fundador 4A, mostrando os heterozigotos na geração F1 e somente os homozigotos na geração F2.

4.1.6. Análise off-targets

Em ambos os genes, para todos os animais, não observamos mutações nas regiões sequenciadas, principalmente próximo às regiões demarcadas, onde ocorreria o pareamento incorreto do RNA-guia e possíveis alterações nas sequências (Figura 15 e Figura 16).

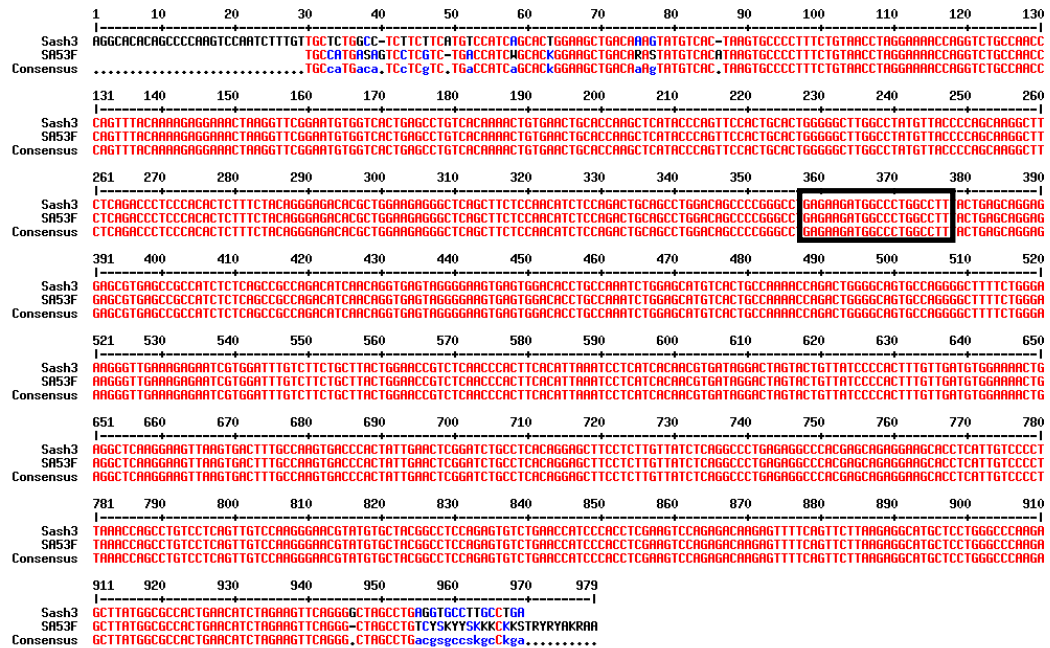


Figura 15. Sequenciamento demonstrativo para o gene *Sash3*, em destaque para a região de pareamento com o RNA-guia, para análise de possíveis mutações.

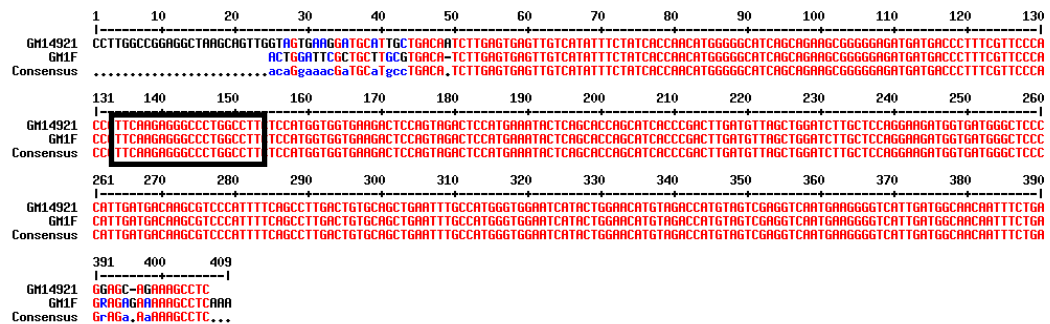


Figura 16. Sequenciamento demonstrativo para o gene *Gml14921*, em destaque para a região de pareamento com o RNA-guia, para análise de possíveis mutações.

4.1.7. Caracterização do modelo knockin

4.1.7-1. Caracterização fenotípica

Os animais foram observados desde o nascimento, apresentando um desenvolvimento aparente normal, quando comparado aos animais wild-type (WT), além de comportamento

aparente normal também. No desmame, observamos que os animais da linhagem *knockin* tem maior peso corporal e são hiperglicêmicos, com hipoinsulinemia, quando comparado aos animais WT (Figura 17).

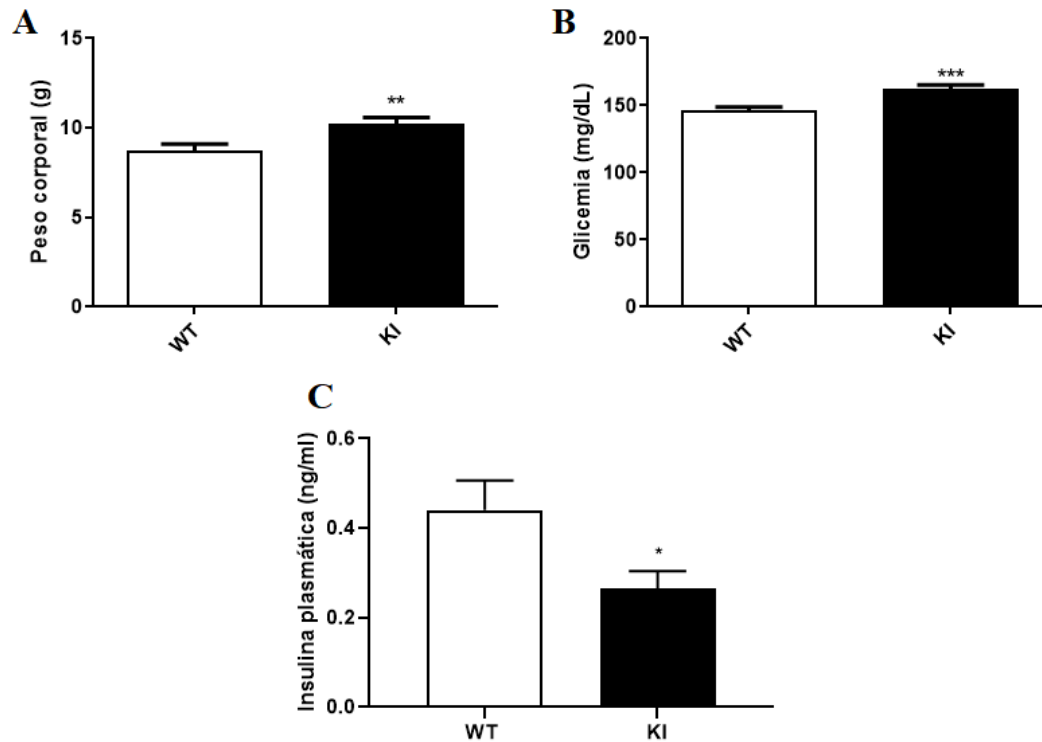


Figura 17. Caracterização animais WT e KI (oriundos da metodologia CRISPR/Cas9) no desmame, com 3 semanas de idade, com (A) peso corporal, (B) glicemia e (C) insulina plasmática; $n \geq 15$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

Como demonstrado na análise expressão gênica, os animais C57Bl/6J são similares aos WT provenientes do CRISPR/Cas9, motivo pelo qual a linhagem C57 foi utilizada como controle nos nossos experimentos. Esses animais foram então alimentados durante 16 semanas, a partir da 6ª semana de idade, com dieta hiperlipídica 60 % e tratados durante duas semanas com a gelatina veículo, como descrito na metodologia. No período de 16 semanas de dieta hiperlipídica, observamos que os animais KI ganham menos peso do que os C57Bl/6J, consumindo a mesma quantidade de dieta (Figura 18A-C), porém após as 2 semanas de tratamento com gelatina veículo, não observamos alterações no ganho de peso e no consumo de dieta, que se mantiveram semelhantes ao grupo controle (Figura 18D e E).

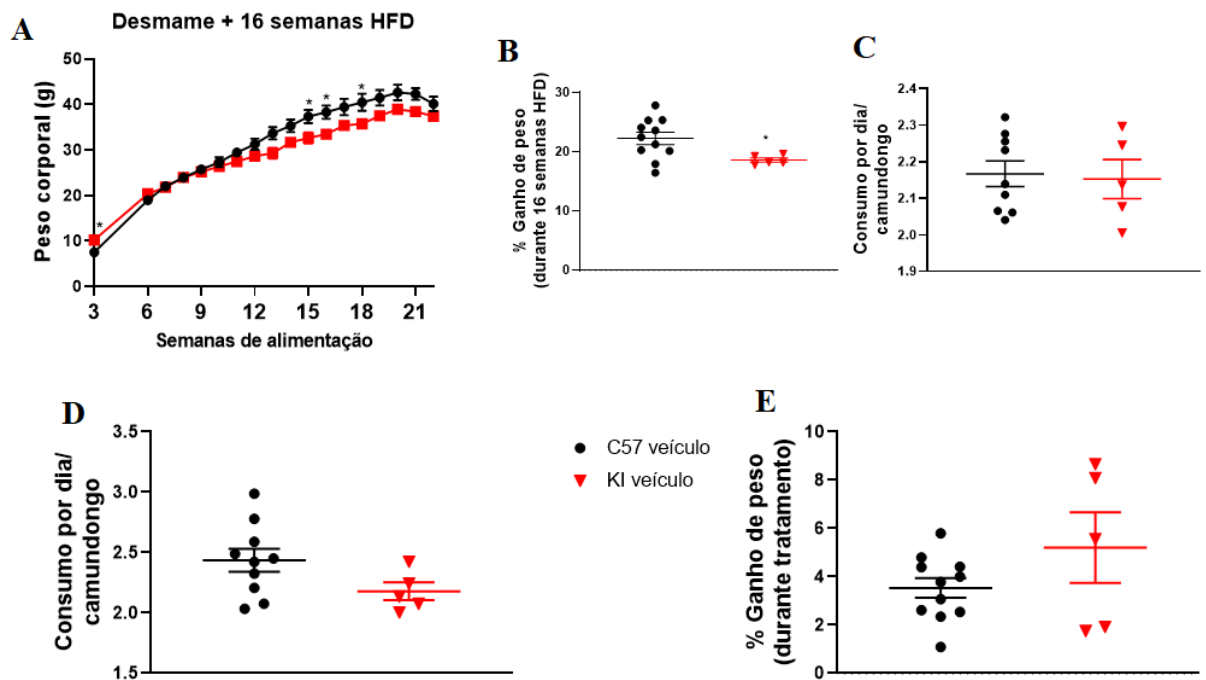


Figura 18. (A) Peso corporal absoluto dos animais a partir no desmame, a partir da 6ª semana de idade e semanalmente após 16 semanas de dieta hiperlipídica. (B) Percentual de ganho de peso e (C) consumo durante as 16 semanas de dieta hiperlipídica nos animais C57Bl/6J e KI. (D) Percentual de ganho de peso e (E) consumo de dieta por dia por camundongo durante as duas semanas de tratamento nos grupos C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney).

Com relação à sensibilidade à insulina, apesar de não observarmos diferença no gráfico do ITT, houve um aumento na taxa de decaimento da glicose (KITT), assim como uma redução dos níveis plasmáticos de insulina e aumento nos níveis de adiponectina na linhagem KI, indicativos de melhora da sensibilidade à insulina nesses animais, como esperado devido à ausência da fosforilação na Ser273 (Figura 19).

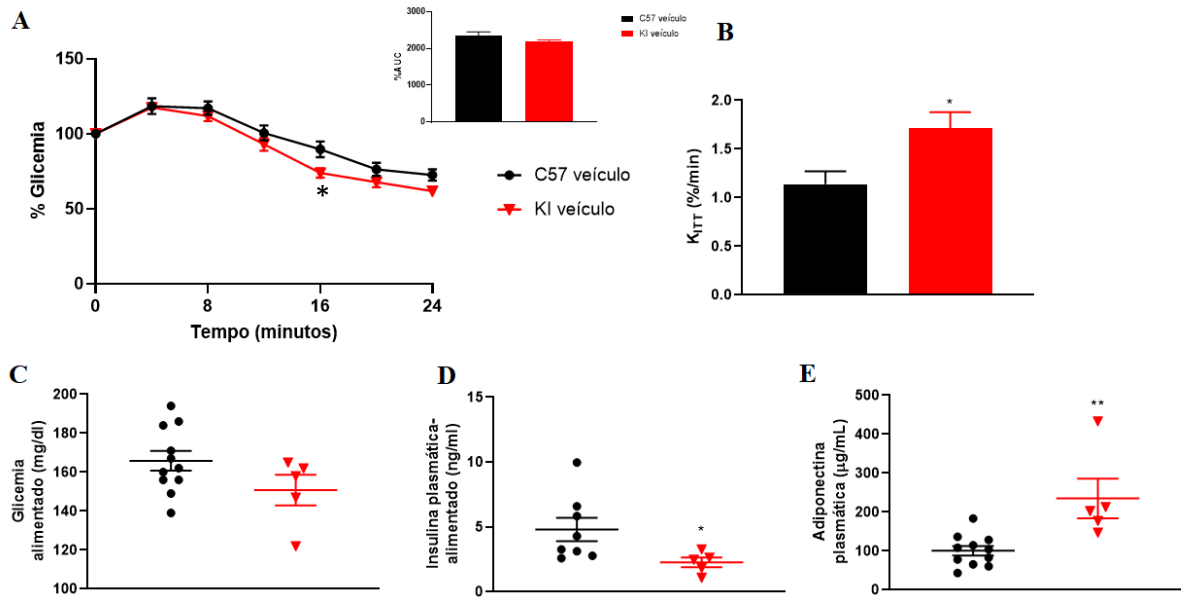


Figura 19. (A) Teste de resistência à insulina nos grupos C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e tratados com gelatina veículo por mais duas semanas, com respectiva área abaixo da curva dos gráficos de % ITT. (B) Taxa de decaimento da glicose (KITT). (C) Glicemia, (D) níveis plasmáticos de insulina e (E) adiponectina no estado alimentado; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

Na linhagem KI, observamos um aumento no peso do tecido adiposo branco, assim como uma redução no fígado e no tecido adiposo marrom, com relação ao controle. Não houve alteração no peso do rim, coração e músculo gastrocnêmico (Figura 20).

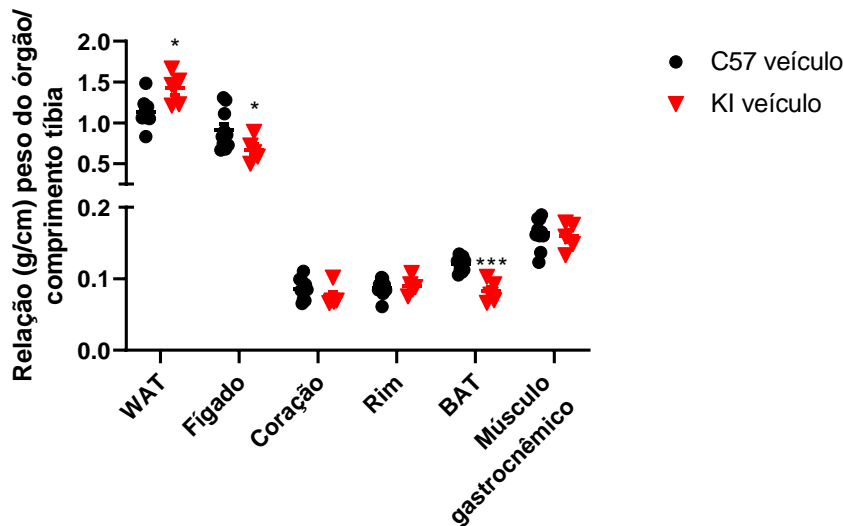


Figura 20. Peso do fígado, tecido adiposo branco (WAT), rim, coração, músculo gastrocnêmico e tecido adiposo marrom (BAT) em relação ao comprimento da tíbia de cada animal C57Bl/6J ou KI após 16 semanas de dieta hiperlipídica e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$; $***p < 0,001$.

Analisamos o fígado com maiores detalhes em virtude da redução observada no peso desse órgão, e, apesar de observarmos um aumento na esteatose nos animais KI, há uma redução dos triglicérides hepáticos nesse mesmo grupo (Figura 21), indicando alterações nas vias lipídicas desse órgão

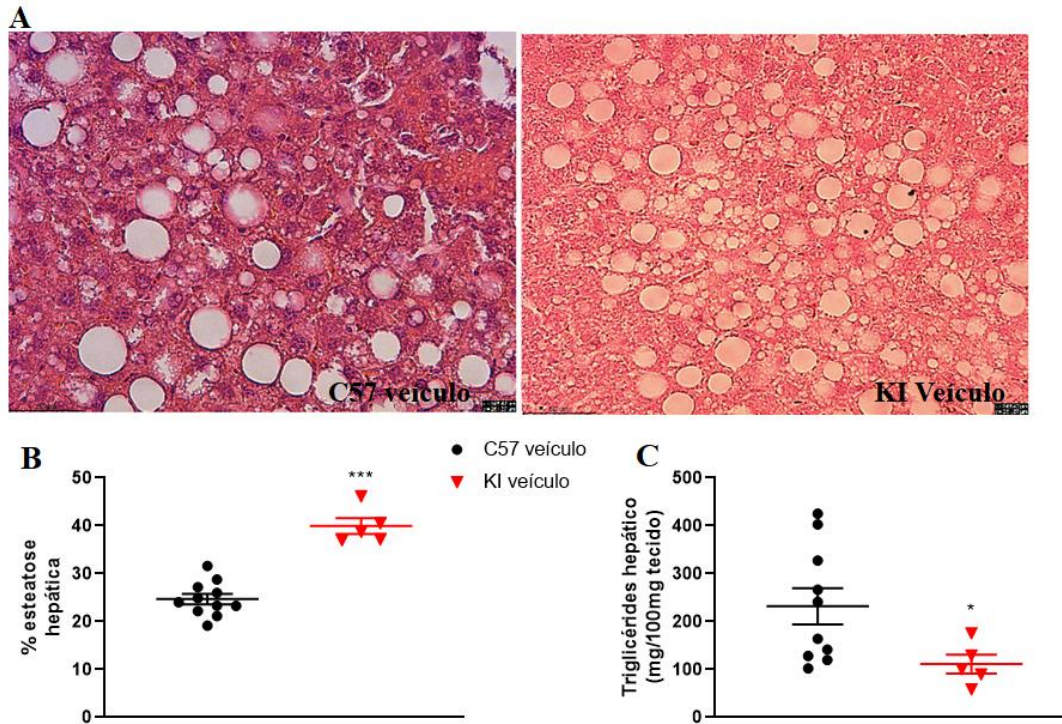


Figura 21. (A) Histologia hepática e (B) respectivo gráfico de percentual de acúmulo de lipídeos (esteatose), (C) níveis hepáticos de triglicérides dos animais C57Bl/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

4.1.7-2. Análise de expressão gênica

Um primeiro dado interessante que obtivemos foi com relação à expressão gênica do PPAR γ , a qual se mostrou quase inexistente na linhagem *knockin*, tanto com dieta normal, quanto HFD, em ambos os tecidos analisados (WAT e fígado). Além disso, nos animais C57Bl/6J, a dieta hiperlipídica promoveu uma redução significativa na expressão desse receptor nuclear (Figura 22), sugerindo que o cenário de obesidade *in vivo* promove alterações na via do PPAR γ .

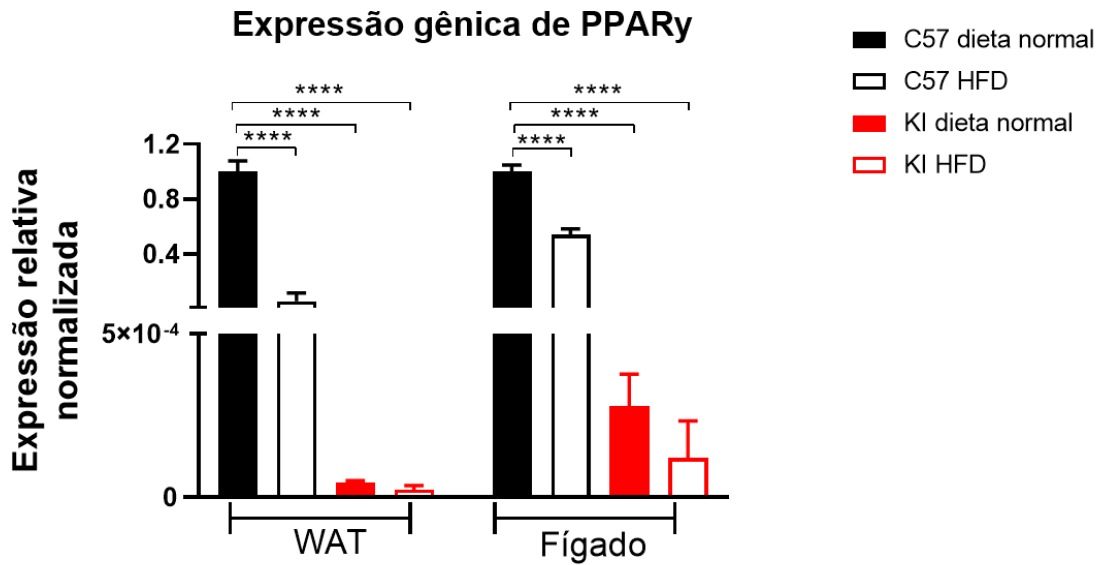


Figura 22. Expressão gênica de PPAR γ em tecido adiposo branco (WAT) e fígado comparando animais C57Bl/6J e linhagem *knockin* alimentados com dieta normal ou hiperlipídica (HFD) por 16 semanas. Análise estatística Multiple Comparisons One-way ANOVA, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; $n \geq 5$ por grupo.

Além disso, verificamos a similaridade dos animais C57Bl/6J com os animais selvagens (WT) obtidos via CRISPR, uma vez que os experimentos com dieta hiperlipídica, descritos a seguir foram realizados em camundongos C57 como controle.

Observamos, no tecido adiposo branco, que nossos alvos principais de expressão gênica, tanto genes regulados pela fosforilação (*Nr1d2*, *Txnip* e *Gdf3*), quanto genes regulados pela ativação de PPAR γ (*Adipsin*, *Ucp1* e *Fabp4*), não foram alterados em termos de expressão na comparação entre os camundongos C57 e WT, ambos alimentados com dieta padrão (normal) (Figura 23).

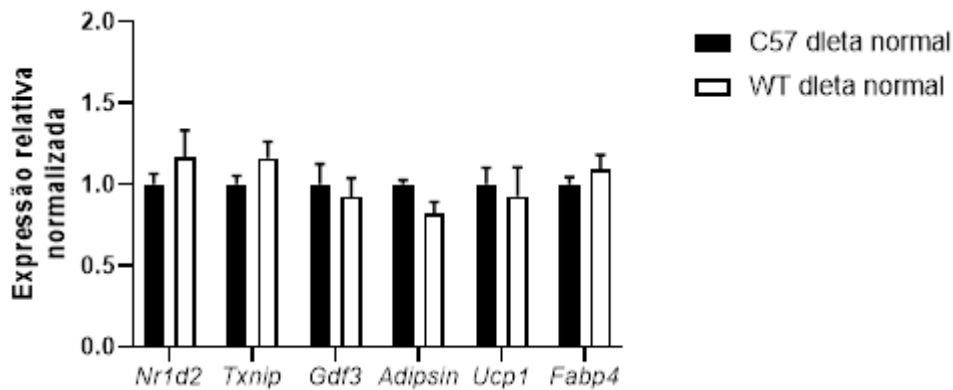


Figura 23. Expressão relativa normalizada de diferentes genes no tecido adiposo branco (WAT) de animais C57BI/6J e WT provenientes de CRISPR/Cas9, alimentados com dieta normal por 16 semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney).

Além disso, comparamos a expressão dos genes regulados pela fosforilação nos animais C57 e KI alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 24), observando um aumento na expressão de *Gdf3* em contraste a uma redução de *Nr1d2* e *Ppm1a*. Esses resultados sugerem, como esperado, uma alteração no padrão de fosforilação nos animais *knockin* alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que nesses animais há um bloqueio da ocorrência da fosforilação, que seria induzida pela dieta.

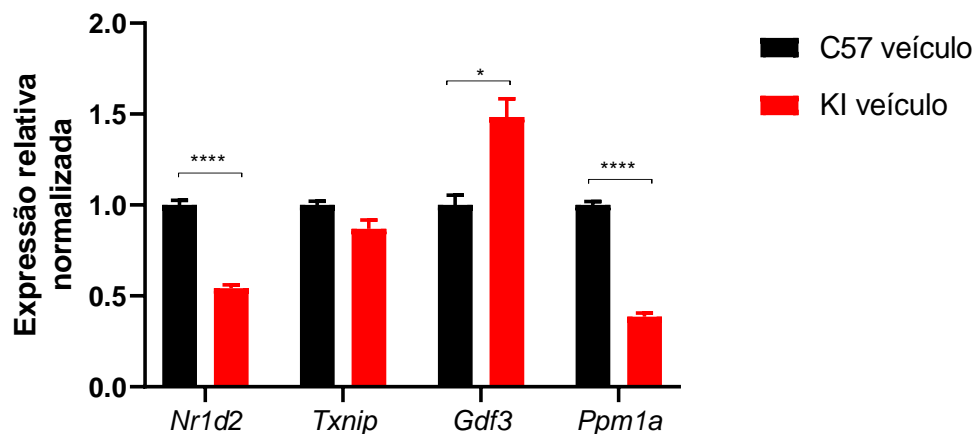


Figura 24. Expressão de diferentes genes regulados pela fosforilação no tecido adiposo branco comparando animais C57BI/6J e KI alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; $n \geq 5$ por grupo.

Com relação aos genes relacionados à via do PPAR γ e metabolismo de lipídeos avaliados no tecido adiposo branco e marrom, observamos que a linhagem KI possui menor expressão de *Pdk4*, *Fabp4* e *Cd36*, em contraste com um aumento na expressão de *Ucp1* em ambos os

tecidos, indicando que o bloqueio da fosforilação afeta vias desse receptor nuclear, como vias relacionadas à termogênese e metabolismo de lipídeos (Figura 25).

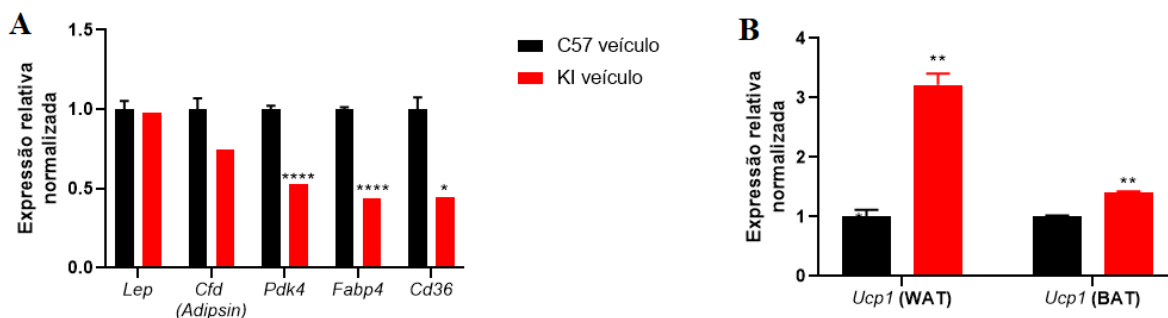


Figura 25. Expressão gênica nos animais C57Bl/6J e KI após 16 semanas de dieta hiperlipídica e mais duas semanas de tratamento com gelatina veículo. (A) Expressão relativa normalizada de genes-alvo do PPAR γ : *Lep* (leptina), *Cfd* (adipsina), *Pdk4* (quinase piruvato desidrogenase 4) e *Fabp4* (proteína ligadora de ácidos graxos). (B) Expressão relativa normalizada de *Ucp1* (proteína desacopladora) no tecido adiposo branco (WAT) e marrom (BAT); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann Whitney), com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.1.7-3. Análise de expressão proteica

Na avaliação da expressão de proteínas por western blotting, observamos um aumento na fosforilação da Ser273 nos animais alimentados com dieta hiperlipídica quando comparados à dieta normal, resultado já esperado de acordo com a literatura [22]. Além disso, uma taxa dessa fosforilação semelhante entre os animais C57 e *knockin* em dieta normal foi observada, dado que a fosforilação é causada em condição de obesidade. Houve também uma redução dessa fosforilação nos animais KI HFD quando comparado aos C57 HFD (Figura 26B), indicando a não ocorrência da fosforilação na linhagem *knockin*.

Com relação à expressão PPAR γ , observamos uma redução significativa nos animais C57 HFD e KI dieta normal quando comparado aos grupos C57 dieta normal e KI HFD (Figura 26C), sugerindo que a dieta hiperlipídica, assim como a linhagem *knockin* em condições normais, interferem de alguma forma na expressão proteica desse receptor. Além disso, a expressão proteica de PPAR γ não é condizente com a expressão gênica desse receptor, indicando a ocorrência de modificações epigenéticas ou pós-traducionais a serem elucidadas.

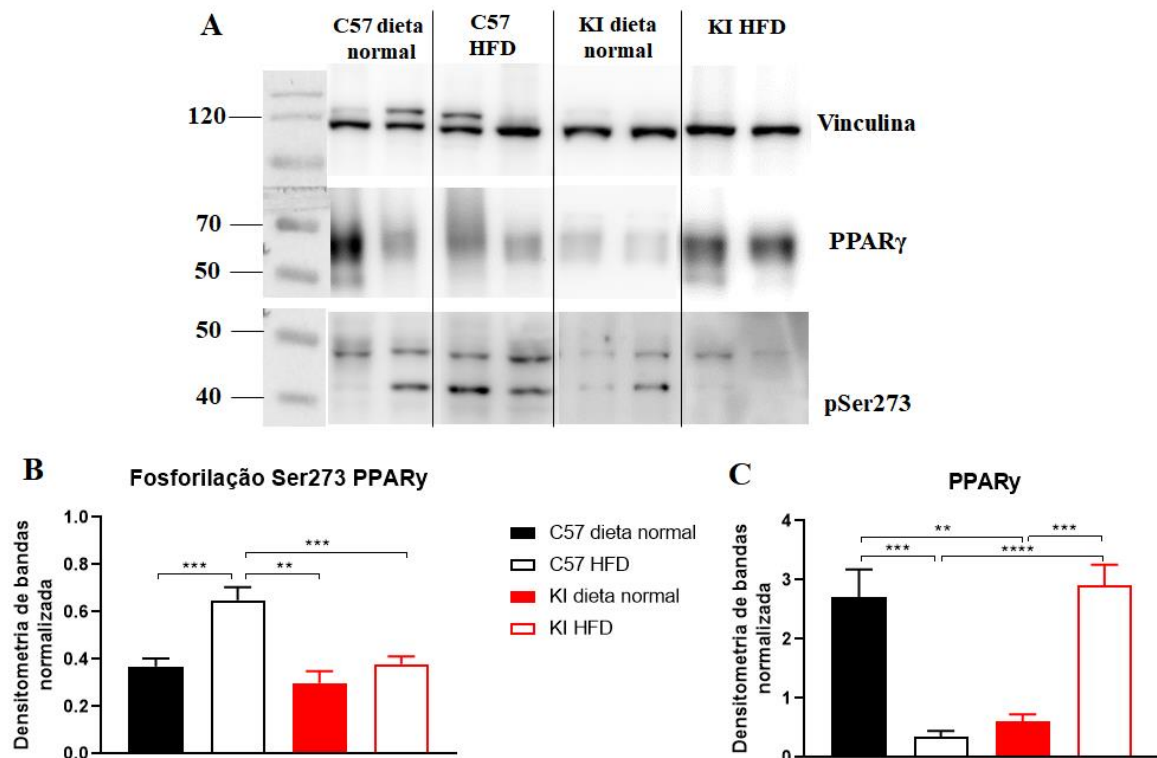


Figura 26. Western Blotting do tecido adiposo branco (WAT) de animais C57Bl/6J e KI alimentados com dieta normal ou hiperlipídica por 16 semanas. (A) Figura representativa da expressão proteica de PPAR γ e Ser273 fosforilada, com duplicatas por grupo, utilizando a Vinculina como controle interno. Densitometria das bandas de Ser273 fosforilada normalizada pela vinculina comparando os grupos (B) C57Bl/6J alimentados com dieta normal e HFD, KI alimentados com dieta normal e HFD. (C) Densitometria das bandas de PPAR γ normalizada pela vinculina comparando os 4 grupos; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Nessas análises, a normalização foi realizada somente pela expressão de vinculina, pois com a diferença observada na expressão do PPAR γ , o resultado com a normalização pelo receptor seria divergente ao esperado para esses animais, principalmente no grupo KI alimentado com dieta normal, que possui baixa fosforilação e baixa expressão de PPAR γ (Figura 27).

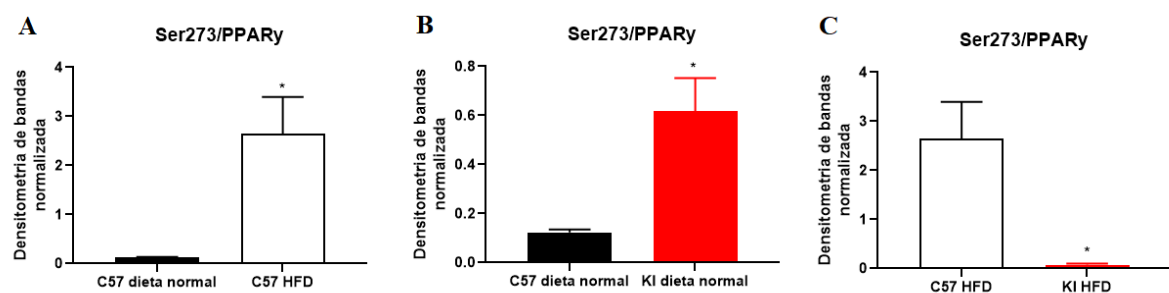


Figura 27. Densitometria normalizada das bandas de Ser273 por vinculina e PPAR γ , nos grupos (A) C57 dieta normal e HFD, (B) C57 e KI dieta normal e (C) C57 e KI HFD; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por teste t não paramétrico (Mann-Whitney), com * $p < 0,05$.

4.2. Efeitos de diferentes doses do ligante AM-879 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

4.2.1- Análises fisiológicas

Durante o tratamento, os animais foram pesados diariamente e a dieta a cada dois dias. Ao final do tratamento, observamos que somente a Rosiglitazona promoveu ganho de peso quando comparado ao veículo, efeito já esperado desse ligante (Figura 28A). Com relação ao consumo de dieta, o tratamento com AM-879 na maior dose, de 100 mg/kg/dia, promoveu uma redução significativa no consumo alimentar, sugerindo uma possível atuação na via do CRH e leptina (Figura 28B).

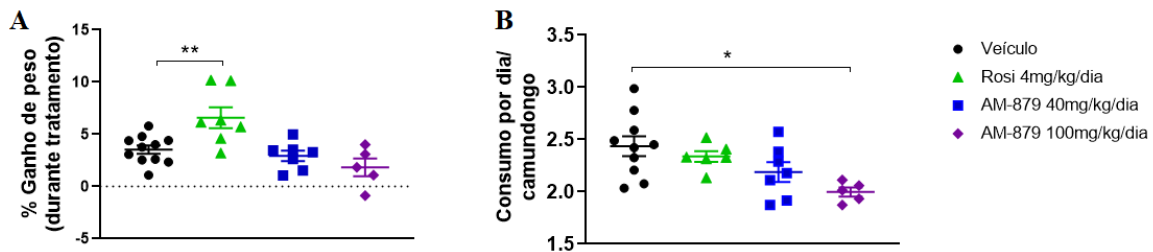


Figura 28. (A) Percentual de ganho de peso e (B) consumo de dieta por dia por camundongo durante as duas semanas de tratamento nos diferentes grupos alimentados com dieta hiperlipídica e respectivos tratamentos por duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$.

Com relação ao peso dos órgãos no dia da eutanásia, padronizados pelo comprimento da tíbia, observamos uma redução no peso do fígado com ambas as doses do ligante AM-879 (Figura 29A), o qual se assemelha ao observado na linhagem KI. Além disso, a Rosiglitazona aumentou o peso do tecido adiposo marrom (BAT), enquanto que nos demais grupos houve redução desse órgão, assim como nos animais *knockin*. Não observamos diferenças com relação ao peso do coração, rim e músculo gastrocnêmico (Figura 29B e C). Esses resultados sugerem que pode existir uma atuação no AM-879 na termogênese devido à alteração no BAT, assim como em vias hepáticas de sensibilidade à insulina e esteatose por conta da redução no peso do fígado. Porém, este tratamento não interfere em vias de toxicidade renal, alterações cardíacas e musculares.

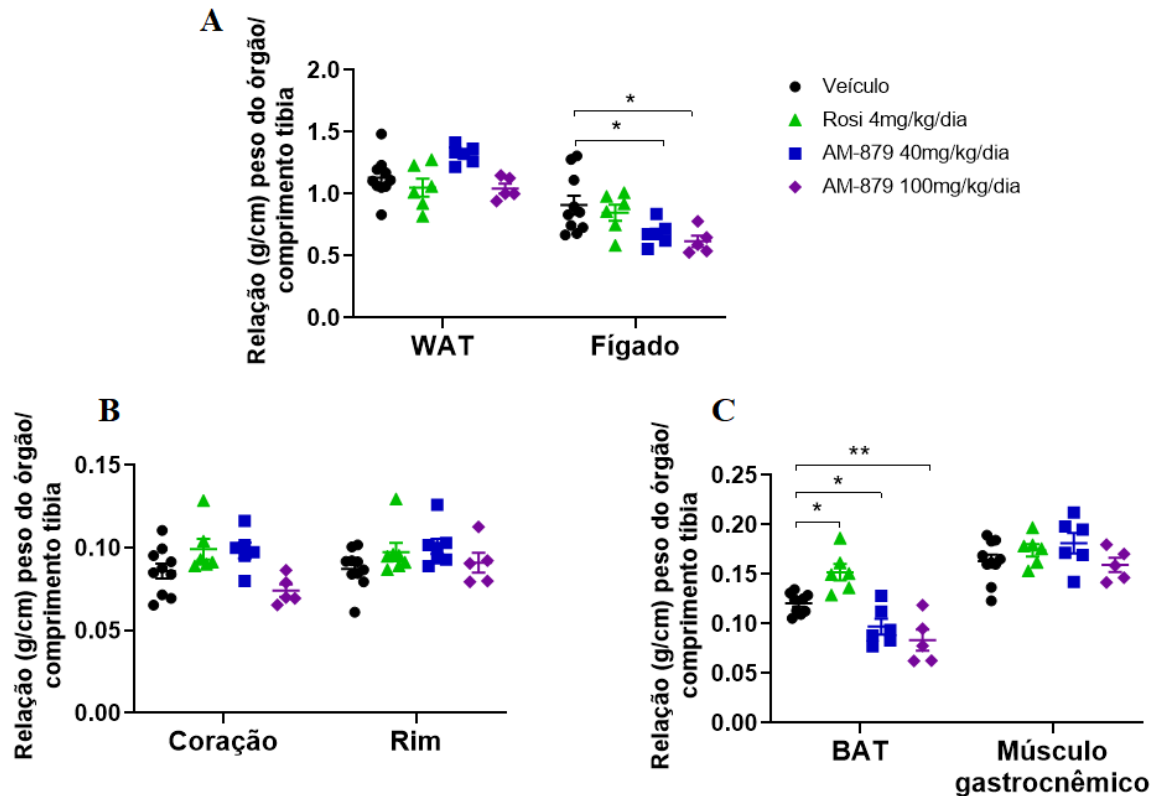


Figura 29. Peso do (A) fígado e tecido adiposo branco (WAT), (B) rim e coração e (C) músculo gastrocnêmico e tecido adiposo marrom (BAT) em relação ao comprimento da tibia de cada animal após 16 semanas de dieta hiperlipídica e respectivo tratamento por duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

4.2.2- Sensibilidade à insulina e hormônios séricos

No teste de resistência à insulina (ITT), observamos que o tratamento com o ligante AM-879 na dose de 40 mg/kg/dia se assemelha aos camundongos *knockin*, apresentados anteriormente, com uma tendência de melhora na sensibilidade à insulina e curva intermediária à Rosiglitazona e ao veículo, sem alteração na área abaixo da curva (AUC). Ainda, como já esperado, a Rosiglitazona promove uma melhora da sensibilidade, com uma redução na curva do ITT e da respectiva AUC, assim como o AM-879 na dose de 100 mg/kg/dia (Figura 30A), indicando também sensibilização à insulina.

Com relação à taxa de decaimento da glicose (KITT), observamos aumento nos grupos tratados com Rosiglitazona e AM-879 100 mg/kg/dia, evidenciando a melhora na sensibilidade à insulina. Houve também uma tendência de melhora na sensibilidade no grupo tratado com AM-879 na dose de 40 mg/kg/dia (com aumento de 53,4 % no KITT), porém sem ser significativo devido à variação nos animais dentro do grupo (Figura 30B).

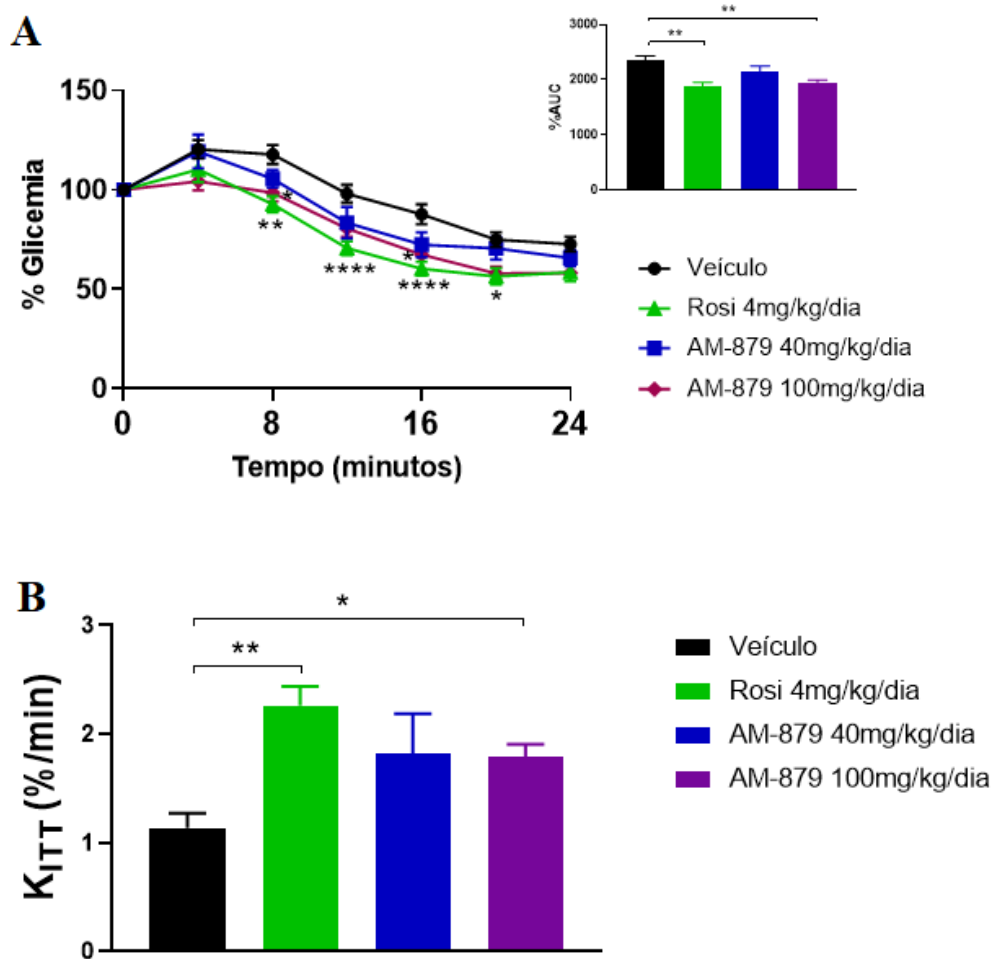


Figura 30. (A) Teste de sensibilidade à insulina nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e respectivos tratamentos por 2 semanas, com respectiva área abaixo da curva dos gráficos de %ITT. (B) Taxa de decaimento da glicose (KITT); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA e two-way ANOVA no caso do %ITT, com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

Não observamos diferenças na glicemia no estado alimentado com nenhum dos tratamentos (Figura 31A), enquanto que na insulina circulante, observamos uma redução significativa em todos os grupos quando comparamos ao veículo (Figura 31B), sugerindo mais uma evidência de sensibilização à insulina.

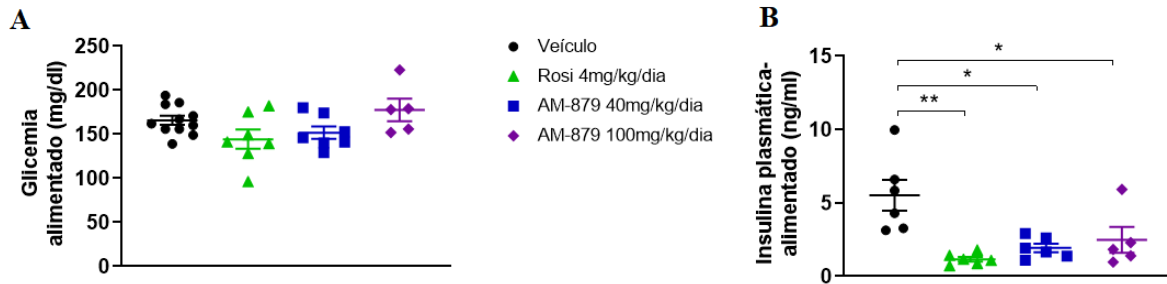


Figura 31. (A) Glicemia e (B) níveis plasmáticos de insulina no estado alimentado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica por 16 semanas e com seus respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$.

Observamos um aumento nos níveis plasmáticos de adiponectina nos grupos tratados com Rosiglitazona e com a maior dose de AM-879 (Figura 32), corroborando com a melhora da sensibilidade à insulina nos animais desses grupos, assim como na linhagem KI.

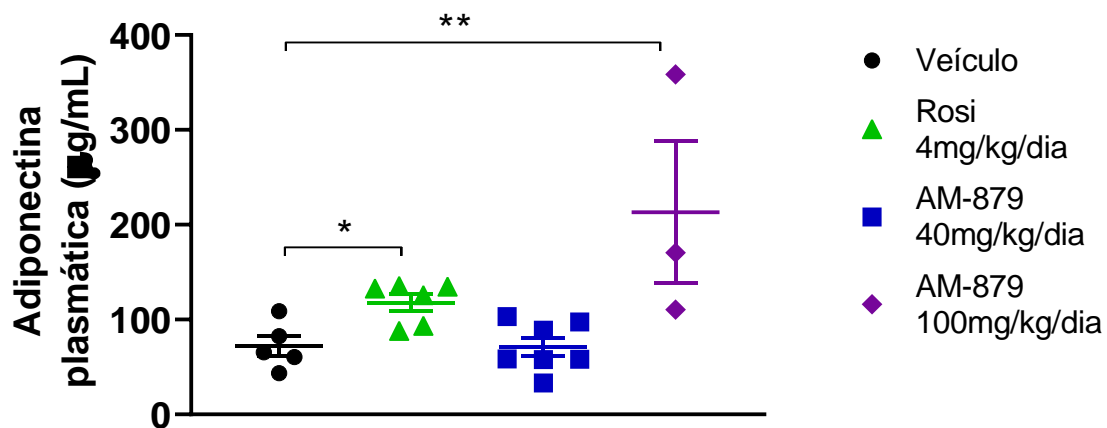


Figura 32. Níveis plasmáticos de adiponectina dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 3$ por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

4.2.3- Análises morfométricas a partir de histoquímica e triglicérides hepático

Através da histologia, observamos um aumento significativo na esteatose hepática no grupo tratado com Rosiglitazona quando comparado ao veículo, enquanto as doses do AM-879 não apresentaram alteração com relação ao veículo nesta análise (Figura 33A e B).

Analisamos também os níveis de triglicérides hepático, observando uma redução com a maior dose do ligante AM-879 (Figura 33C), assim como foi observado nos animais KI, sugerindo possíveis alterações em vias hepáticas a serem investigadas, além de evidenciar que o AM-879 protege o fígado do aumento da esteatose.

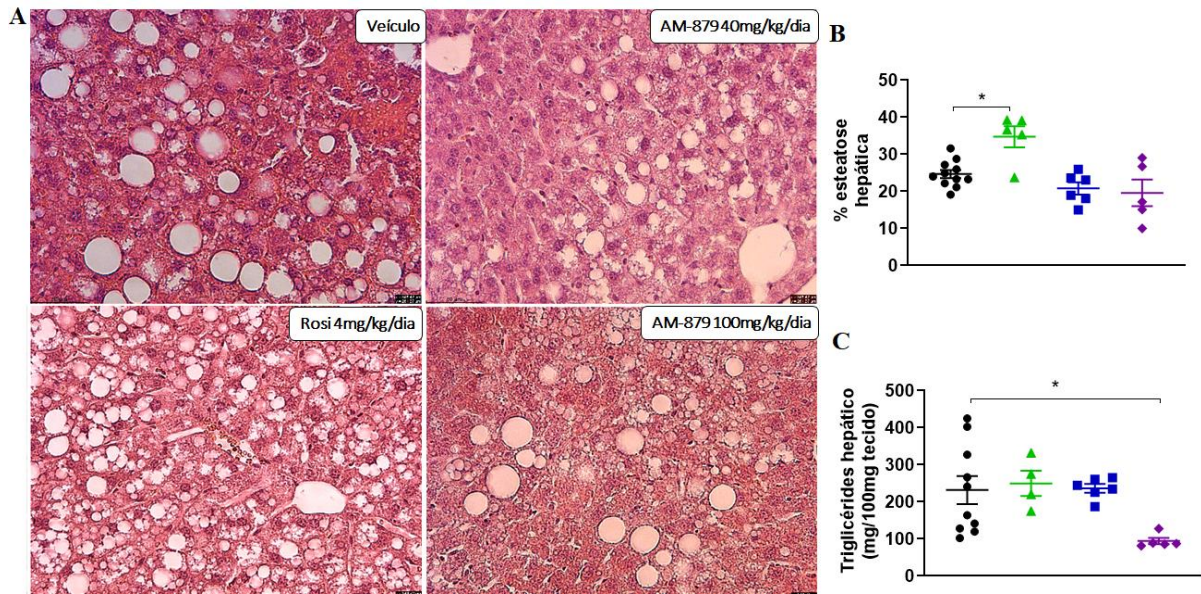


Figura 33. (A) Histologia hepática e (B) respectivo gráfico de percentual de acúmulo de lipídeos (esteatose), (C) níveis hepáticos de triglicérides dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas; $n \geq 4$ por grupo. Análise estatística por Multiple comparison One-way ANOVA, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

Ainda na análise histológica, avaliamos o tecido adiposo branco (WAT- Figura 34), no qual foi feito um estudo mais aprofundado com relação aos efeitos dos tratamentos no tamanho e quantidade de adipócitos (hipertrofia e hiperplasia, respectivamente), analisando os 5 grupos simultaneamente (incluindo os *knockin*). A Tabela 4 mostra os dados referentes à área e perímetro de cada um dos grupos, sendo possível identificar um aumento na área e perímetro das células nos animais *knockin*, e redução no tratamento com Rosiglitazona. Ambas as doses do AM-879 apresentaram aumento nestes parâmetros, porém menos discrepante. Os dados também mostram os quartis e intervalos de quartis, utilizados para determinar e excluir os outliers, além do n em cada tratamento, que não foi considerado, uma vez que os cortes histológicos diferiram em tamanho para a análise.

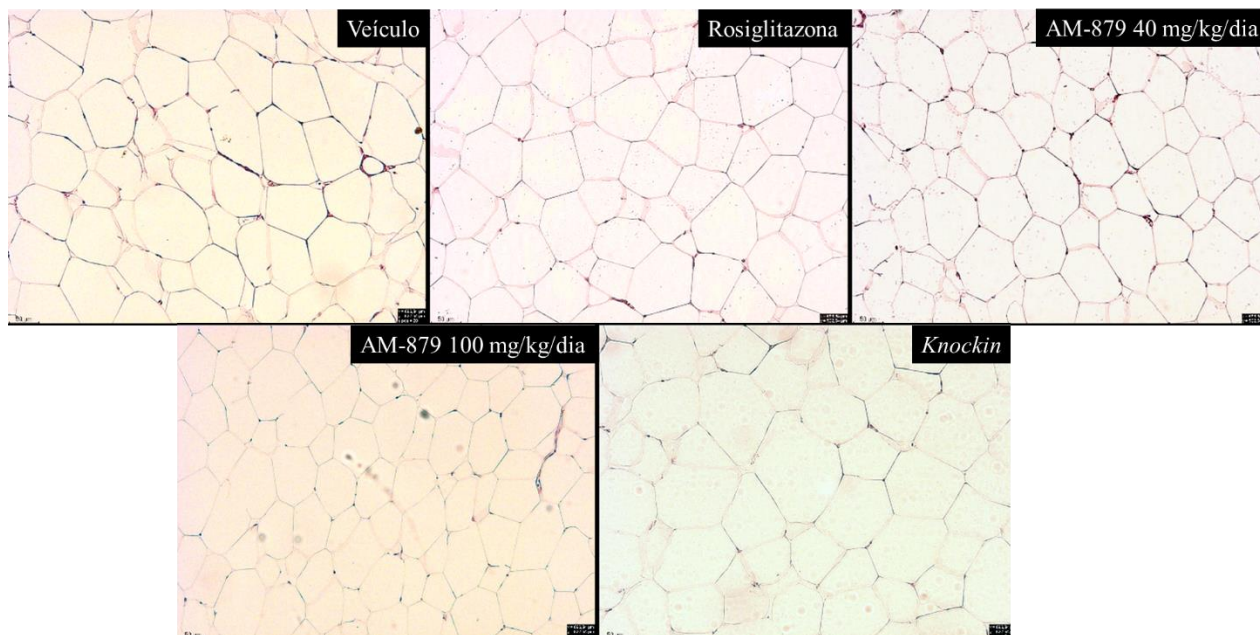


Figura 34. Análise histológica do tecido adiposo branco (WAT) dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas. Os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes realizados na espessura de 5 μm .

Tabela 4. Dados com relação à área e perímetro dos adipócitos em cada grupo após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas, com o n (número de células-adipócitos), média, primeiro e terceiro quartil e interquartil, sendo esse último utilizado como referência para remoção dos outliers ($2 \times \text{IQR}$).

Variável	Grupo	n	Média	Q1	Q3	IQR	BF10 (vs. vehicle)
Área (μm^2)	Veículo	85495	3603,6	965,9	5460,9	4495	-
	Rosiglitazona 4 mg/kg/dia	45535	3100,2	792,5	4717	3924,5	404.53
	AM-879 40 mg/kg/dia	66492	3805,9	996	5798,7	4802,7	68.07
	AM-879 100 mg/kg/dia	18981	3833,6	1218,9	5659,6	4440,7	36.93
	Knockin	20997	4201,3	1823,1	5921,3	4098,3	301.89
Perímetro (μm)	Veículo	85495	278,9	168,6	367,9	199,4	-
	Rosiglitazona 4 mg/kg/dia	45535	254,1	150,1	337,6	187,5	517.05
	AM-879 40 mg/kg/dia	66492	283,6	169,2	378,3	209,1	17
	AM-879 100 mg/kg/dia	18981	278,8	181,5	358,2	176,7	-4.7
	Knockin	20997	339,1	225,1	433,6	208,5	∞

Esses resultados se confirmaram nos gráficos violino abaixo, nos quais a estatística foi definida pelos valores de $\log_{10} \text{BF10}$, sendo que quanto maior esse valor, maior e mais forte é a diferença entre os grupos comparados. Foi possível identificar maiores área e perímetro no grupo *knockin* (em vermelho), com $\log_{10} \text{BF10} > 300$ em ambos, sugerindo forte diferença entre os grupos comparados (veículo vs. *Knockin*). Com relação ao AM-879 (em azul e roxo), observamos também esse aumento, porém com $\log_{10} \text{BF10} \ll 70$, indicando diferença entre os

grupos analisados, porém essa diferença é menor e menos significativa. Já com a Rosiglitazone (em verde), houve uma redução na área e perímetro dos adipócitos, com $\log_{10}BF_{10} > 400$, indicando também forte diferença entre os grupos (Figura 35 e Figura 36).

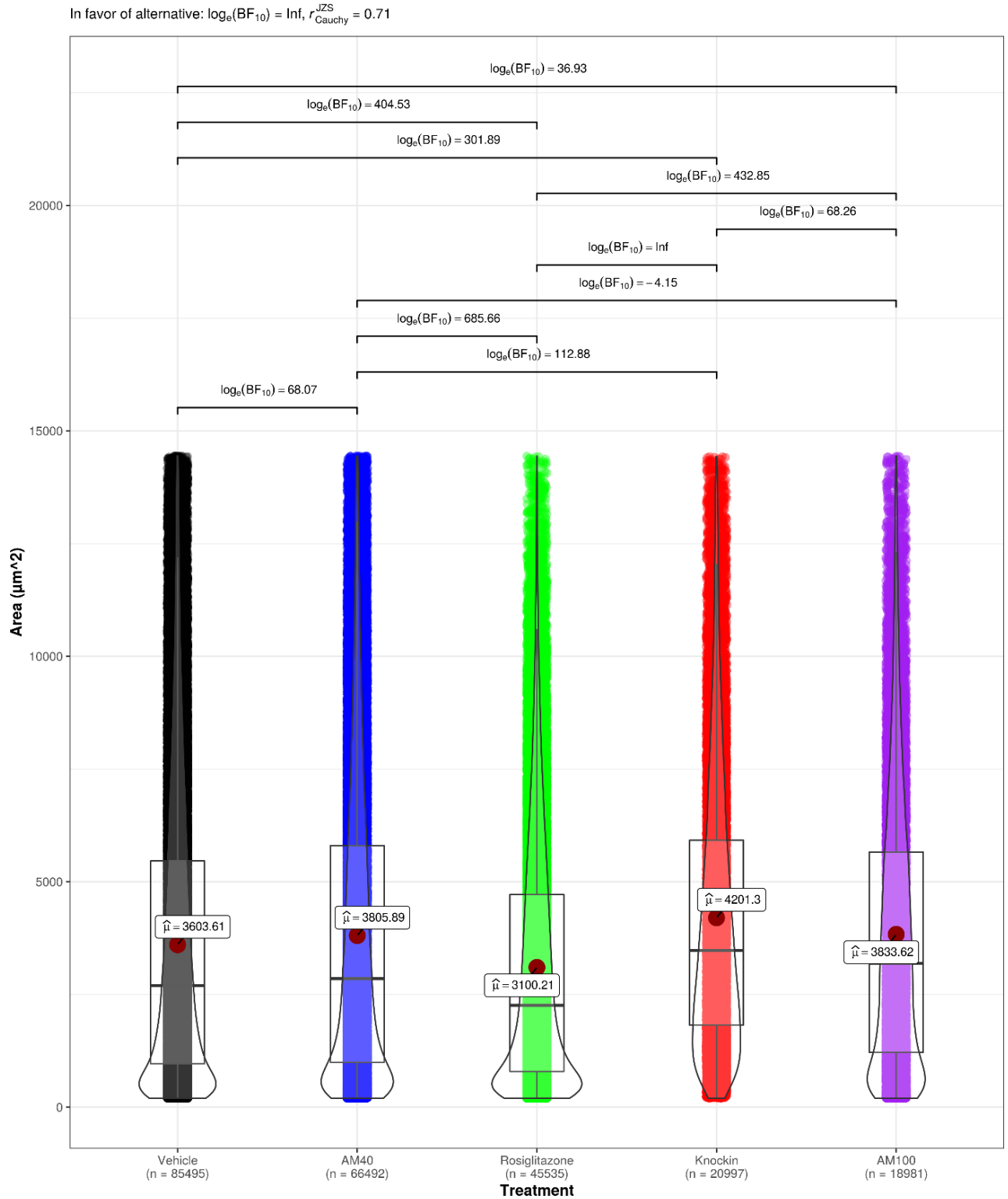


Figura 35. Área, em μm^2 , dos adipócitos, identificando a média e o n amostral de cada um dos grupos após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.

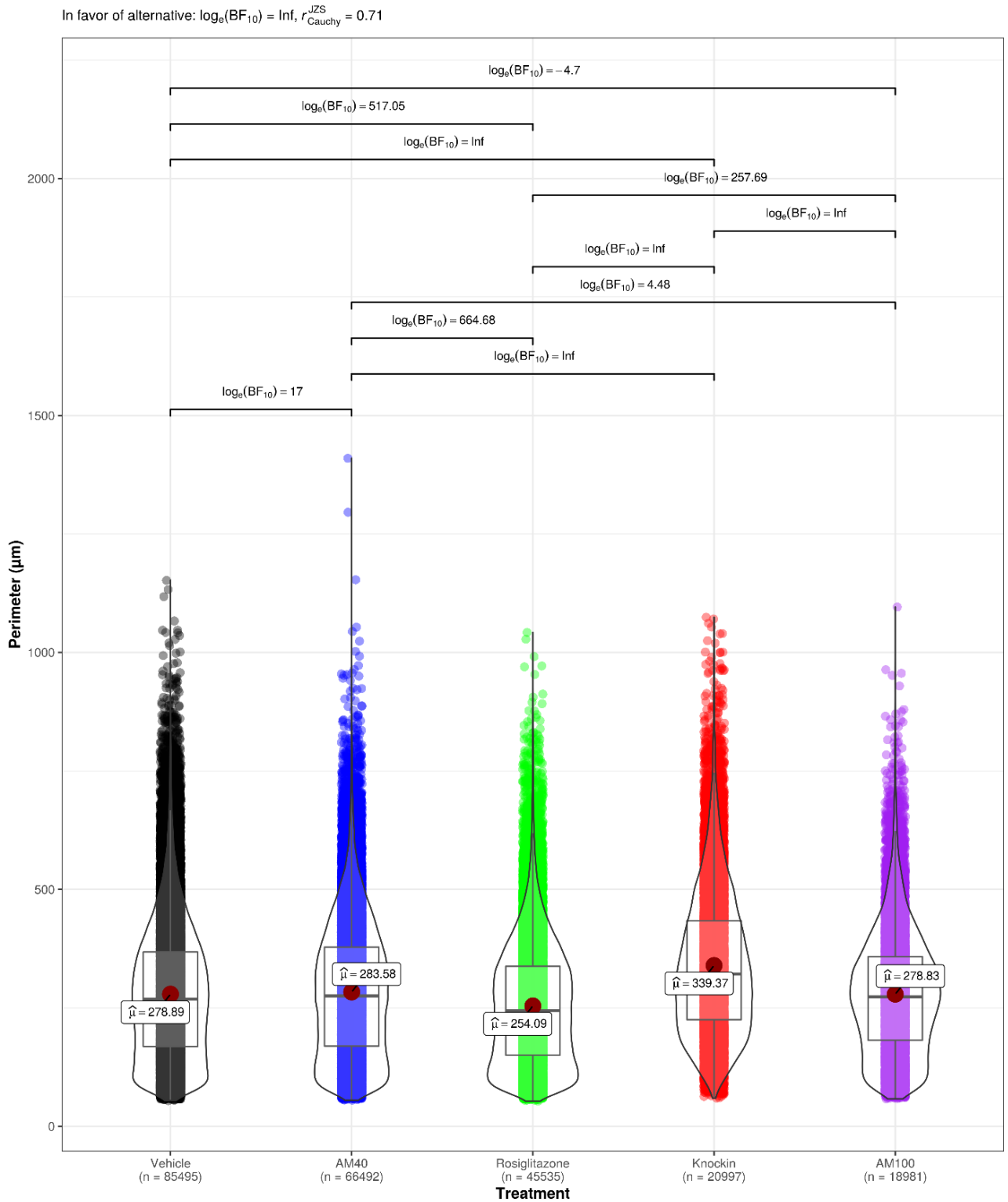


Figura 36. Perímetro, em μm , dos adipócitos, identificando a média e o n amostral de cada um dos grupos após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.

Além disso, avaliamos a densidade de células por área e por perímetro de adipócito, identificando uma maior densidade de adipócitos menores ($<2500 \mu\text{m}^2$ e $<250 \mu\text{m}$) no grupo tratado com Rosiglitazona, enquanto que nos animais *knockin* a maior densidade foi de adipócitos maiores (entre 2500 e $5000 \mu\text{m}^2$ / 400 e $600 \mu\text{m}$) (Figura 37 e Figura 38). Esses

resultados corroboram com aqueles descritos anteriormente de aparente hipertrofia de adipócitos na linhagem *knockin*.

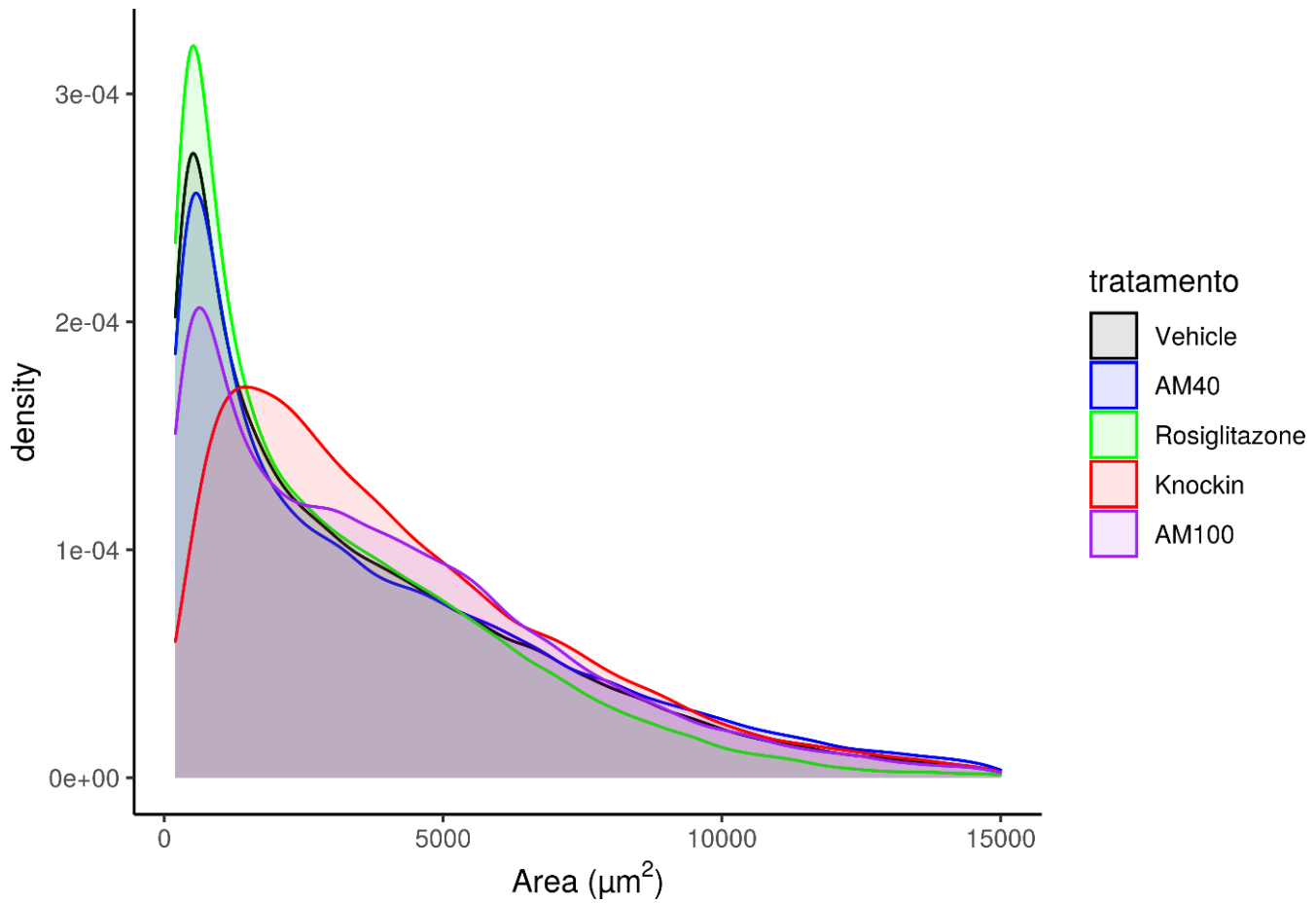


Figura 37. Análise da densidade de células em cada área de adipócito dos animais após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.

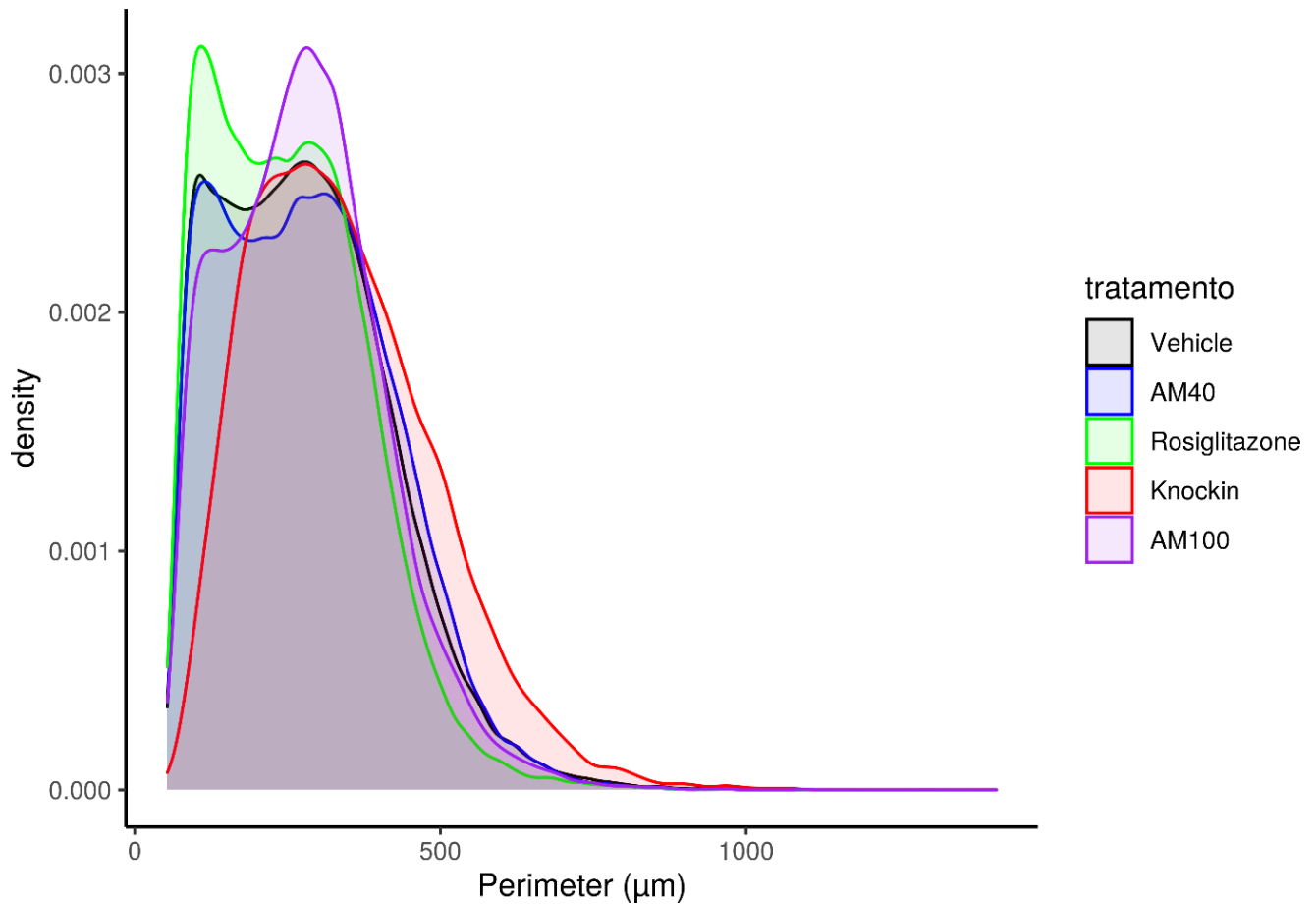


Figura 38. Análise da densidade de células em cada perímetro de adipócito dos animais após 16 semanas de dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas.

4.2.4- Análise de expressão gênica

No WAT foi avaliada a expressão de diversos genes, dentre eles alguns já descritos como regulados diretamente pela fosforilação. Observamos que a dose de 100 mg/kg/dia do AM-879 promove uma redução na expressão de *Nr1d2* e de *Txnip*, genes já descritos como regulados pela fosforilação. Além disso, observamos que o AM-879 na dose de 40 mg/kg/dia não afeta a expressão de *Gdf3*, que foi descrito como um possível alvo na sensibilização à insulina através da modulação da Ser273 [39]. O tratamento com Rosiglitazone reduziu significativamente a expressão de *Gdf3*, com relação ao veículo, enquanto no grupo tratado com 100 mg de AM-879, há um aumento na expressão desse gene (Figura 39).

Ainda, avaliamos a expressão da fosfatase *Ppm1a*, a qual também foi descrita como um alvo na DT2 devido à sua ação de desfosforilar a Ser273 do PPAR γ [64]. Observamos que a Rosiglitazone, assim como o AM-879 na maior dose tem uma redução na expressão desse gene quando comparado ao veículo, assim como foi observado na linhagem KI (Figura 39).

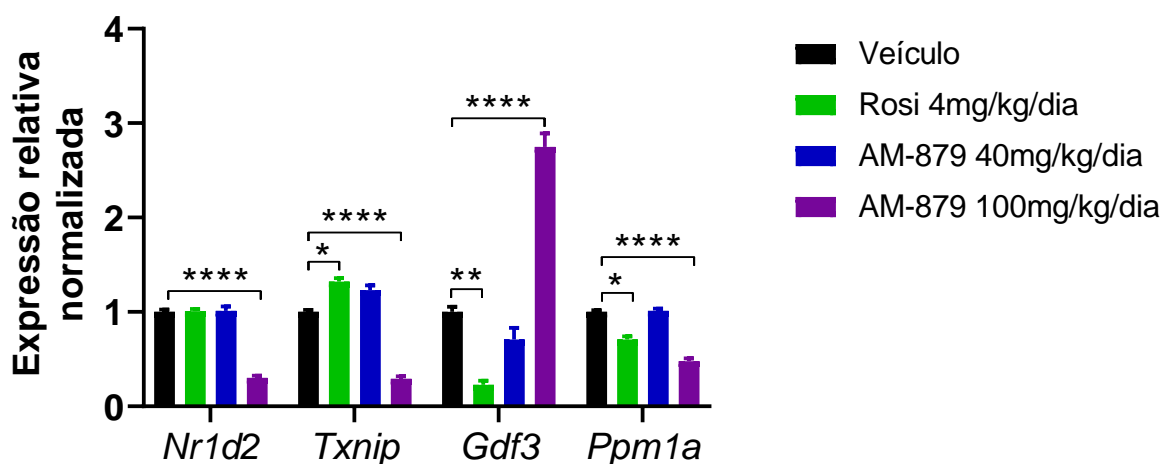


Figura 39. Expressão relativa normalizada dos animais alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas, de genes regulados pela fosforilação da Ser273 (*Nr1d2*, *Txnip* e *Gdf3*) e da fosfatase *Ppm1a* responsável por defosforilar esse resíduo; n ≥ 5 por grupo. Análise estatística por Multiple Comparison One-way ANOVA, com *p < 0,05; **p < 0,01 e ****p < 0,0001.

Com relação aos genes envolvidos na via do PPAR γ e metabolismo de lipídeos, observamos que as diferentes doses do ligante AM-879 promovem diferentes efeitos na expressão da leptina (*Lep*), sendo que a dose menor de 40 mg/kg/dia leva a um aumento na expressão, enquanto que a dose maior reduz sua expressão, indicando efeitos no balanço energético, o qual não foi mensurado no trabalho. Além disso, ambas as doses promovem um aumento na expressão da *Cfd* (ou adiposina), com relação ao grupo tratado com veículo, a qual está relacionada a uma melhora na função da célula beta pancreática. Além disso, a Rosiglitazona promoveu um aumento na expressão de *Pdk4*, indicando ativação do PPAR γ , uma vez que se trata de um agonista do receptor (Figura 40A).

Em todos os grupos houve um aumento na expressão de *Fabp4*, indicando um aumento no transporte de ácidos graxos livres para organelas e oxidação dos mesmos [65]. Somente com o tratamento com 100 mg/kg/dia de AM-879 houve redução na expressão de *CD36*, assim como foi observado na linhagem KI, sugerindo melhora nas complicações metabólicas relacionadas à obesidade, uma vez que a transdução de sinal desencadeada por essa molécula pode levar a essas complicações [66] (Figura 40A).

Avaliamos também a expressão de *Ucp1*, tanto no tecido adiposo marrom (BAT), quanto no branco (WAT), sendo que nesse último as diferentes doses do ligante AM-879 têm efeitos opostos, com redução na expressão de *Ucp1* com a menor dose e aumento da expressão com a maior dose. No BAT, observamos um aumento na expressão de *Ucp1* somente com a dose de

100 mg/kg/dia do AM-879 (Figura 40B), resultados semelhantes aos animais *knockin*. O aumento observado na expressão de *Ucp1* em ambos os tecidos sugere envolvimento nas vias de termogênese e balanço energético, as quais não foram investigadas a fundo nesse trabalho.

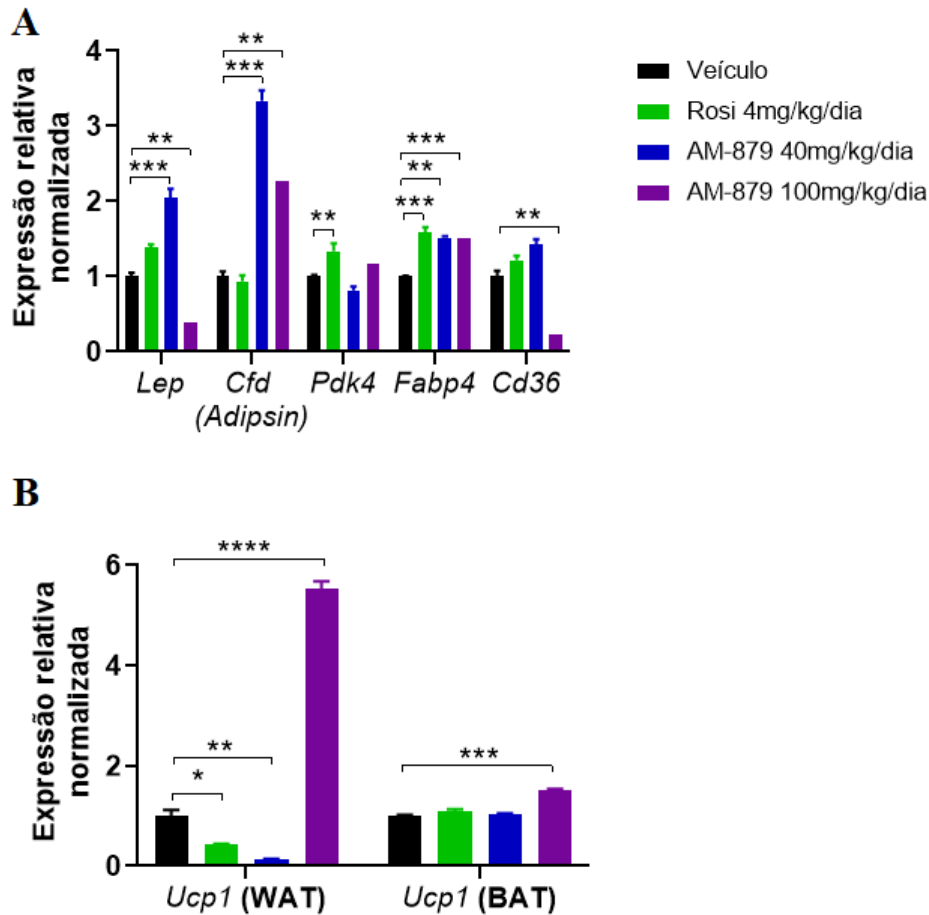


Figura 40. Expressão gênica nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais duas semanas. (A) Expressão relativa normalizada de genes envolvidos na via do PPAR γ e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo branco (WAT): *Lep* (leptina), *Cfd* (adipsina), *Pdk4* (quinase piruvato desidrogenase 4) e *Fabp4* (proteína ligadora de ácidos graxos). (B) Expressão relativa normalizada de *Ucp1* (proteína desacopladora) no WAT e BAT; $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t e Multiple Comparison One-way ANOVA, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Com relação aos genes avaliados no hipotálamo, observamos que o AM-879 na dose de 40 mg/kg/dia aumentou a expressão do hormônio liberador de corticotropina (*Crh*), enquanto que os níveis de expressão de neuropeptídeo y (*Npy*) apresentaram-se reduzidos no grupo tratado com a maior dose do ligante AM-879, confirmando o envolvimento desse ligante na via do CRH, principalmente com a menor dose. A Rogilitazona não alterou a expressão de nenhum dos genes avaliados no hipotálamo (Figura 41).

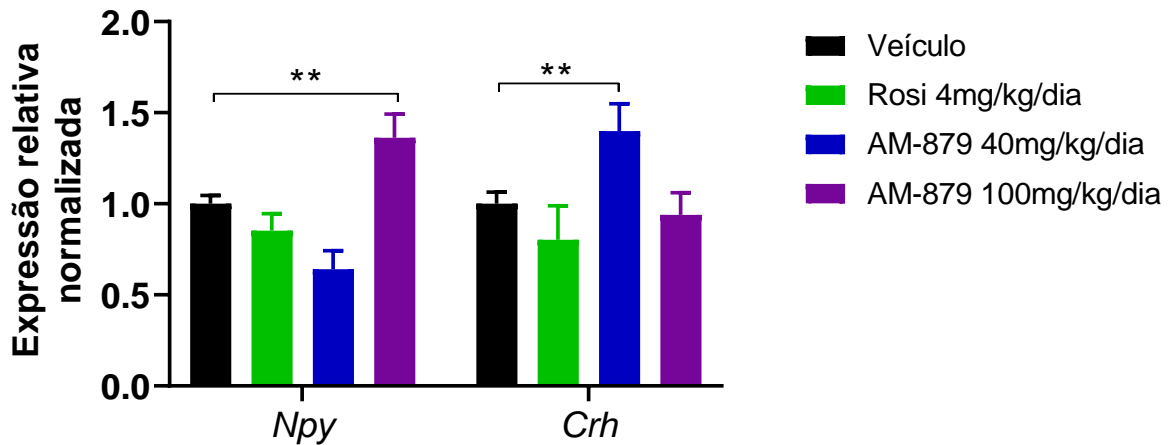


Figura 41. Expressão relativa normalizada de genes hipotalâmicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e seus respectivos tratamentos por mais 2 semanas: *Npy* (neuropeptídeo Y) e *Crh* (hormônio liberador de corticotropina); $n \geq 5$ por grupo. Análise estatística por teste t e One-way ANOVA, com $*p < 0,05$.

Uma vez houve alteração na expressão de *Crh*, avaliamos os níveis circulantes do hormônio cortisol, porém em nenhum dos grupos houve alteração nesses níveis quando comparamos em relação ao veículo (Figura 42).

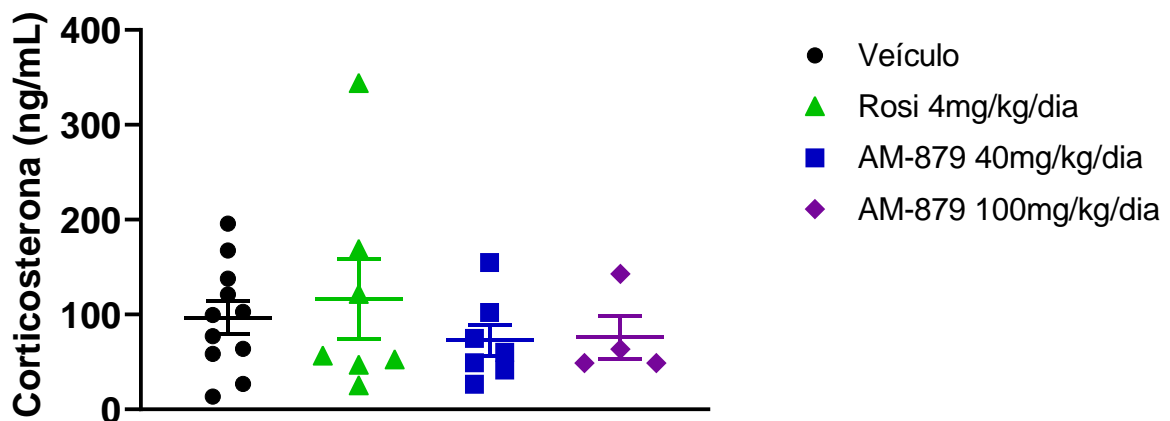


Figura 42. Níveis plasmáticos do hormônio corticosterona nos diferentes grupos de animais alimentados com dieta hiperlipídica; $n \geq 5$ por grupo.

5. DISCUSSÃO

Segundo dados da OMS e IDF, obesidade e diabetes tem atingindo proporções cada vez maiores ao redor do mundo, com um aumento no número de indivíduos acometidos com as doenças e no número de mortes. Diante disso, a busca por tratamentos mais eficazes, além de melhora na qualidade de vida, tem sido intensificada. Nesse cenário, o receptor nuclear PPAR γ

exerce um importante papel, uma vez que seus genes-alvo estão diretamente relacionados com o processo de diferenciação de adipócitos e sensibilização à insulina [67].

A constante busca por ligantes cujo alvo seja o PPAR γ acontece desde a década de 80, quando foram descobertas as Tiazolidinedionas (TZDs) [68], as quais são conhecidas por reverter o quadro de resistência à insulina através de sua alta afinidade por esse receptor, a qual foi descoberta em 1995 [69]. Porém, o elevado número de pacientes com efeitos colaterais devido ao uso desses medicamentos, como ganho de peso, retenção de fluidos, perda óssea e falha cardíaca, fez com que fossem retirados do mercado [70].

Posteriormente atribuiu-se que esses efeitos colaterais eram resultado da ativação direta do PPAR γ , ou seja, as TZDs eram responsáveis por promover a transcrição de genes-alvo desse receptor, induzindo efeitos relacionados ao processo de adipogênese e metabolismo de lipídeos [71]. Além disso, acreditava-se que a sensibilização à insulina também estava relacionada com a ativação desse receptor, porém em 2010 detectou-se que uma fosforilação no resíduo da Ser273 do PPAR γ , que seria a responsável por desencadear o processo de resistência à insulina, além de promover a desregulação de diversos genes, como *Adipoq*, *Lep* e *CD36*. Nesse mesmo estudo detectou-se que ligantes já conhecidos, como Rosiglitazona e MRL-24, agonistas totais de PPAR γ , promoviam um bloqueio dessa fosforilação e, conseqüentemente, sensibilização à insulina [22].

Com isso, novas hipóteses na busca por ligantes moduladores de PPAR γ emergiram, nas quais busca-se pelo bloqueio da fosforilação na Ser273 resultando na sensibilização à insulina, assim como a não ativação do receptor, com agonistas parciais ou não-agonistas, a fim de evitar efeitos colaterais promovidos pelo agonismo dos ligantes. Assim, em 2013, um ligante não-agonista de PPAR γ foi identificado, o AM-879 [45], o qual, em estudo posterior, foi identificado como uma molécula promissora no tratamento da obesidade e diabetes, uma vez que reduz a fosforilação e não induz o processo de adipogênese [47]. Além dessa via, estudos demonstraram que esse ligante também atua na via do hormônio liberador de corticotropina (Crh), atuando em processos endócrinos como ingestão alimentar e gasto energético, mas também na via do estresse (PubChem AID 651639 e CID 1209375) [48].

Esse trabalho foi desenvolvido no contexto descrito acima, tendo como objetivo investigar os efeitos do não-agonista AM-879 em modelo animal de obesidade, partindo de três doses distintas iniciais, as quais foram determinadas baseando-se na afinidade do ligante pelo PPAR γ , a qual é 10 vezes menor que da Rosiglitazona. A menor dessas doses, de 10 mg/kg/dia, foi

excluída no projeto piloto, uma vez que não promoveu alterações significativas nos parâmetros analisados, mantendo-se as duas doses maiores de 40 e 100 mg/kg/dia, e a Rosiglitazona foi utilizada como controle positivo do estudo proposto. Adicionalmente, desenvolvemos uma linhagem de camundongos *knockin* com uma mutação pontual na serina 273 para alanina, impedindo a ocorrência dessa fosforilação, a qual foi caracterizada e utilizada para comparar com os dados obtidos com os ligantes.

Antes da utilização dessa nova linhagem de animais, fizemos sua caracterização através da genotipagem (sequenciamento e ensaio de enzima de restrição), além da caracterização fenotípica, avaliação da expressão gênica e de proteínas. No desmame, os animais KI tem maior peso corporal e são hiperglicêmicos, porém apresentam baixos níveis de insulina circulante, indicando alterações no metabolismo da glicose, com elevada glicemia devido à baixa insulina circulante ou o organismo não respondendo adequadamente ao hormônio. Essa hiperglicemia também pode estar relacionada com alterações nas vias hepáticas de produção/captação de glicose (gliconeogênese) ou degradação da mesma [72].

Além disso, após 16 semanas de dieta hiperlipídica, observamos que, quando comparados aos animais C57Bl/6J controle, há uma melhora da sensibilidade à insulina na linhagem KI, com aumento no KITT, redução da insulina circulante e aumento da adiponectina no plasma, como já esperado devido ao bloqueio da fosforilação [39]. Porém, foi observado aumento na esteatose hepática e aumento no tamanho dos adipócitos, o qual pode estar relacionado à hipertrofia de WAT e indução de obesidade visceral. Esses efeitos adversos observados nos animais KI podem estar relacionados ao fato do sítio de ligação a ligantes do PPAR γ estar livre para o acoplamento de moléculas endógenas que ativem esse receptor, como ácidos graxos livres, promovendo a transcrição de seus genes-alvo, como aqueles relacionados ao processo de adipogênese e metabolismo de lipídeos [9, 10, 29].

Com relação à expressão gênica, avaliamos dois dos genes descritos por Choi em 2010 como sendo regulados pela fosforilação: *Nr1d2* e *Txnip* [22], observando uma redução, principalmente do primeiro alvo, nos animais *knockin*, indicando atuação no bloqueio da fosforilação. Além disso, também observamos aumento na expressão de *Gdf3* e redução na expressão de *Ppmla* nos animais KI, os quais foram descritos em 2020 como também sendo regulados pela fosforilação [39, 64], sugerindo que a mutação foi efetiva em bloquear a ocorrência dessa modificação pós-traducional. Por fim, demonstramos que a expressão de diversos genes no tecido adiposo branco é igual nos animais C57 e WT (oriundos da microinjeção), justificando a utilização do primeiro grupo como controle.

Na expressão de proteínas, destacamos inicialmente uma variação na expressão do PPAR γ entre os grupos, com uma redução significativa nos animais C57 HFD e KI dieta normal, motivo pelo qual não normalizamos a fosforilação da Ser273 pela expressão desse receptor, somente pelo controle interno. Pouco se discute na literatura a respeito da expressão de PPAR γ em virtude da dieta hiperlipídica e sua relação com a fosforilação, porém já foi observado tanto redução [73], quanto aumento [74, 75] da expressão em condições de HFD. Quando se trata da fosforilação da Ser273, como esperado observamos um aumento devido à HFD, assim como uma redução nos animais *knockin*, que se manteve semelhante ao grupo C57 dieta normal, no qual não se espera que ocorra fosforilação [22, 39].

Já na expressão gênica observamos uma redução na expressão de PPAR γ nos animais C57 HFD, assim como em ambos os grupos de *knockin*, sendo que nesses últimos a expressão foi extremamente reduzida. Alguns artigos já relataram a influência epigenética na expressão de alguns genes, dentre eles o PPAR γ , principalmente por metilação, pela influência da dieta hiperlipídica e do tempo de administração nos animais, sendo que, dependendo do tempo de HFD, o gene desse receptor pode ser mais metilado ou desmetilado, resultando na redução ou aumento de sua expressão. Um dos estudos demonstra que a administração da dieta hiperlipídica por 12 semanas poderia resultar no aumento da expressão de PPAR γ , assim como de seus genes alvo, como *Cd36*, *Fabp* e *Vldlr*, envolvidos na captação e armazenamento de lipídeos, devido a uma desmetilação do DNA [76].

Por outro lado, também já foi reportado que 16 semanas de administração de HFD causou uma redução na expressão de PPAR γ em virtude de uma hipermetilação [77], resultado semelhante ao observado no nosso trabalho. Não foram encontrados na literatura estudos que relacionem a fosforilação da Ser273 com reduzida expressão gênica de PPAR γ , porém esta poderia estar relacionada a modificações epigenéticas no DNA ou a processos de inibição de degradação proteica, principalmente por ubiquitinação [78, 79].

Para avaliar os efeitos do não-agonista de PPAR γ , animais C57Bl/6J foram alimentados com a dieta hiperlipídica e subdivididos nos respectivos grupos de tratamento: veículo, AM-879 40 e 100 mg/kg/dia, e Rosiglitazona, comparando os resultados com os animais KI. Diferentemente da administração da Rosiglitazona, que tem como um de seus efeitos o ganho de peso, causado pelo aumento da expressão de genes relacionados à adipogênese [55], a administração do AM-879 nas 2 doses administradas e os animais *knockin* não apresentaram esse aumento de massa corporal. Interessantemente, somente a administração da dose maior do

ligante levou a uma redução no consumo de dieta, o qual foi investigado nos experimentos posteriores do trabalho, podendo estar relacionado à termogênese e balanço energético.

Diversos órgãos foram dissecados no dia da eutanásia dos animais e sendo observado um aumento no tecido adiposo branco (WAT) dos animais *knockin* em comparação ao veículo. Este resultado pode estar relacionado a um maior recrutamento de coativadores pelo PPAR γ , promovendo uma ativação maior desse receptor e, conseqüentemente, ativando a transcrição de genes-alvo relacionados ao processo de adipogênese. Apesar de termos observado uma redução na expressão de *Pdk4*, um gene indicador da ativação do PPAR γ [80], um trabalho do nosso grupo publicado em 2020 identificou que a ausência da fosforilação altera o recrutamento de correguladores, aumentando associação de coativadores e dissociação de correpressores [37].

A redução no peso do fígado em ambas as doses de AM-879 e também nos animais *knockin* poderia estar relacionado à redução dos níveis hepáticos de triglicérides [81], o qual foi avaliado e confirmado quando maceramos e extraímos os lipídeos do fígado para quantificar o perfil lipídico no órgão. Adicionalmente, verificamos que todos os tratamentos promoveram alteração no peso do tecido adiposo marrom (BAT), sendo que somente a Rosiglitazona promoveu um aumento e, nos demais tratamentos, houve redução de BAT. Esse efeito da Rosiglitazona já foi descrito em outro trabalho que o relacionou a um aumento na lipogênese nesse tecido, com um aumento na síntese de triacilglicerol resultado da elevada disponibilidade de glicerol-3-fosfato, devido ao aumento da atividade das enzimas PEPCCK e glicerol quinase, além da hipertrofia e hiperplasia desse tecido [82]. Isso indica que os outros tratamentos e o animal *knockin* estariam bloqueando esta via.

A redução no BAT observada nos animais KI e em ambos os tratamentos com AM-879 se assemelha aos efeitos observados com o ligante GQ-16. Este agonista parcial de PPAR γ apresentou efeitos positivos na sensibilidade à insulina, inclusive com redução nesse tecido e aumento na expressão de *Ucp1*, os quais estão relacionados à ativação de BAT na exposição ao frio e termogênese [55, 83].

Com relação a sensibilidade à insulina, observamos resultados significativos no tratamento com Rosiglitazona, efeito já esperado de acordo com o que temos descrito em literatura [84]. Já com o AM-879, o efeito na melhora da sensibilidade foi observado somente com a dose maior de 100 mg/kg/dia, com redução em 3 pontos da curva do % glicêmico, assim como redução na respectiva área abaixo da curva e aumento do KITT. Essa diferença na resposta com as diferentes doses possivelmente está relacionada ao fato de que, apesar de promover uma

redução na fosforilação da Ser273 do PPAR γ , assim como a Rosiglitazona, esse ligante não-agonista possui uma afinidade menor ao receptor (K_d $4,5 \pm 0,6$ vs $0,4 \pm 0,1$) [47], interagindo menos com o PPAR γ na menor dose e, como já foi descrito, por possuir atuação em outra via, do hormônio liberador de corticotropina (Crh).

Os animais *knockin* também apresentaram uma melhora na sensibilidade à insulina no ITT, também com um aumento no KITT, efeito já esperado devido à mutação que impede a ocorrência da fosforilação na Ser273. Um trabalho publicado em 2020 também com animais com essa mutação também obteve uma significativa melhora na sensibilidade à insulina, porém com dose diferente de insulina utilizada no teste (2 U/kg no artigo vs 0,75 U/kg no nosso trabalho) e o tempo avaliado, uma vez que fizemos o ITT curto (0-24 minutos) e no artigo foi feito o ITT longo (0-120 minutos) [39]. Além disso, não observamos alterações na glicemia no estado alimentado em nenhum dos grupos, apesar de já ter sido descrita uma redução de glicemia no tratamento com Rosiglitazona, porém, no trabalho reportado foi utilizada uma dose maior de 20 mg/kg/dia de ligante, o tempo de tratamento foi de 8 semanas e outro modelo animal foi utilizado, a linhagem *db/db* [85].

Os níveis circulantes de insulina também foram mensurados e em todos os grupos houve redução quando comparamos ao veículo controle. Essa alteração já era esperada no grupo tratado com Rosiglitazona, devido aos efeitos já conhecidos desse ligante na sensibilidade à insulina. Entretanto, neste estudo observa-se um efeito benéfico do tratamento com AM-879 e também nos animais *knockin*, visto que, como observamos melhora na sensibilidade à insulina (exceto com a menor dose do ligante que há uma tendência), a redução nos níveis circulantes de insulina pode também ser um indicativo de sensibilidade ao hormônio [86, 87]. Além disso, o aumento nos níveis plasmáticos de adiponectina nesses mesmos grupos corrobora com a melhora da sensibilidade à insulina, uma vez que esse hormônio é considerado um marcador nesse processo [88, 89].

Em virtude da redução no peso do fígado, analisamos também a esteatose por histologia e os níveis de triglicérides. Com relação à histologia, observamos que a Rosiglitazona promove um aumento significativo nesses lipídeos, o qual já é conhecido como um de seus efeitos devido ao agonismo desse fármaco [55, 90]. Entretanto, trabalhos já relataram melhora da esteatose com o tratamento de Rosiglitazona, tanto em camundongos, quanto ratos [91, 92]. Nesses camundongos não houve alteração nos níveis de triglicérides hepáticos, o que difere da literatura, uma vez que é descrita a atuação desse ligante no aumento desses níveis de forma

relevante [93, 94]. Por outro lado, somente um trabalho reportou a manutenção desse perfil quando comparado ao controle [95].

Nos animais *knockin*, apesar da redução no peso do fígado, houve um aumento no acúmulo de lipídeos (esteatose), o que pode estar relacionado à inibição da fosforilação e consequente recrutamento de coativadores, ativando o PPAR γ e vias relacionadas à adipogênese [96, 97]. Ainda nesse grupo, observamos uma redução nos níveis de triglicerídeos que poderia ser considerado contraditório ao aumento da esteatose, porém já foi descrito que a síntese desses lipídeos é estimulada por hiperinsulinemia e hiperglicemia, efeitos não observados nesses camundongos, além do fato que a esteatose também pode ser desenvolvida devido ao aumento na captação de lipídeos pelo fígado, que não necessariamente serão metabolizados a triglicerídeos [81, 98]. Com relação ao AM-879, observamos que ambas as doses não promovem alteração na esteatose hepática, que se mantém semelhante ao veículo, porém somente a dose maior leva a uma redução nos níveis hepáticos de triglicerídeos, sendo mais um efeito positivo do tratamento com esse ligante [99]. Além disso, a redução nos níveis de triglicérides hepático nos animais *knockin* e com a maior dose do ligante AM-879 pode estar relacionada ao aumento na adiponectina circulante, além de redução de *CD36* e consequente melhora na sensibilidade à insulina [100].

Também através da histologia, avaliamos o tecido adiposo branco (WAT) dos animais e observamos uma redução na área e perímetro dos adipócitos no grupo tratado com Rosiglitazona, resultado já observado na literatura em trabalhos anteriores [90, 101, 102], com uma maior densidade de adipócitos menores (área <2500 μm^2 e perímetro <200 μm), podendo indicar hiperplasia. Por outro lado, condizente com um aumento no WAT, observamos um aumento na área e perímetro dos adipócitos (hipertrofia) dos animais *knockin* que poderia estar relacionada à maior ativação do PPAR γ devido ao recrutamento de coativadores e ativação de vias envolvidas no processo de adipogênese [37]. O tratamento com AM-879 em ambas as doses não alterou de forma significativa esses parâmetros dos adipócitos.

Uma vez que os ligantes utilizados nos tratamentos são conhecidos por bloquear a fosforilação na Ser273 do PPAR γ e nos camundongos *knockin* esse processo não deve ocorrer, analisamos dois marcadores (*Nr1d2* e *Txnip*), dentre os 17 genes descritos por Choi em 2010, que são regulados por essa modificação pós traducional [22]. Diferentemente do esperado, nos animais tratados com Rosiglitazona não houve alteração na expressão desses genes e acreditamos que devido à dose utilizada [22], a qual também influenciou em parâmetros como glicemia, níveis hepáticos de triglicerídeos e peso do WAT. Com relação ao AM-879,

observamos redução na expressão de *Nr1d2* e *Txnip* somente na dose maior de 100 mg/kg/dia, assim como nos animais *knockin*, em comparação ao grupo veículo, um indicativo do bloqueio da fosforilação [47].

Ainda no contexto de genes regulados pela fosforilação, em 2020 foi publicado um trabalho em que camundongos com uma mutação pontual na Ser273 do PPAR γ não desenvolveram resistência à insulina quando submetidos à dieta hiperlipídica. Verificaram uma expressão diferencial do gene *Gdf3*, uma proteína membro da família do TGF- β , a qual tem expressão reduzida no tecido adiposo branco dos animais mutantes, indicando um alvo promissor no contexto de modulação da fosforilação do PPAR γ , diabetes e obesidade [39]. Avaliamos a expressão desse gene e observamos que a Rosiglitazona também promove uma redução significativa desse gene, enquanto que a dose maior de AM-879 e nos animais *knockin* promoveram um aumento em sua expressão, indicando que há uma modulação na expressão desse gene, porém não ocorreu da forma como descrita pelo artigo.

Essa divergência de resultados com relação aos animais *knockin* pode ser explicada devido à atuação do PPAR γ em promover a transcrição de *Gdf3*, sendo visto que a inibição desse receptor nuclear pelo antagonista GW-9662 impede seu recrutamento aos promotores do gene *Gdf3* [103, 104]. Uma vez que observamos um aumento do tecido adiposo que poderia estar relacionado ao maior recrutamento de coativadores, levando a maior ativação de PPAR γ e consequente aumento na transcrição de *Gdf3*, que justificaria também o aumento na esteatose [37, 105]. O aumento na expressão de *Gdf3* no grupo tratado com a maior dose de AM-879 é diferente do esperado, porém pode estar relacionado ao envolvimento desse ligante em outras vias, como do CRH, tendo em vista que camundongos *Gdf3*^{-/-} consomem mais dieta quando comparados ao selvagem como um mecanismo compensatório à elevada taxa metabólica basal [106], no caso deste trabalho observamos uma redução no consumo da dieta e aumento na expressão desse gene.

Ainda em 2020 foi publicado outro possível alvo promissor no contexto da fosforilação da Ser273, que consiste na fosfatase PPM1A, responsável por desfosforilar esse resíduo. Foi visto que animais alimentados com dieta hiperlipídica, os quais possuem a Ser273 fosforilada, tem menor expressão dessa enzima, apresentando uma correlação negativa [64]. Nesse trabalho observamos que em todos os grupos, exceto com a menor dose do ligante AM-879, há uma redução na expressão de *Ppm1a*, contradizendo essa correlação negativa. Porém, não foi avaliado pelos pesquisadores do artigo a presença de ligantes e sua influência na expressão da

enzima, além de ter sido demonstrado que ela interage com o PPAR γ e, a presença de um ligante ou a mutação, poderiam interferir nessa interação.

No tecido adiposo branco avaliamos a expressão de alguns genes envolvidos na via do PPAR γ e metabolismo de lipídeos, como o *Pdk4* (quinase piruvato desidrogenase), o qual tem sua expressão aumentada quando há ativação do receptor [80]. Como esperado, a Rosiglitazona promoveu um aumento na expressão desse gene. O ligante AM-879, em ambas as doses, não alterou essa expressão, confirmando o agonismo e não-agonismo, respectivamente, desses ligantes [22, 47]. A redução nos níveis de *Pdk4* nos animais *knockin* pode estar relacionada à gliceroneogênese, uma vez que esse gene codifica para uma enzima ativadora desse processo, e já foi visto que alguns agonistas seletivos desse receptor também reduzem a expressão de *Pdk4* [107, 108].

Ainda, observamos um aumento significativo na expressão de *Cfd* (adipsina) no tratamento com ambas as doses de AM-879, enquanto que nos animais *knockin* e no grupo tratado com Rosiglitazona não observamos alteração, apesar de artigos relatarem aumento na expressão desse gene com uso de agonistas [109]. A adipsina, assim como a leptina, é um dos marcadores de adipócitos maduros, sendo liberada na circulação para manutenção da homeostase [110], além de estar diretamente relacionada com melhora da função de células β pancreáticas em casos de obesidade e DT2 [111], porém esse órgão não foi avaliado nesse estudo.

Ainda nesse contexto, avaliamos também a expressão da leptina (*Lep*), a qual se mostrou aumentada com a menor dose do ligante AM-879 e reduzida com a maior dose. Esse aumento com a dose de 40 mg/kg/dia pode estar relacionado ao aumento na expressão de *Crh* no hipotálamo, uma vez que já foi descrita a interação desses dois hormônios em camundongos e a relação do AM-879 com a via do *Crh* [51] (PubChem AID 651639 e CID 1209375). Com a dose de 100 mg/kg/dia, observamos o efeito oposto, com redução na expressão desse gene, o que pode estar relacionado ao não-agonismo dessa molécula, que mostrou efeitos maiores na via do PPAR γ com essa dose, corroborando com o papel desse receptor na regulação do balanço adequado da secreção de adipocinas [112].

Observamos também um aumento na expressão de *Fabp4* em todos os tratamentos com ligantes e uma redução nos animais *knockin*. Entretanto, segundo a literatura, o papel biológico dessa proteína ainda é pouco conhecido, uma vez que existem trabalhos que relatam resultados divergentes com relação à sua função. Trata-se de um marcador de adipócitos maduros que é descrito como estando relacionado ao desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e

arterosclerose [113], possuindo sua expressão e níveis plasmáticos elevados em pacientes obesos e modelos animais de obesidade, além de estar relacionado ao acúmulo de lipídeos no fígado [114-116]. Por outro lado, já foi relatada uma baixa expressão de *Fabp4* no tecido adiposo de pacientes e camundongos obesos, o que poderia resultar em uma menor β -oxidação de ácidos graxos, resultando no acúmulo dessas moléculas e o extravasamento de lipídeos para outros tecidos [117]. Nesse cenário, o aumento da expressão tanto com AM-879, quanto com Rosilitazona, poderia ser considerado um aspecto positivo no contexto de aumento da β -oxidação e redução do acúmulo de ácidos graxos, assim como a redução da sua expressão nos camundongos *knockin* e aumento do acúmulo de ácidos graxos, resultando no aumento do WAT observado. Entretanto, vale ressaltar que um aumento na expressão de um gene pode não significar um aumento na proteína, uma vez que existem processos intermediários que influenciam nessa transição, como miRNAs e processamento de RNAs [118, 119].

Ainda com relação ao tecido adiposo, uma molécula que vêm sendo estudada é o receptor CD36, o qual têm sido relacionado ao acúmulo de lipídeos em macrófagos e resposta inflamatória, sendo considerado um candidato à regulação da apoptose e inflamação. Já foi relatado que essa molécula contribui para o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica e resistência à insulina, além de estar relacionado com captação e oxidação de ácidos graxos, sendo um componente chave na via desses lipídeos [120-123]. Com isso, a redução em sua expressão nos animais *knockin* e com a maior dose de AM-879 pode ser considerado um efeito benéfico.

Vale mencionar que já foi descrita a interação entre CD36 e FABP4, os quais atuam importando ácidos graxos nos adipócitos e estimulando seu metabolismo, ocorrendo principalmente em células tumorais para manutenção do câncer [124-126]. Nesse caso, os efeitos opostos de redução de *Cd36* e aumento de *Fabp4* no tratamento com a maior dose do AM-879 não permitiram a interação entre as duas moléculas e consequente efeito no metabolismo de lipídeos.

Analisamos também a expressão de *Ucp1* no tecido adiposo branco (WAT) e marrom (BAT), sendo que no WAT a menor dose do ligante AM-879 promoveu uma redução na expressão desse gene, enquanto a maior dose e nos animais *knockin* houve um aumento dessa expressão. Além disso, nesses dois últimos grupos também houve aumento na expressão de *Ucp1* no BAT, enquanto a Rosiglitazona não alterou sua expressão em nenhum dos tecidos.

A UCP1 é uma proteína presente na membrana interna mitocondrial e tem como função a geração de calor ao dissipar energia do gradiente de prótons da cadeia transportadora de elétrons, caracterizando o processo de termogênese no BAT [127, 128]. No WAT, a expressão de *Ucp1* caracteriza o processo de *Browning*, o qual pode ser observado no tratamento com agonistas de PPAR γ [55], porém esse efeito não foi observado na administração de Rosiglitazona nesse trabalho. De forma mais relevante, o aumento na expressão desse gene no WAT está negativamente correlacionado aos níveis plasmáticos de insulina, glicose em jejum, triglicérides e expressão de leptina, e positivamente correlacionado aos níveis de adiponectina [129], resultados observados nesse trabalho nos animais *knockin* e com a administração da maior dose do ligante AM-879.

Ainda, a redução na expressão de *Ucp1* no WAT com 40mg/kg/dia de AM-879 pode estar relacionada ao aumento na expressão de leptina, uma vez que foi reportado que o tratamento com essa molécula afeta o tecido adiposo branco de forma UCP-1 dependente, reduzindo sua expressão no WAT [130]. No BAT, o aumento de *Ucp1* nos animais *knockin* e com a dose de 100mg/kg/dia do ligante AM-879 poderia indicar um aumento de termogênese e gasto energético [131], os quais não foram mensurados nesse trabalho.

Uma vez que já foi descrita a relação do AM-879 com a via do hormônio liberador de corticotropina (Crh), analisamos também dois genes relacionados a esse processo no hipotálamo: o próprio *Crh* e o neuropeptídeo Y (*Npy*), todos relacionados à produção de leptina, consumo de dieta e gasto energético [48, 51]. Observamos um aumento na expressão de *Crh* nos animais tratados com a dose de 40 mg/kg/dia de AM-879, condizente com o aumento na expressão de leptina, uma vez que a leptina ativa Crh, promovendo uma redução no consumo [51], a qual não foi observada em nossos dados. Nos animais *knockin* observamos o mesmo aumento na expressão de *Crh* e redução de *Npy*, porém sem aumento de *Lep* (Anexo 5.4). Um trabalho publicado em 2011 [132] mostrou que o *knockdown* do neuropeptídeo Y via RNAi leva a um aumento na expressão de *Ucp1* nos tecidos adiposo branco e marrom, os quais observamos nesse estudo, com aumento do gasto energético e melhora da resposta termogênica ao frio. Ainda, esse *knockdown* melhorou a homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina, sendo essa última vista no nosso trabalho.

Ainda com relação ao hipotálamo, observamos que a maior dose do AM-879 promoveu um aumento na expressão de *Npy*, o qual pode estar relacionado à redução nos níveis de leptina observados com esse tratamento, permitindo o aumento na expressão de *Npy* [51]. Já foi visto também que a via da insulina converge para uma *downregulation* do neuropeptídeo Y, sendo

que a redução nos níveis desse hormônio nesse grupo também permitem o aumento na expressão de *Npy* [133]. Entretanto, entretanto não observamos efeitos relacionados a esse aumento, uma vez que esse neuropeptídeo está envolvido no aumento da adipogênese, inibição de lipólise, aumento de consumo de dieta e redução na ativação de tecido adiposo marrom [133-135]. Por fim, vale mencionar que não observamos alterações significativas no hormônio corticosterona, o qual está relacionado à via do CRH, o que justifica a ausência de efeitos fisiológicos relacionados à via do estresse, apesar de alterações na expressão gênica.

Em resumo, apresentamos a Tabela 5 que mostra resumidamente os efeitos observados nos 4 grupos analisados nesse projeto: AM-879 40 e 100 mg/kg/dia, Rosiglitazona e linhagem *knockin*.

Tabela 5. Efeitos resumidos dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e tratados com AM-879 em ambas as doses, Rosiglitazona e linhagem *knockin* com veículo.

		AM-879 40mg/kg/dia	AM-879 100mg/kg/dia	<i>Knockin</i>	Rosiglitazona
	Peso corporal	mantém	mantém	mantém	aumenta
	Consumo alimentar	mantém	reduz	mantém	mantém
	Sensibilidade à insulina (KITT)	tendência à melhora	melhora	melhora	melhora
	Insulina circulante	reduz	reduz	reduz	reduz
	Adiponectina circulante	mantém	aumenta	aumenta	aumenta
Peso órgãos	Fígado/ BAT	reduz	reduz	reduz	mantém/aumenta
	WAT	mantém	mantém	aumenta	mantém
	Músculo, rim e coração	mantém	mantém	mantém	mantém
	Esteatose hepática	mantém	mantém	aumenta	aumenta
	Triglicérides hepático	reduz	reduz	reduz	mantém
	Área e perímetro adipócitos	leve aumento	leve aumento	grande aumento	grande redução
	Genes regulados pela fosforilação	mantém	altera	altera	mantém
	Genes via do CRH	aumenta	mantém	--	mantém
	<i>UCPI</i> WAT/BAT	diminui/mantém	aumenta	aumenta	mantém

6. CONCLUSÕES

Com relação à caracterização da linhagem *knockin*, observamos uma hiperglicemia e hipoinsulinemia, além de aumento no peso corporal imediatamente após o desmame. Ainda, após administração de dieta hiperlipídica por 16 semanas e tratamento com gelatina veículo por mais duas semanas, houve uma melhora da sensibilidade à insulina com aumento do KITT, redução dos níveis circulantes de insulina e aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina, além de aumento na esteatose hepática e redução dos níveis de triglicérides no fígado. Os animais dessa linhagem também possuem adipócitos maiores (hipertróficos), com alteração na expressão dos genes regulados pela fosforilação e de genes da via do PPAR γ .

Com relação ao não-agonista AM-879, observamos que seus efeitos dependem da dose utilizada, uma vez que já foi demonstrada sua atuação na via do PPAR γ e na via do hormônio liberador de corticotropina (CRH). Com a dose menor, a ação do ligante prevalece na via do CRH, alterando a expressão de leptina, assim como a expressão de *Crh* e *Npy*, com redução nos níveis plasmáticos de insulina. Já com a dose maior, sua ação é predominante na via do PPAR γ , melhorando a sensibilidade à insulina, reduzindo consumo de dieta e os níveis plasmáticos de insulina, além de alterar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, sem efeitos colaterais (Figura 43).

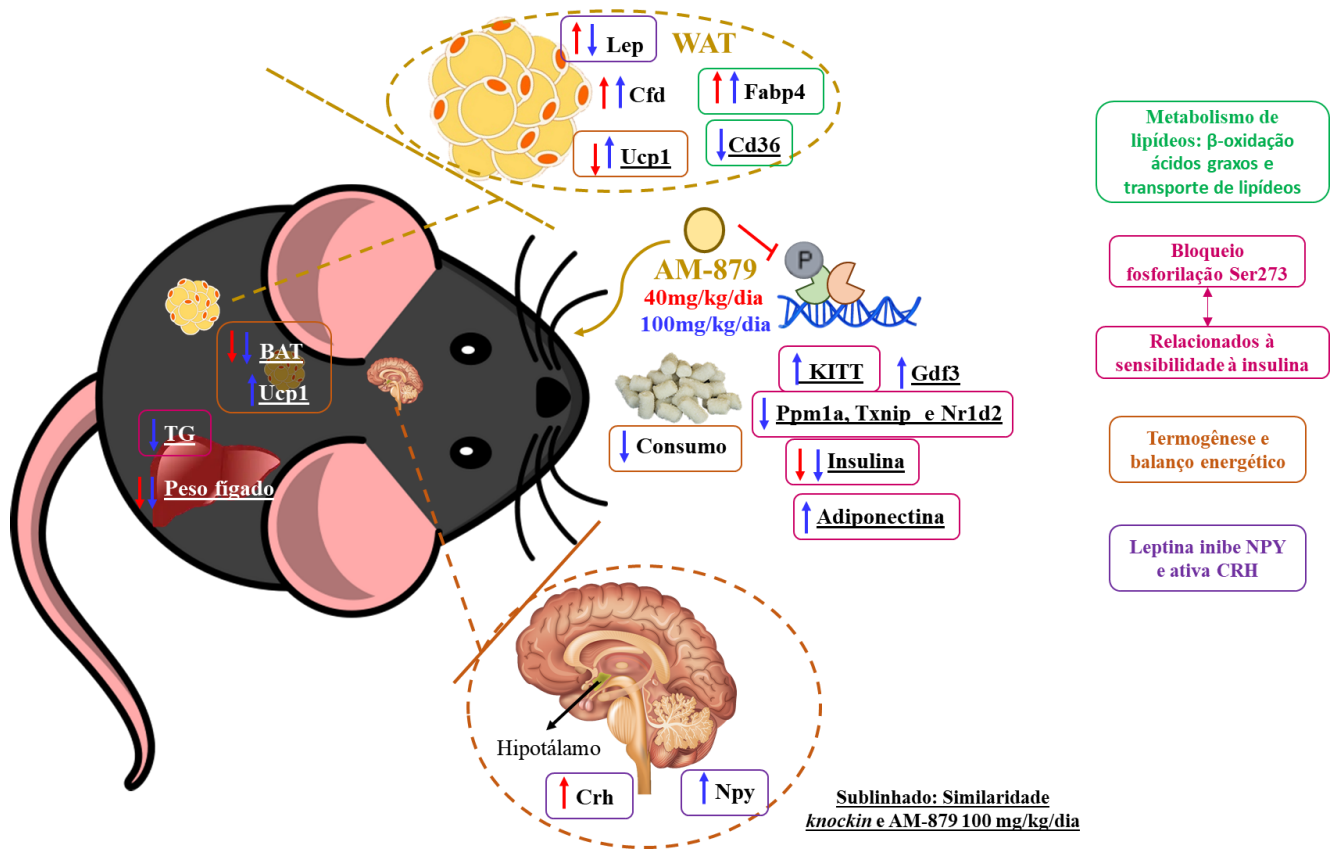


Figura 43. Esquema do mecanismo de ação do ligante AM-879 nas doses de 40mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, atuando tanto na via do PPAR γ através do bloqueio da fosforilação na Ser273 e, também, na via do hormônio liberador de corticotropina (Crh).

5. REFERÊNCIAS

1. Fischer, A., M.J.J.o.c.i. Smiesko, and modeling, *Ligand pathways in nuclear receptors*. 2019. **59**(7): p. 3100-3109.
2. Sever, R. and C.K.J.C.S.H.p.i.b. Glass, *Signaling by nuclear receptors*. 2013. **5**(3): p. a016709.
3. Jones, D., *Potential remains for PPAR-targeted drugs*. 2010, Nature Publishing Group.
4. Garcia-Vallvé, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and ligand choreography: Newcomers Take the Stage: Miniperspective*. *Journal of medicinal chemistry*, 2015. **58**(14): p. 5381-5394.
5. Burris, T.P., et al., *Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators*. 2013. **65**(2): p. 710-778.
6. Brunmeir, R. and F. Xu, *Functional regulation of PPARs through post-translational modifications*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(6): p. 1738.
7. Dreyer, C., et al., *Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 879-887.
8. Issemann, I. and S. Green, *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*. *Nature*, 1990. **347**(6294): p. 645.
9. Hihi, A., et al., *PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives*. 2002. **59**(5): p. 790-798.
10. Willson, T.M., et al., *The PPARs: from orphan receptors to drug discovery*. 2000. **43**(4): p. 527-550.
11. Dubois, V., et al., *Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis*. *The Journal of clinical investigation*, 2017. **127**(4): p. 1202-1214.
12. la Cour Poulsen, L., M. Siersbæk, and S. Mandrup. *PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2012. Elsevier.
13. P Menendez-Gutierrez, M., T. Roszer, and M. Ricote, *Biology and therapeutic applications of peroxisome proliferator-activated receptors*. *Current topics in medicinal chemistry*, 2012. **12**(6): p. 548-584.
14. Janani, C. and B.R. Kumari, *PPAR gamma gene—a review*. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2015. **9**(1): p. 46-50.
15. Daynes, R.A. and D.C. Jones, *Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2002. **2**(10): p. 748.
16. Sonoda, J., L. Pei, and R.M. Evans, *Nuclear receptors: decoding metabolic disease*. *FEBS letters*, 2008. **582**(1): p. 2-9.
17. Dias Pitangueira, J.C., et al., *Metabolic syndrome and associated factors in children and adolescents of a Brazilian municipality*. *Nutricion hospitalaria*, 2014.
18. Heymsfield, S.B. and T.A. Wadden, *Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **376**(3): p. 254-266.
19. Schnurr, T.M., et al., *Obesity, unfavourable lifestyle and genetic risk of type 2 diabetes: a case-cohort study*. 2020: p. 1-9.
20. Sohda, T., et al., *Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl] thiazolidine-2, 4-dione (ADD-3878) and its derivatives*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1982. **30**(10): p. 3580-3600.
21. Wang, S., E.J. Dougherty, and R.L. Danner, *PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics*. *Pharmacological research*, 2016. **111**: p. 76-85.
22. Choi, J.H., et al., *Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR [ggr] by Cdk5*. *Nature*, 2010. **466**(7305): p. 451-456.
23. Al-Muzafar, H., et al., *The role of pioglitazone in antioxidant, anti-inflammatory, and insulin sensitivity in a high fat-carbohydrate diet-induced rat model of insulin resistance*. 2021. **54**.
24. Kubota, N., et al., *Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and-independent pathways*. 2006. **281**(13): p. 8748-8755.

25. Minicucci, M.F. and L.A.M.J.A.B.d.C. Zornoff, *VEGFR-2: One of Pioglitazone's Signaling Pathways in the Heart*. 2018, SciELO Brasil. p. 170-171.
26. Marion-Letellier, R., G. Savoye, and S. Ghosh, *Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma*. European journal of pharmacology, 2016. **785**: p. 44-49.
27. Kim, T.-H., et al., *Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications*. Yonsei medical journal, 2013. **54**(3): p. 545-559.
28. Pirat, C., et al., *Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): development of modulators*. Journal of medicinal chemistry, 2012. **55**(9): p. 4027-4061.
29. Kroker, A.J. and J.B.J.P.r. Bruning, *Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism*. 2015. **2015**.
30. Choi, S.-S., J. Park, and J.H. Choi, *Revisiting PPAR γ as a target for the treatment of metabolic disorders*. BMB reports, 2014. **47**(11): p. 599.
31. Floyd, Z.E. and J.M.J.B.e.B.A.-M.B.o.D. Stephens, *Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPAR γ* . 2012. **1822**(7): p. 1090-1095.
32. Rangwala, S.M., et al., *Genetic modulation of PPAR γ phosphorylation regulates insulin sensitivity*. 2003. **5**(4): p. 657-663.
33. Banks, A.S., et al., *An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ* . Nature, 2015. **517**(7534): p. 391.
34. Wei, J., et al., *Suppl 1: Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis*. The open rheumatology journal, 2012. **6**: p. 103.
35. Zhou, W., et al., *1802-P: Nr1d1/Nr1d2 in POMC Neurons Regulates Circadian Eating Behaviors and Energy Expenditure*. 2019, Am Diabetes Assoc.
36. Chutkow, W.A., et al., *Deletion of the α -arrestin protein Txnip in mice promotes adiposity and adipogenesis while preserving insulin sensitivity*. 2010. **59**(6): p. 1424-1434.
37. Dias, M.M.G., et al., *PPAR γ S273 phosphorylation modifies the dynamics of coregulator proteins recruitment*. 2020. **11**.
38. Rangwala, S.M., et al., *Genetic modulation of PPAR γ phosphorylation regulates insulin sensitivity*. Developmental cell, 2003. **5**(4): p. 657-663.
39. Hall, J.A., et al., *Obesity-linked PPAR γ S273 phosphorylation promotes insulin resistance through Growth Differentiation Factor 3*. 2020.
40. Lehrke, M. and M.A. Lazar, *The many faces of PPAR γ* . Cell, 2005. **123**(6): p. 993-999.
41. Ahmadian, M., et al., *PPAR [gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. Nature medicine, 2013. **99**(5): p. 557-566.
42. Nagai, H., et al., *Development of a novel PPAR γ ligand screening system using pinpoint fluorescence-probed protein*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2011: p. 1012282344-1012282344.
43. Ma, J.J., et al., *Establishment of a cell-based drug screening model for identifying agonists of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012. **64**(5): p. 719-726.
44. Gao, D., et al., *In vitro screening and evaluation of 37 traditional Chinese medicines for their potential to activate peroxisome proliferator-activated receptors- γ* . Pharmacognosy magazine, 2016. **12**(46): p. 120.
45. da Silva, F.M., et al., *Structure-based identification of novel PPAR gamma ligands*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2013. **23**(21): p. 5795-5802.
46. Zorrilla, S., B. Garzón, and D. Pérez-Sala, *Selective binding of the fluorescent dye 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to peroxisome proliferator-activated receptor γ allows ligand identification and characterization*. Analytical biochemistry, 2010. **399**(1): p. 84-92.

47. Ribeiro Filho, H.V., et al., *Screening for PPAR Non-Agonist Ligands Followed by Characterization of a Hit, AM-879, with Additional No-Adipogenic and cdk5-Mediated Phosphorylation Inhibition Properties*. *Frontiers in endocrinology*, 2018. **9**: p. 11.
48. Bale, T.L. and W.W.J.A.R.P.T. Vale, *CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors*. 2004. **44**: p. 525-557.
49. Lowry, P., et al., *Nature of ligand affinity and dimerization of corticotrophin-releasing factor-binding protein may be detected by circular dichroism*. 1996. **16**(1): p. 39-44.
50. Billington, C., et al., *Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism*. 1994. **266**(6): p. R1765-R1770.
51. Jang, M., et al., *Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice*. 2000. **130**(11): p. 2813-2820.
52. Krahn, D.D., et al., *Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects*. 1988. **443**(1-2): p. 63-69.
53. Jang, M. and D.R.J.T.J.o.n. Romsos, *Neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone concentrations within specific hypothalamic regions of lean but not ob/ob mice respond to food-deprivation and refeeding*. 1998. **128**(12): p. 2520-2525.
54. Kohno, D., et al., *Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin*. 2003. **52**(4): p. 948-956.
55. Coelho, M.S., et al., *GQ-16, a TZD-derived partial PPAR γ agonist, induces the expression of thermogenesis-related genes in brown fat and visceral white fat and decreases visceral adiposity in obese and hyperglycemic mice*. *PLoS one*, 2016. **11**(5): p. e0154310.
56. Wang, H., et al., *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *cell*, 2013. **153**(4): p. 910-918.
57. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 819-823.
58. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. *Nature protocols*, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
59. Zhang, L., *Voluntary oral administration of drugs in mice*. *Protocol Exchange*, 2011. **10**.
60. Patarrão, R.S., W.W. Lutt, and M.P. Macedo, *Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity*. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 2014. **9**(1): p. 65-73.
61. Folch, J., M. Lees, and G.S.J.J.o.b.c. Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. 1957. **226**(1): p. 497-509.
62. Quintana, D.S. and D.R.J.B.p. Williams, *Bayesian alternatives for common null-hypothesis significance tests in psychiatry: a non-technical guide using JASP*. 2018. **18**(1): p. 1-8.
63. Shikano, S.J.S.P.S.R., *Hypothesis testing in the Bayesian framework*. 2019. **25**(3): p. 288-299.
64. Khim, K.W., et al., *PPM1A controls diabetic gene programming through directly dephosphorylating PPAR γ at Ser273*. 2020. **9**(2): p. 343.
65. Furuhashi, M., et al., *Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases*. 2014. **8**: p. CMC. S17067.
66. Love-Gregory, L., N.A.J.C.o.i.c.n. Abumrad, and m. care, *CD36 genetics and the metabolic complications of obesity*. 2011. **14**(6): p. 527.
67. Rangwala, S.M. and M.A.J.T.i.p.s. Lazar, *Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism*. 2004. **25**(6): p. 331-336.
68. Henry, R.R.J.E. and m.c.o.N. America, *Thiazolidinediones*. 1997. **26**(3): p. 553-573.
69. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)*. 1995. **270**(22): p. 12953-12956.
70. Camp, H.S.J.C.o.i.i.d., *Thiazolidinediones in diabetes: current status and future outlook*. 2003. **4**(4): p. 406-411.

71. Berger, J., et al., *Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice*. 1996. **137**(10): p. 4189-4195.
72. Jellinger, P.S.J.C.c., *Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance*. 2007. **8**: p. S30-S42.
73. Liu, W.-X., et al., *Voluntary exercise prevents colonic inflammation in high-fat diet-induced obese mice by up-regulating PPAR- γ activity*. 2015. **459**(3): p. 475-480.
74. Tanaka, T., et al., *Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor γ in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice*. 2005. **54**(11): p. 1490-1498.
75. Choi, K.-M., et al., *Xanthigen attenuates high-fat diet-induced obesity through down-regulation of PPAR γ and activation of the AMPK pathway*. 2014. **23**(3): p. 931-935.
76. Hajri, T., et al., *Epigenetic Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Mediates High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. 2021. **10**(6): p. 1355.
77. Zwamborn, R.A., et al., *Prolonged high-fat diet induces gradual and fat depot-specific DNA methylation changes in adult mice*. 2017. **7**(1): p. 1-9.
78. Dai, C.-L., et al., *Inhibition of protein synthesis alters protein degradation through activation of protein kinase B (AKT)*. 2013. **288**(33): p. 23875-23883.
79. Videira, N.B., et al., *PPAR Modulation Through Posttranslational Modification Control*, in *Nuclear Receptors: The Art and Science of Modulator Design and Discovery*, M.Z. Badr, Editor. 2021, Springer International Publishing: Cham. p. 537-611.
80. Holness, M.J., et al., *Adipocyte pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is associated with augmented PPAR γ upregulation in early-life programming of later obesity*. 2012. **2**: p. 32-36.
81. Gavrilova, O., et al., *Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass*. 2003. **278**(36): p. 34268-34276.
82. Festuccia, W.T., et al., *The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake*. 2009. **296**(5): p. R1327-R1335.
83. Cannon, B. and J.J.P.r. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. 2004.
84. Amato, A.A., et al., *GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(33): p. 28169-28179.
85. Chodavarapu, H., et al., *Rosiglitazone treatment of type 2 diabetic db/db mice attenuates urinary albumin and angiotensin converting enzyme 2 excretion*. 2013. **8**(4).
86. Prentki, M. and C.J.J.T.J.o.c.i. Nolan, *Islet β cell failure in type 2 diabetes*. 2006. **116**(7): p. 1802-1812.
87. Wilcox, G.J.C.b.r., *Insulin and insulin resistance*. 2005. **26**(2): p. 19.
88. Frankenberg, A.D.v., et al., *Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review*. 2017. **61**(6): p. 614-622.
89. Joseph, G.Y., et al., *The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects*. 2002. **51**(10): p. 2968-2974.
90. Kim, S.-H., et al., *MD001, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor α/γ Agonist, Improves Glucose and Lipid Metabolism*. 2019. **9**(1): p. 1-12.
91. Yang, S.J., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by rosiglitazone increases sirt6 expression and ameliorates hepatic steatosis in rats*. 2011. **6**(2): p. e17057.
92. Shen, Z., et al., *Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice*. 2010. **298**(3): p. G364-G374.
93. Gao, M., et al., *Dual outcomes of rosiglitazone treatment on fatty liver*. 2016. **18**(4): p. 1023-1031.

94. García-Ruiz, I., et al., *Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice*. 2007. **46**(2): p. 414-423.
95. Wang, S., et al., *Rosiglitazone improves insulin resistance mediated by 10, 12 conjugated linoleic acid in a male mouse model of metabolic syndrome*. 2017. **158**(9): p. 2848-2859.
96. Inoue, M., et al., *Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice*. 2005. **336**(1): p. 215-222.
97. Lee, Y.K., et al., *Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*. 2018. **2**(4): p. 209-215.
98. Browning, J.D. and J.D.J.T.J.o.c.i. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. 2004. **114**(2): p. 147-152.
99. Nassir, F., et al., *Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis*. 2015. **11**(3): p. 167.
100. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. 2001. **7**(8): p. 941-946.
101. Liu, L.-F., et al., *Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice*. 2007. **292**(6): p. G1671-G1682.
102. Mulder, P., et al., *Reduction of obesity-associated white adipose tissue inflammation by rosiglitazone is associated with reduced non-alcoholic fatty liver disease in LDLr-deficient mice*. 2016. **6**(1): p. 1-11.
103. Varga, T., et al., *Macrophage PPAR γ , a lipid activated transcription factor controls the growth factor GDF3 and skeletal muscle regeneration*. 2016. **45**(5): p. 1038-1051.
104. Hu, X., et al., *Brd4 modulates diet-induced obesity via PPAR γ -dependent Gdf3 expression in adipose tissue macrophages*. 2021. **6**(7).
105. Wang, W., et al., *GDF-3 is an adipogenic cytokine under high fat dietary condition*. 2004. **321**(4): p. 1024-1031.
106. Shen, J.J., et al., *Deficiency of growth differentiation factor 3 protects against diet-induced obesity by selectively acting on white adipose*. 2009. **23**(1): p. 113-123.
107. Liu, C., et al., *Identification of a novel selective agonist of PPAR γ with no promotion of adipogenesis and less inhibition of osteoblastogenesis*. 2015. **5**(1): p. 1-13.
108. Cadoudal, T., et al., *Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue*. 2008. **57**(9): p. 2272-2279.
109. Choi, J.H., et al., *Obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR γ ligands*. Nature, 2010. **466**(7305): p. 451.
110. Chen, S.-S., et al., *C/EBP β , when expressed from the C/ebp α gene locus, can functionally replace C/EBP α in liver but not in adipose tissue*. 2000. **20**(19): p. 7292-7299.
111. Lo, J.C., et al., *Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes*. 2014. **158**(1): p. 41-53.
112. Kintscher, U., R.E.J.A.j.o.p.-e. Law, and metabolism, *PPAR γ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle*. 2005. **288**(2): p. E287-E291.
113. Makowski, L. and G.k.S.J.T.J.o.n. Hotamisligil, *Fatty acid binding proteins—the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses*. 2004. **134**(9): p. 2464S-2468S.
114. Garin-Shkolnik, T., et al., *FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues*. 2014. **63**(3): p. 900-911.
115. Kim, S.W., et al., *Differential protein expression in white adipose tissue from obesity-prone and obesity-resistant mice in response to high fat diet and anti-obesity herbal medicines*. 2015. **35**(4): p. 1482-1498.
116. Moreno-Vedia, J., et al., *Unveiling the Role of the Fatty Acid Binding Protein 4 in the Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*. 2022. **10**(1): p. 197.
117. Queipo-Ortuño, M.I., et al., *FABP4 dynamics in obesity: discrepancies in adipose tissue and liver expression regarding circulating plasma levels*. 2012. **7**(11): p. e48605.
118. Pu, M., et al., *Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression*. 2019. **76**(3): p. 441-451.

119. Wu, Q. and A.A.J.M. Bazzini, *Systems to study codon effect on post-transcriptional regulation of gene expression*. 2018. **137**: p. 82-89.
120. Cai, L., et al., *Scavenger receptor CD36 expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity*. 2012. **7**(5): p. e36785.
121. Vroegrijk, I.O., et al., *CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis*. 2013. **21**(10): p. 2037-2045.
122. Yang, J., K.W. Park, and S.J.J.o.B.C. Cho, *Inhibition of the CD36 receptor reduces visceral fat accumulation and improves insulin resistance in obese mice carrying the BDNF-Val66Met variant*. 2018. **293**(34): p. 13338-13348.
123. Maréchal, L., et al., *The CD36-PPAR γ pathway in metabolic disorders*. 2018. **19**(5): p. 1529.
124. Gyamfi, J., et al., *Interaction between CD36 and FABP4 modulates adipocyte-induced fatty acid import and metabolism in breast cancer*. 2021. **7**(1): p. 1-18.
125. Mukherjee, A., et al., *Adipocyte-induced FABP4 expression in ovarian cancer cells promotes metastasis and mediates carboplatin resistance*. 2020. **80**(8): p. 1748-1761.
126. Liang, Y., et al., *CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells*. 2018. **7**(12): p. 1-14.
127. Ikeda, K. and T.J.F.i.E. Yamada, *UCP1 dependent and independent thermogenesis in brown and beige adipocytes*. 2020. **11**.
128. Chouchani, E.T., L. Kazak, and B.M.J.C.m. Spiegelman, *New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond*. 2019. **29**(1): p. 27-37.
129. Lim, J., et al., *Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers*. 2020. **44**(3): p. 697-706.
130. Commins, S.P., et al., *Leptin selectively reduces white adipose tissue in mice via a UCP1-dependent mechanism in brown adipose tissue*. 2001. **280**(2): p. E372-E377.
131. Galmozzi, A., et al., *ThermoMouse: an in vivo model to identify modulators of UCP1 expression in brown adipose tissue*. 2014. **9**(5): p. 1584-1593.
132. Chao, P.-T., et al., *Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity*. 2011. **13**(5): p. 573-583.
133. Huang, Y., et al., *Neuropeptide Y and Metabolism Syndrome: An Update on Perspectives of Clinical Therapeutic Intervention Strategies*. 2021. **9**: p. 1882.
134. Zhang, W., et al., *Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism*. 2014. **11**(1): p. 1-12.
135. Kos, K., et al., *Secretion of neuropeptide Y in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass*. 2007. **293**(5): p. E1335-E1340.

6.ANEXOS

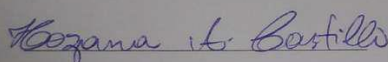


Comissão de Ética no uso de Animais CEUA/CNPEM

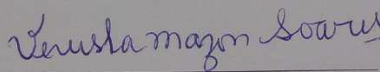
Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo para determinar a concentração de ligante AM-879 a ser administrado em camundongos**” (protocolo nº 58), sob responsabilidade de **Ana Carolina Migliorini Figueira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 26/11/2018.

Vigência do projeto	04/12/2018 a 01/10/2019
Espécie/linhagem	C57BI/6
Número de animais	42
Peso/idade	20g / 6 semanas
Sexo	42 machos
Origem	Biotério LNBio/CNPEM

Campinas, 04 de dezembro de 2018.



Hozana Andrade Castillo
Coordenadora CEUA/CNPEM



Veruska Mazon Soares
Bióloga Titular

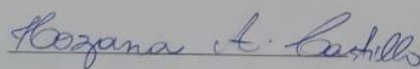


Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

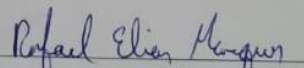
Certificamos que o projeto intitulado “**Estudos dos efeitos do não agonista de PPAR γ , o ligante AM-879, na sensibilidade à insulina e homeostase da glicose em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**” (protocolo n^o 72), sob responsabilidade de **Ana Carolina Migliorini Figueira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n^o 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n^o 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 13/11/2019.

Vigência do projeto	14/11/2019 a 31/12/2021
Espécie/linhagem	C57Bl/6
Número de animais	80
Peso/idade	20g / 5-6 semanas
Sexo	80 machos
Origem	Biotério LNBio/CNPEM

Campinas, 14 de novembro de 2019.



Hozana Andrade Castillo
Coordenadora CEUA/CNPEM



Rafael Elias Marques P. Silva
Vice-Coodenador CEUA/CNPEM




Comissão de Ética no uso de Animais

CEUA/CNPEM

Certificamos que o adendo ao projeto intitulado "Avaliação de um modelo de estudo em camundongos relacionado à sensibilização da insulina através da modulação da fosforilação do PPAR γ " (protocolo nº 80), sob responsabilidade de Ana Carolina Migliorini Figueira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 20/03/2020.

Vigência do projeto	maio/2020 a fevereiro/2022
Espécie/linhagem	Camundongo C57Bl/6J
Número de animais	40
Peso/idade	10g / 3 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério LNBio-CNPEM
Espécie/linhagem	Camundongo C57Bl/6J PPAR γ 273A
Número de animais	40
Peso/idade	10g / 3 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério LNBio-CNPEM

Campinas, 25 de março de 2020.



Hozana Andrade Castillo
Coordenadora CEUA/CNPEM



Veruska Mazon Soares
Bióloga Titular



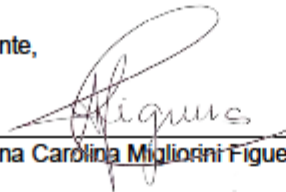
Campinas, 01 de Julho de 2019

Para Programa de pós-graduação

Ref. Declaração de Biossegurança

Prezado coordenador, declaramos para fins do programa de pós-graduação que **Maiara Ferreira Terra**, desenvolve seu projeto de pesquisa associado a sua tese, intitulada **"Construção e avaliação de um modelo de estudo em camundongos relacionado à sensibilização da insulina através da modulação da fosforilação do PPAR γ "**, sob orientação da profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira. O projeto utiliza organismos geneticamente modificados classe de risco 1, cumprindo os requisitos de biossegurança necessários, que integram o protocolo CIBio 2017-25, o qual foi **APROVADO** para execução no CNPEM.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira
Orientador

Dr. Marcio Chaim Bajgelman
Presidente da CIBio - CNPEM



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 10 de janeiro de 2022.

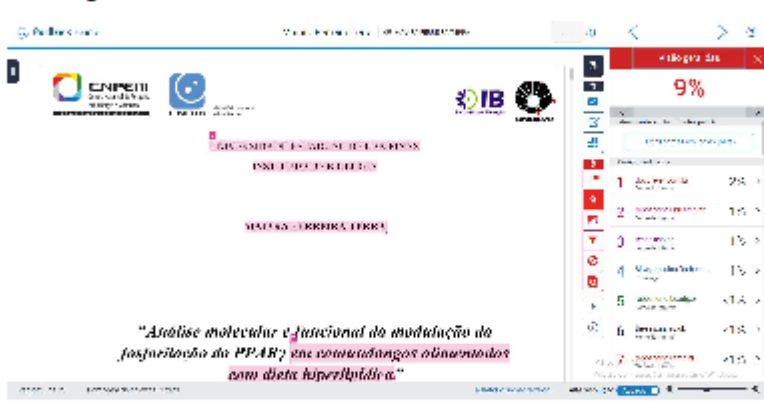
PARECER Nº 005 /2022

O documento "Análise molecular e funcional da moderação da fosforilação do PPAR γ em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica" passou pela checagem de similaridade do sistema Turnitin e o resultado apontou **9%** de semelhança. Dentre os apontamentos do sistema, há trechos inerentes ao discurso científico que, obrigatoriamente, se repetem entre as produções e devem ser desconsiderados para avaliação de originalidade no Programa de Pós-Graduação do IB-Unicamp.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Aluno (a): Maiara Ferreira Terra

Bibliotecária: Juliana Ravaschio Franco de Camargo

Itens	Apontamentos do Sistema Turnitin	Sugestão
1.	<p>A checagem da dissertação resultou em 9% de similaridade.</p> 	

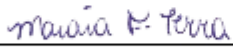



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Análise molecular e funcional da modulação da fosforilação do PPAR γ em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Maiara Ferreira Terra

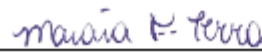
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Ana Carolina Migliorini Figueira

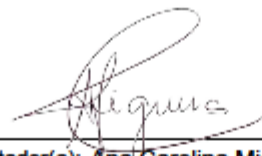
Data: 09 de Maio de 2022

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise molecular e funcional da modulação da fosforilação do PPAR γ em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 09 de Maio de 2022

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Maiara Ferreira Terra**
RG n.º 460368758

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Ana Carolina Migliorini Figueira**
RG n.º 25046098-1



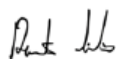
CERTIFICADO



Certificamos que

Maiara Ferreira Terra

participou do II GBMeeting: Encontro da Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, realizado no Centro de Convenções da Unicamp (Campinas-SP), no período de 27 a 31 de janeiro de 2020, com carga horária equivalente a 32h de atividade.



Professor Dr. Renato Vicentini dos Santos
Coordenador PPG-GBM



Professor Dr. Pedro Manoel M de M. Vieira
Coordenador GBMeeting



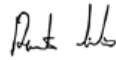
CERTIFICADO



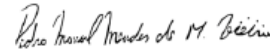
Certificamos que

Maiara Ferreira Terra

apresentou o trabalho intitulado "EFFECT OF A NOVEL NON-AGONIST OF PPAR γ ON GLUCOSE AND LIPID METABOLISM" na categoria Pôster – Área Genética Animal e Evolução, durante o II GBMeeting: Encontro da Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, realizado no Centro de Convenções - Unicamp (Campinas-SP), no período de 27 a 31 de janeiro de 2020.



Professor Dr. Renato Vicentini dos Santos
Coordenador PPG-GBM



Professor Dr. Pedro Manoel M de M. Vieira
Coordenador GBMeeting



KEYSTONE SYMPOSIA

February 4, 2021

Dear Maiara Terra,

This certifies that you attended the virtual live Keystone Symposia eSymposia meeting Diabetes: Many Faces of the Disease | EK18 from February 1-3, 2021.

Thank you for your participation.

Sincerely,



Deborah L. Johnson, PhD
President and Chief Executive Officer

KEYSTONE SYMPOSIA



February 4, 2021

Dear Maiara Terra,

This certifies that you attended the virtual live Keystone Symposia eSymposia meeting Obesity:
From Cell to Patient | EK17 from February 1-3, 2021.

Thank you for your participation.

Sincerely,







Deborah L. Johnson, PhD
President and Chief Executive Officer



Review

Multifactorial Basis and Therapeutic Strategies in Metabolism-Related Diseases

João V. S. Guerra^{1,2,†} , Marieli M. G. Dias^{1,3,†} , Anna J. V. C. Brillhante^{3,4}, Maiara F. Terra^{1,3},
Marta García-Arévalo^{1,4}  and Ana Carolina M. Figueira^{1,4} 

- ¹ Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Brazilian Biosciences National Laboratory (LNbio), Polo II de Alta Tecnologia—R. Giuseppe Máximo Solfaro, Campinas 13083-100, Brazil; joao.guerra@lnbio.cnpeem.br (J.V.S.G.); marieli.dias@lnbio.cnpeem.br (M.M.G.D.); maiara.terra@lnbio.cnpeem.br (M.F.T.)
 - ² Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas 13083-970, Brazil
 - ³ Graduate Program in Functional and Molecular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), Campinas 13083-970, Brazil; anna.brilhante@lnbr.cnpeem.br
 - ⁴ Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Brazilian Biorenewables National Laboratory (LNBR), Polo II de Alta Tecnologia—R. Giuseppe Máximo Solfaro, Campinas 13083-100, Brazil
- * Correspondence: marta.provencio@lnbio.cnem.br or mgarciaarevalo@hotmail.com (M.G.-A.); ana.figueira@lnbio.cnpeem.br (A.C.M.F.)
- † Both authors contributed equally to this work.



Citation: Guerra, J.V.S.; Dias, M.M.G.; Brillhante, A.J.V.C.; Terra, M.F.; García-Arévalo, M.; Figueira, A.C.M. Multifactorial Basis and Therapeutic Strategies in Metabolism-Related Diseases. *Nutrients* **2021**, *13*, 2830. <https://doi.org/10.3390/nu13082830>

Academic Editor: Sebastiano Banni

Received: 28 June 2021

Accepted: 11 August 2021

Published: 18 August 2021

Abstract: Throughout the 20th and 21st centuries, the incidence of non-communicable diseases (NCDs), also known as chronic diseases, has been increasing worldwide. Changes in dietary and physical activity patterns, along with genetic conditions, are the main factors that modulate the metabolism of individuals, leading to the development of NCDs. Obesity, diabetes, metabolic associated fatty liver disease (MAFLD), and cardiovascular diseases (CVDs) are classified in this group of chronic diseases. Therefore, understanding the underlying molecular mechanisms of these diseases leads us to develop more accurate and effective treatments to reduce or mitigate their prevalence in the population. Given the global relevance of NCDs and ongoing research progress, this article reviews the current understanding about NCDs and their related risk factors, with a focus on obesity, diabetes, MAFLD, and CVDs, summarizing the knowledge about their pathophysiology and highlighting the currently available and emerging therapeutic strategies, especially pharmacological interventions. All of these diseases play an important role in the contamination by the SARS-CoV-2 virus, as well as in the progression and severity of the symptoms of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). Therefore, we briefly explore the relationship between NCDs and COVID-19.


Keywords: NCDs; obesity; diabetes; MAFLD; cardiovascular diseases; metabolism



[Nuclear Receptors](#) pp 537-611 | [Cite as](#)

PPAR Modulation Through Posttranslational Modification Control

Authors [Authors and affiliations](#)

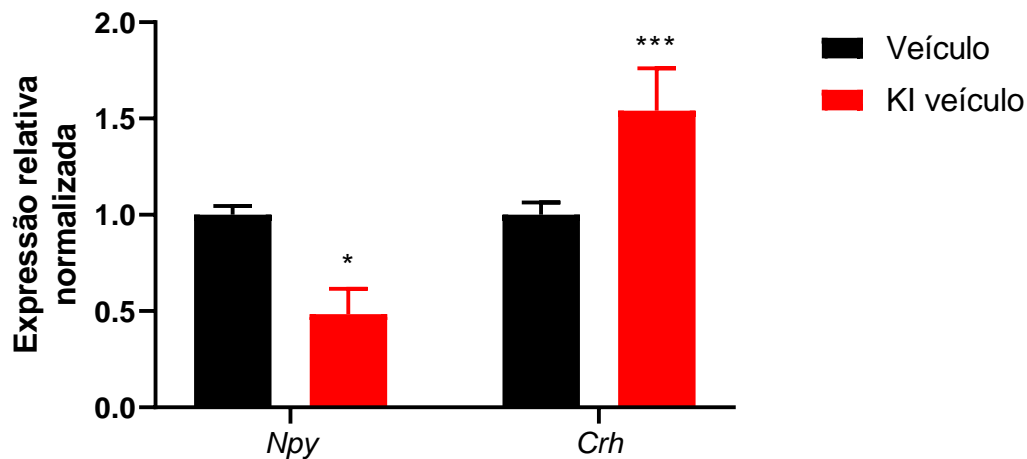
Natália B. Videira, Marieli M. G. Dias, Maiara F. Terra, Vinícius M. de Oliveira, Marta García-Arévalo, Thayná M. Avelino, Felipe R. Torres, Fernanda A. H. Batista, Ana Carolina M. Figueira 

Chapter

First Online: 29 September 2021

2

Downloads



```

"@File(label = "Input image:", style = "file") imagefile
open(imagefile);
filename=getTitle();
print(filename);
directory=File.directory;
print(directory);
StrInd1=indexOf(filename, ".tif");
ShortFileName=substring(filename,0, StrInd1);
run("8-bit");
run("Duplicate...", " ");
run("Non-local Means Denoising", "sigma=4 smoothing_factor=1");
setAutoThreshold("Default");
beep();
run("Threshold...");
setThreshold(176, 255);
setOption("BlackBackground", false);
waitForUser("Do something, then click OK.");
run("Convert to Mask");
run("Morphological Filters", "operation=Opening element=Disk radius=3");
run("Fill Holes (Binary/Gray)");
run("Distance Transform Watershed", "distances=[Quasi-Euclidean (1,1.41)] output=[32
bits] normalize dynamic=10 connectivity=4");
run("3-3-2 RGB");
run("Kill Borders");
run("3-3-2 RGB");
name=getTitle();
  
```

```
selectWindow(name);  
saveAs("Tiff", directory+name+".tif");  
print("Saving final image... ");  
run("Analyze Regions", "area perimeter circularity convexity");  
print("Calculating...");  
selectWindow(name+"-Morphometry");  
saveAs("Results", directory+ShortFileName+".csv")"
```