



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

KARINA MOURA DE MELO

**EFEITO DA MISTURA DE TRITERPENOS ALFA E BETA-AMIRINA,
ISOLADA DE *Protium heptaphyllum*, SOBRE A ADIPOGÊNESE *IN VITRO***

FORTALEZA

2017

KARINA MOURA DE MELO

EFEITO DA MISTURA DE TRITERPENOS ALFA E BETA-AMIRINA, ISOLADA DE
Protium heptaphyllum, SOBRE A ADIPOGÊNESE *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
do Departamento de Fisiologia e Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Flávia Almeida Santos.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M485e Melo, Karina Moura de.

Efeito da mistura de triterpenos alfa e beta-amirina, isolada de *Protium heptaphyllum*, sobre a adipogênese in vitro. / Karina Moura de Melo. – 2017.
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.

1. Adipócitos. 2. Obesidade. 3. 3T3-L1. 4. Produtos Naturais. I. Título.

CDD 615.1

KARINA MOURA DE MELO

EFEITO DA MISTURA DE TRITERPENOS ALFA E BETA-AMIRINA, ISOLADA DE
Protium heptaphyllum, SOBRE A ADIPOGÊNESE *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
do Departamento de Fisiologia e Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Almeida Santos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Flávia Almeida Santos (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dr^a Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo
(Centro Universitário INTA)

A Deus, esperança e alegria da minha vida.

Aos meus pais, que são a minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar os meus passos como um Amigo e encher os meus dias de verdadeira alegria, esperança e sentido!

Aos meus pais Daniel Melo e Maria das Dores, pela inspiração que são para mim e pela confiança nas minhas escolhas. As minhas conquistas também são de vocês! Agradeço também à minha irmã Larissa, pela sua presença alegre em nosso meio.

À professora Flávia Almeida, pela orientação neste trabalho. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e por todas as oportunidades de crescimento que tive no Laboratório de Produtos Naturais (LPN).

Aos professores da banca de qualificação e defesa, pelo precioso tempo e estudo dedicados para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do LPN. Sou imensamente grata pela companhia, pelos conselhos e partilhas nos momentos difíceis e nos alegres. E quanta alegria eu pude partilhar com vocês! Muito obrigada à Aguinéa Rocha, Ana Flávia Seraine, Ana Luíza Quinderé, Amanda Braga, Anastácia de Araújo, Diana Carvalho, Franciele Lunardi, Gabrielle de Paula, Greyce Luri, Milena Braga, Rose Anny, Tuelly Bandeira, ao Iury Nunes e ao Bruno Ripardo por tudo que também aprendi com vocês e pela amizade!

Às secretárias do departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço a todos os amigos e familiares, que mesmo nas minhas ausências continuam me acompanhando e se alegrando comigo. Agradeço muito especialmente a todos os amigos e irmãos da Comunidade Católica Shalom, pela sua companhia cotidiana e por me ensinarem a andar por esta terra com a alegria que vem de Deus.

À Universidade Federal do Ceará, quase uma “segunda casa” para mim, por todo o crescimento a mim proporcionado através de todos os professores do Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Minha admiração e respeito sempre.

Agradeço também ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste projeto e, assim, o meu crescimento profissional.

“Nunca perca de vista o seu ponto de partida”
(Santa Clara de Assis).

RESUMO

EFEITO DA MISTURA DE TRITERPENOS ALFA E BETA-AMIRINA, ISOLADA DE *Protium heptaphyllum*, SOBRE A ADIPOGÊNESE *IN VITRO*

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde. Esta condição está associada a diversas comorbidades, tais como *diabetes mellitus* tipo 2, problemas cardiovasculares, dislipidemias e câncer. A epidemia global da obesidade tem levado a diversos estudos sobre a sua fisiologia e à busca de novos tratamentos para esta doença. A linhagem celular fibroblástica 3T3-L1 é bastante utilizada para o estudo da diferenciação dos adipócitos *in vitro*, por constituir uma cultura de células estável e que se assemelha ao próprio tecido adiposo. Estudos com esta linhagem mostraram que diversos triterpenos possuem capacidade de inibir a diferenciação destas células, tais como o ácido ursólico e o ácido oleanólico. A mistura de triterpenos α,β -amirina é o principal constituinte da resina de *Protium heptaphyllum* (almecegueira). Assim como a resina de *P. heptaphyllum*, a mistura de α,β -amirina mostrou ação antiobesidade em camundongos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de α,β -amirina sobre a adipogênese das células 3T3-L1, por meio de coloração com *Oil Red O* e análise da expressão protéica (*Western Blot*) e gênica (qPCR) de importantes fatores de transcrição envolvidos neste processo. O ensaio do MTT mostrou que a α,β -amirina não causa redução da viabilidade celular nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre as células indiferenciadas; contudo, causa redução na viabilidade em 61,5% e 87% nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já sobre as células diferenciadas, as concentrações de 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ causaram redução na viabilidade celular em 21,9; 83,2 e 94,7%, respectivamente. Os resultados de *Oil Red O* mostram que a α,β -amirina nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 34, 44, 68 e 75%, respectivamente, o acúmulo de lipídeo nas células 3T3-L1 quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). As concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ foram escolhidas para os demais experimentos. As concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de α,β -amirina reduziram significativamente ($p < 0,05$) a expressão protéica de PPAR γ em 54 e 54,8%, respectivamente. As concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziram ($p < 0,05$) a expressão proteica de C/EBP α em 50,9; 50,1 e 62%, respectivamente, e a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 41,1% a expressão de SREBP-1. A α,β -amirina não modifica a expressão proteica de C/EBP β e não participa da fosforilação de AMPK α em nenhuma das concentrações testadas. A α,β -amirina nas concentrações 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduz significativamente ($p < 0,05$) a expressão gênica

de PPAR γ 2 em 1,7, 1,3 e 1,9 vezes, respectivamente. A expressão gênica de C/EBP α foi reduzida ($p < 0,05$) em 1,9; 2,1 e 7,3 vezes nas concentrações testadas e não houve alteração na expressão gênica de C/EBP β e C/EBP δ . Assim, a α,β -amirina reduz a diferenciação de células 3T3-L1 regulando negativamente a expressão de fatores de transcrição chaves da adipogênese. Através destes resultados, essa mistura de triterpenos torna-se uma possível candidata para o desenvolvimento de novas substâncias para o controle da adipogênese.

Palavras-chave: Adipócitos. Obesidade. 3T3-L1. Produtos Naturais.

ABSTRACT

EFFECT OF THE MIXTURE OF TRITERPENES ALPHA AND BETA- AMYRIN ISOLATED FROM *Protium heptaphyllum* ON ADIPOGENESIS *IN VITRO*

The obesity is defined by World Health Organization as the abnormal and excessive accumulation of body fat, which causes health damage. This condition is associated with several comorbidities, such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, dyslipidemias and cancer. The global epidemic of obesity has led to several studies on its physiology and the search for new treatments for this disease. The 3T3-L1 fibroblast cell line is widely used for the study of adipocyte differentiation *in vitro*, since it is a stable cell culture that resembles adipose tissue itself. Studies with this lineage have shown that several triterpenes could inhibit the differentiation of these cells, such as ursolic acid and oleanolic acid. The mixture of α,β -amyrin triterpenes is the main constituent from resin of *Protium heptaphyllum* ("almecegueira"). Like *P. heptaphyllum* resin, the α,β -amyrin mixture showed antiobesity action in mice. The aim of this work was to evaluate the effect of α,β -amyrin on the adipogenesis of 3T3-L1 cells by staining with Oil Red O and analysis of protein expression (Western Blot) and gene expression (qPCR) of important transcription factors involved in this process. MTT assay showed that α,β -amyrin didn't cause cell viability reduction at concentrations of 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ on undifferentiated cells; however, it causes viability reduction in 61.5% and 87% in concentrations of 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$, respectively. On differentiated cells, concentrations of 100, 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ caused a reduction in cell viability in 21.9; 83.2 and 94.7%, respectively. Results of Oil Red O show that α,β -amyrin at concentrations of 6.25; 12.5; 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ reduced the accumulation of lipid in 3T3-L1 cells in 34, 44, 68 and 75%, respectively, when compared to the control group ($p < 0.05$). Concentrations of 12.5; 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ were chosen for the other experiments. Concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ α,β -amyrin significantly reduced ($p < 0.05$) the protein expression of PPAR γ in 54 and 54.8%, respectively. Concentrations of 12.5; 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ reduced ($p < 0.05$) the protein expression of C/EBP α in 50.9; 50.1 and 62%, respectively, and the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ reduced the expression of SREBP-1 in 41.1%. The α,β -amyrin doesn't modify C/EBP β protein expression and it doesn't participate in AMPK α phosphorylation at any of the concentrations tested. The α,β -amyrin at concentrations 12.5; 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ significantly reduced ($p < 0.05$) the PPAR γ 2 gene expression by 1.7, 1.3 and 1.9-fold, respectively. Gene expression of C/EBP α was reduced ($p < 0.05$) in 1.9; 2.1 and 7.3-fold at the concentrations tested and there was no change in the C/EBP β and C/EBP δ gene

expression. Thus, α,β -amyrin reduces the differentiation of 3T3-L1 cells by down-regulation expression of key transcription factors of adipogenesis. Through these results, this mixture of triterpenes becomes a possible candidate for the development of new substances for the control of adipogenesis.

Key words: Adipocytes. Obesity. 3T3-L1. Natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1.	Classificação internacional de sobrepeso e obesidade de acordo com o IMC para adultos.....	19
Figura 1.	Processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.....	24
Figura 2.	Cascata transcricional da adipogênese: esquema simplificado.....	26
Figura 3.	Frutos de <i>Protium heptaphyllum</i> (Burseraceae).....	36
Figura 4.	Resina da casca de <i>Protium heptaphyllum</i> (Burseraceae).....	36
Figura 5.	Estrutura molecular dos triterpenos α -amirina (1) e β -amirina (2).....	37
Fluxograma 1.	Metodologia de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.....	46
Tabela 2.	Sequência gênica e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> utilizados.....	53
Gráfico 1.	Efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade de células 3T3-L1 indiferenciadas.....	54
Gráfico 2.	Efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade de células 3T3-L1 diferenciadas.....	55
Figura 6.	Efeito da α,β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias.....	56
Figura 7.	Efeito da α,β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias e submetidas à coloração com <i>Oil Red O</i>	57
Gráfico 3.	Efeito da α,β -amirina sobre os níveis de lipídeos corados por <i>Oil Red O</i> em células 3T3-L1.....	58
Figura 8.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína C/EBP β após 2 dias de diferenciação das células 3T3-L1.....	60
Figura 9.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão das proteínas C/EBP α e PPAR γ após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.....	61
Figura 10.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína SREBP-1 após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.....	62
Figura 11.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína AMPK α e da sua forma fosforilada após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.....	63

Figura 12.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão relativa dos genes C/EBP β e C/EBP δ em células 3T3-L1 diferenciadas por 2 dias.....	65
Figura 13.	Efeito da α,β -amirina sobre a expressão relativa dos genes C/EBP α e PPAR γ 2 em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-coenzima A carboxilase
ADD	Fator 1 de diferenciação e determinação do adipócito
AGPAT2	<i>sn</i> -1-acilglicerol-3-fosfato acetiltransferase 2
AICAR	<i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside</i>
AI	Índice aterogênico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
aP2	Proteína adipocítica 2
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
C/EBPs	Proteínas ligantes ao amplificador CAAT
CRE	Elemento de resposta ao AMPc
CREB	Proteína de ligação ao CRE
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FABP4	Proteína de ligação a ácido graxo 4
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GSH	Glutathione
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 β
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina -1
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
KLF	Fator tipo Krupel
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos -1

MPO	Mieloperoxidase
Myf5	Fator regulatório miogênico 5
NBCS	Soro de bezerro recém nascido
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
SCAP	Proteína ativada pela clivagem de SREBP
SFB	Soro fetal bovino
SREBP-1	Proteína 1 ligadora do elemento regulado por esteróis
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBS	Tampão Tris salina
TBST	Tampão Tris-salina com 1% de <i>Tween</i> 20.
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transitório 1
UCP1	Proteína desacopladora 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Obesidade.....	18
1.2 O tecido adiposo.....	20
1.3 Adipogênese.....	22
1.4 Tratamentos disponíveis para a obesidade.....	29
1.5 Produtos Naturais e obesidade.....	33
1.6 <i>Protium heptaphyllum</i> e α,β -amirina.....	35
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Reagentes utilizados.....	43
4.2 Metodologia experimental.....	44
4.2.1 Obtenção da mistura de triterpenos α,β -amirina.....	44
4.2.2 Cultura de células.....	44
4.2.3 Indução da adipogênese das células 3T3-L1.....	45
4.2.4 Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT.....	46
4.2.5 Avaliação da inibição do processo de diferenciação pela α,β -amirina através da coloração com <i>Oil Red O</i>	47
4.2.6 <i>Western Blot</i>	48
4.2.7 Expressão do RNAm de C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ 2 e C/EBP α pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativa).....	51
4.2.8 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT.....	54
5.2 Análise do efeito da α,β -amirina sobre o processo de diferenciação adipocitária através da coloração com <i>Oil Red O</i>	55
5.3 Análise do efeito da α,β -amirina sobre a expressão proteica de importantes fatores de transcrição da adipogênese em células 3T3-L1.....	59
5.4 Efeito da α,β -amirina na expressão relativa dos genes C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ 2 e	

C/EBP α	64
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE – SOLUÇÕES	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é um dos problemas de saúde pública mais graves do século XXI, afetando todos os países em graus variados. Isso se deve ao aumento no consumo de alimentos ricos em gordura, ao sedentarismo e, até mesmo, à crescente urbanização. As mudanças sociais e ambientais associadas a esta urbanização, bem como à falta de políticas públicas que invistam mais na saúde, na agricultura, no transporte e na educação são fatores que contribuem para o número elevado de obesos (OMS, 2016).

A obesidade é um importante fator de risco para doenças crônicas, como problemas cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia, hiperglicemia, diabetes tipo 2, alguns tipos de câncer (por exemplo, o câncer de colo, de mama e de próstata) e alterações musculoesqueléticas (ADABAG *et al.*, 2015; HALAMA *et al.*, 2016). As doenças neurodegenerativas e as desordens respiratórias associadas contribuem para as altas taxas de morbidade e mortalidade (CAO, 2014). Todos estes fatores levam a um aumento nos gastos com saúde e uma redução na expectativa de vida (HARMS; SEALE, 2013).

A compreensão da definição da obesidade a partir do índice de massa corporal (IMC) aliado ao quadro clínico é muito importante para a adoção de medidas que ajudem na redução desta doença. O IMC trata-se da medida mais utilizada na pesquisa clínica e populacional da obesidade e é calculado pela razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros (kg/m^2), sendo esta a medida utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na definição da obesidade (Tabela 1), embora a medida da circunferência da cintura também seja relatada como um fator importante na atualidade (ARROYO-JOHNSON; MINCEY, 2016).

Estima-se que cerca de 1,9 bilhões de adultos com idade a partir de 18 anos estavam com sobrepeso (39% da população com essa faixa etária) e 650 milhões estavam obesos no ano de 2016 (13% da população com essa faixa etária). Neste mesmo ano, mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam com sobrepeso ou com obesidade (OMS, 2016). Uma metanálise realizada a partir de 16 estudos independentes realizados nos Estados Unidos da América e na Europa (totalizando 18 países) ao longo de 3 décadas mostrou que o aumento da obesidade na população e a sua intrínseca relação com o diabetes e com doenças cardiovasculares graves tornam vitais o estabelecimento de diretrizes clínicas para um bom acompanhamento e tratamento dos

pacientes (KIVIMÄKI *et al.*, 2017).

Tabela 1. Classificação internacional de sobrepeso e obesidade de acordo com o IMC para adultos.

Classificação	IMC (kg/m²) – principais pontos de corte
Baixo peso	<18,5
Normal ou eutrófico	18,5 - 24,99
Pré-obeso	25,0 - 29,99
Obeso – classe I	30,0 - 34,99
Obeso – classe II	35,0 - 39,99
Obeso – classe III	≥ 40,0

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2016.

A complexidade do perfil nutricional no Brasil revela a importância da promoção da saúde, prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, nas quais se destaca a obesidade, que vem crescendo de um modo importante nos últimos 30 anos (BRASIL, 2014a). As doenças crônicas relacionadas com a obesidade (hipertensão, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares) são responsáveis por 72% dos óbitos no Brasil (BRASIL, 2014b).

A pesquisa Vigitel 2016 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), realizada pelo Ministério da Saúde, mostrou que o excesso de peso atinge 53,8% da população brasileira (maiores de 18 anos e residentes nas capitais e Distrito Federal) e a obesidade atinge 18,9%. Entre as mulheres, o percentual de excesso de peso foi de 50,5% e de obesidade, 19,6%. Já entre os homens, o percentual de excesso de peso foi de 57,7% e o de obesidade, 18,1% (BRASIL, 2016).

O maior percentual de adultos (maiores de 18 anos) com excesso de peso foi observado na capital Rio Branco (60,6%), enquanto que a menor frequência foi observada em Palmas (47,7%). A maior porcentagem de adultos obesos também foi observada na cidade de Rio Branco (23,8%), enquanto que Florianópolis foi a capital que apresentou a menor porcentagem (14,5%) de pacientes obesos. Na cidade de Fortaleza, a pesquisa mostrou que a obesidade atinge 20% da população adulta, enquanto que o excesso de peso atinge 56,5% (BRASIL, 2016).

1.2 O tecido adiposo

Nos mamíferos, o tecido adiposo costuma ser classificado de acordo com a sua aparência morfológica em tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo bege. Cada um tem suas especificidades quanto à composição celular, localização, vias para o controle da homeostase, bem como à capacidade metabólica e endócrina, possuindo assim diferentes funções (LANTHIER; LECLERCQ, 2014).

Embora sua função primária seja o estoque de energia, o TAB também funciona como um órgão endócrino, visto que secreta hormônios e citocinas, tais como leptina e adiponectina, envolvidas na regulação da alimentação e do metabolismo (SANCHEZ-GURMACHES; GUERTIN, 2014). Diversas outras adipocinas secretadas pelo tecido adiposo já foram identificadas e estas exercem um importante papel na homeostase sistêmica da glicose e dos lipídeos, além de mediar a relação do tecido adiposo com outros órgãos e tecidos, como o músculo, fígado, pâncreas e até mesmo o sistema nervoso central (CAO, 2014).

Os adipócitos do TAB estão envolvidos no armazenamento de energia na forma de triglicerídeos e apresentam uma grande gotícula de lipídeo que ocupa boa parte do espaço da célula e apenas uma fina camada de citoplasma a circunda com a presença de poucas mitocôndrias (morfologia unilocular). Em momentos de escassez de nutrientes, as células liberam ácidos graxos para que haja produção de energia. Como as células de gordura são capazes de se expandir rapidamente em quantidade e tamanho, o tecido adiposo de indivíduos com alto índice de massa corporal representa o segundo maior órgão do corpo, atrás apenas da pele (MUELLER, 2014).

Disfunções nas adipocinas constituem um componente crítico para o desenvolvimento de doenças metabólicas relacionadas com a obesidade. O fator de necrose tumoral α (TNF- α) proveniente dos adipócitos está envolvido no que hoje é conhecido como “inflamação metabólica”. Outras citocinas e quimiocinas, tais como interleucina 6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos -1 (MCP-1), também são produzidas no tecido adiposo devido à infiltração de macrófagos, o que mostra a sua estreita relação com o sistema imune (CAO, 2014). Também é relatado que o acúmulo de gordura visceral (determinada pela alta relação cintura/quadril) está relacionado com doenças metabólicas, como resistência insulínica, dislipidemia, esteatose hepática, aterosclerose e outras, enquanto que o acúmulo de TAB subcutâneo está relacionado com a melhora da sensibilidade à insulina e a mais baixos riscos de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (SANCHEZ-GURMACHES; GUERTIN, 2014).

Enquanto o TAB estoca energia na forma de triglicerídeos, o tecido adiposo marrom (TAM) dissipa energia na forma de calor. Por meio da lipólise, esse tecido combate a hipotermia e a obesidade (LUO; LIU, 2016). Os adipócitos marrons possuem morfologia multilocular, ou seja, seu citoplasma contém inúmeras gotículas de lipídeo (GIRALT; VILLAROYA, 2013).

Tanto em camundongos quanto em humanos, a exposição a temperaturas baixas moderadas estimula o TAM a gerar calor para proteger a temperatura corporal, por meio da proteína desacopladora 1 (*Uncoupling Protein 1*, UCP1), expressa nas mitocôndrias presentes no citoplasma dos adipócitos marrons. Esta proteína é responsável pela capacidade termogênica do TAM (GIRALT; VILLAROYA, 2013). Uma vez ativada, a UCP-1 permite a fosforilação oxidativa sem produção de ATP, tendo o calor como o principal produto desta via. A alta vascularização deste tecido permite a transmissão do calor gerado para o restante do corpo (FRANK; PALMER; CLEGG, 2017).

Além da exposição crônica ao frio, outro fator que ativa a expressão de UCP-1 no tecido adiposo é a prática de exercícios físicos. Outras condições também podem levar à regulação de fatores de transcrição em pré-adipócitos e adipócitos e à sinalização através de hormônios e de outras moléculas (LUDWIG; ROCHA; MORI, 2018).

O TAM foi primeiramente detectado em bebês humanos, onde é encontrado mais especificamente nas regiões interescapular e perirrenal, mas estes depósitos desaparecem gradualmente com o aumento da idade. Em adultos, estudos com tomografia por emissão de pósitrons (PET) combinados com tomografia computadorizada mostraram a presença desse tecido nas regiões cervical, supraclavicular, paravertebral e axilar (KIM; PLUTZKY, 2016).

Nos humanos, a massa e a atividade do TAM variam de acordo com a idade e o sexo. Estudos mostram que uma maior prevalência desse tecido em mulheres adultas em comparação com homens. Outros dados mostram uma relação inversa entre o TAM e a “obesidade central” (adiposidade visceral medida pela circunferência da cintura), bem como sua correlação com a deposição de gordura subcutânea. Entre os benefícios metabólicos relatados, tem-se que este tecido exerce um importante papel na homeostase energética e sua maior atividade e quantidade estão associadas com melhorias na homeostase da glicose e da sensibilidade à insulina (FRANK; PALMER; CLEGG, 2017).

A presença de adipócitos expressando UCP-1 e, portanto, capacidade termogênica pode também ocorrer no tecido adiposo branco em resposta a diversos estímulos. Estes adipócitos têm sido chamados de adipócitos “beges” e, embora possuam características em comum com os adipócitos marrons (como gotas de lipídeo multiloculares e elevada

quantidade de mitocôndrias), também possuem características distintas, não podendo ser consideradas do mesmo tipo celular (HARMS; SEALE, 2013). Assim, a compreensão da atividade do TAM e da sua capacidade de termogênese, bem como do tecido adiposo bege, é importante para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento da obesidade baseado no aumento de gasto energético (LUDWIG; ROCHA; MORI, 2018).

1.3 Adipogênese

Os animais possuem um sistema altamente integrado para a regulação do estoque e do gasto energético. Esse sistema é regulado a nível celular e sistêmico através da ação de hormônios e de sinais neurais eferentes que partem do sistema nervoso central para tecidos periféricos, como o fígado, o músculo e o tecido adiposo. Em períodos de saciedade, quando há abundância de alimento, os carboidratos são armazenados como glicogênio no fígado e como gordura no tecido adiposo, principalmente. Em períodos de jejum, estes estoques são então mobilizados para suprir as necessidades energéticas (TANG; LANE, 2012). Os ácidos graxos obtidos do tecido adiposo e liberados para a corrente sanguínea são utilizados como fonte de energia para outros tecidos, de modo que o tecido adiposo tem papel fundamental no equilíbrio energético e na homeostase da glicose (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

Assim, a obesidade ou o excesso de adiposidade é resultado de um desbalanço entre o consumo e o gasto energético do indivíduo (LAU; TEOH, 2015). Esse acúmulo excessivo de gordura observado, mais especificamente no tecido adiposo branco, pode ocorrer devido ao aumento do volume das células adiposas (hipertrofia), pelo aumento no número destas células (hiperplasia) ou pela combinação destes dois fatores. Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém outros tipos de célula, como macrófagos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliais, células musculares lisas, células tronco mesenquimais e células precursoras de adipócitos. Todas essas células estão localizadas no estroma vascular do tecido adiposo, variando de acordo com a localização e a adiposidade deste tecido (RUIZ-OJEDA *et al.*, 2016).

A hiperplasia ocorre por um mecanismo que envolve o recrutamento de células tronco mesenquimais pluripotentes (células que têm a capacidade de se diferenciar em adipócitos, miócitos, condrócitos e osteócitos e que também estão presentes na medula óssea) (TANG; LANE, 2012) e a sua posterior diferenciação, que ocorre em duas fases: a formação de pré-adipócitos a partir destas células (passo de “comprometimento” com a linhagem

adipocítica) e a diferenciação terminal dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (MA *et al.*, 2015).

Desse modo, a adipogênese está relacionada com a ativação de diversos fatores de transcrição que são responsáveis pela expressão de proteínas-chave que induzem a formação de adipócitos maduros, envolvendo, assim, alterações na morfologia celular, indução de sensibilidade à insulina e mudanças na capacidade secretora das células (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

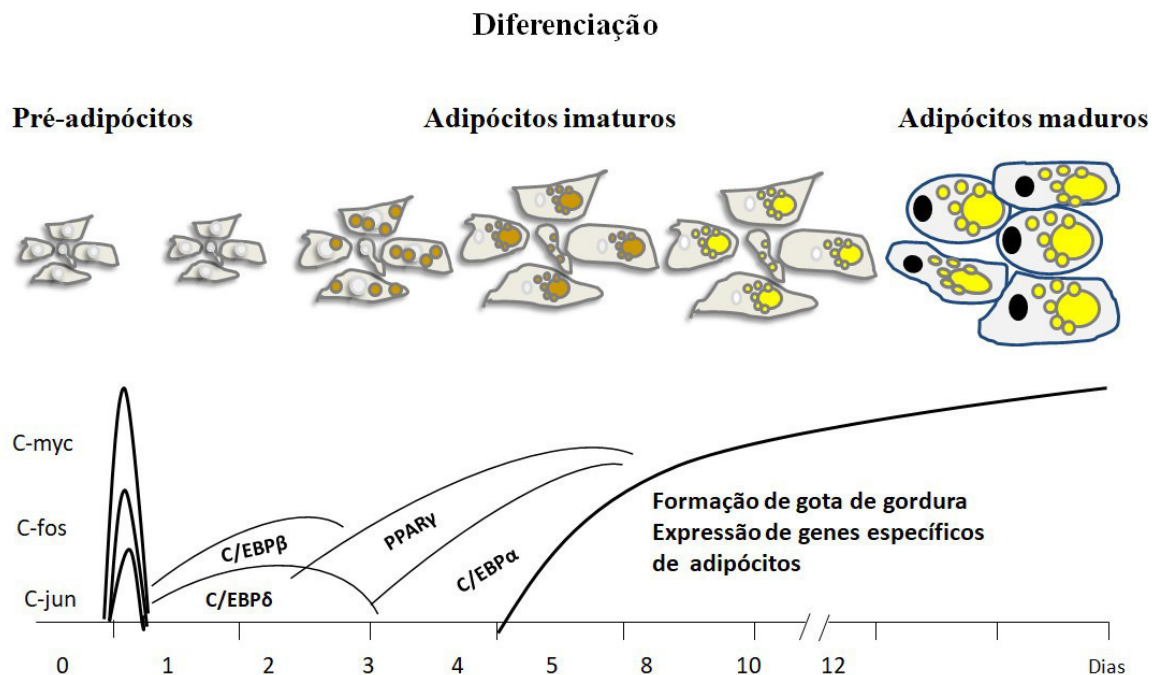
Embora os adipócitos branco e marrom apresentem diferenças na morfologia e na função, ambos são originados a partir de células tronco mesenquimais pluripotentes. Entretanto, ao contrário dos adipócitos brancos, os adipócitos marrons são derivados de uma linhagem miogênica caracterizada pela expressão do fator regulatório miogênico 5 (Myf5) e, portanto, seu desenvolvimento compartilha características com o músculo esquelético (ALGIRE; MEDRIKOVA; HERZIG, 2013).

A diferenciação do TAB é possível de ser estudada a partir da obtenção de amostras de tecidos de pacientes humanos e de modelos animais experimentais. No entanto, a manutenção *in vitro* é bastante complicada e o processo não pode ser expandido. A diferenciação terminal é mais extensivamente estudada através de linhagens celulares imortais (ALGIRE; MEDRIKOVA; HERZIG, 2013). Nas últimas décadas, o cultivo de linhagens de fibroblastos em placas de cultura de células possibilitou diversos estudos sobre os mecanismos celulares da adipogênese. Diferentes modelos e protocolos de cultura celular tornaram-se disponíveis para o estudo da biologia dos adipócitos (RUIZ-OJEDA *et al.*, 2016).

Por volta de 1970, Green e Kehind estabeleceram linhagens de fibroblastos imortais que prontamente se diferenciavam em adipócitos quando submetidos a indutores hormonais apropriados. As linhagens designadas como 3T3-L1 e 3T3-F442A, foram isolados a partir de células Swiss 3T3 não clonais e já estão comprometidos (ou determinadas) a se diferenciarem em adipócitos, sendo por isso muito importantes para o estudo dos mecanismos da diferenciação terminal (ROSEN *et al.*, 2000; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014) (Figura 1).

Muitos estudos têm sido realizados em células 3T3-L1 como um modelo eficaz para o estudo da formação de adipócitos (FARMER, 2006; MORRISSON; McGEE, 2015). Estas células têm capacidade de responder a agentes que induzem o acúmulo de lipídeo e constituem culturas de célula estáveis e que se assemelham ao próprio tecido, sendo úteis para o estudo celular da adipogênese (GREEN; KEHIND, 1974).

Figura 1. Processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.



Fonte: NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000 *apud* QUEIROZ *et al.*, 2009 (adaptado). Alguns eventos da diferenciação estão cronologicamente representados. Após uma hora da adição do coquetel adipogênico, ocorre a expressão transitória de proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *myc*, que dão início à mitose pós-confluente. C/EBP- β e - δ são os primeiros fatores de transcrição induzidos e ativam a expressão de PPAR γ e C/EBP α , os reguladores centrais da adipogênese. Uma vez ativados, PPAR γ e C/EBP α se autorregulam positivamente para se manter expressos.

A exposição de pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes na placa de cultura a indutores da adipogênese, ou seja, dexametasona, insulina e isobutil-metil-xantina (IBMX, um inibidor de fosfodiesterase) ativa respectivamente receptores de glicocorticóides, o receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor*, IGF-1) e a via de sinalização do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o que leva à ativação dos eventos iniciais da diferenciação destas células (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A insulina age estimulando a captação de glicose, que é então estocada na forma de triacilglicerol (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Além do IBMX, a dexametasona também aumenta a concentração intracelular de AMPc (MORRISON; McGEE, 2015). É importante destacar que a indução da diferenciação é feita quando os pré-adipócitos estão sincronizados na fase G₁ do ciclo celular. Seguidas 16 a 20 horas após a indução, os pré-adipócitos reentram no ciclo celular e passam por aproximadamente mais duas divisões mitóticas seguidas, um processo conhecido como expansão clonal mitótica. As células então

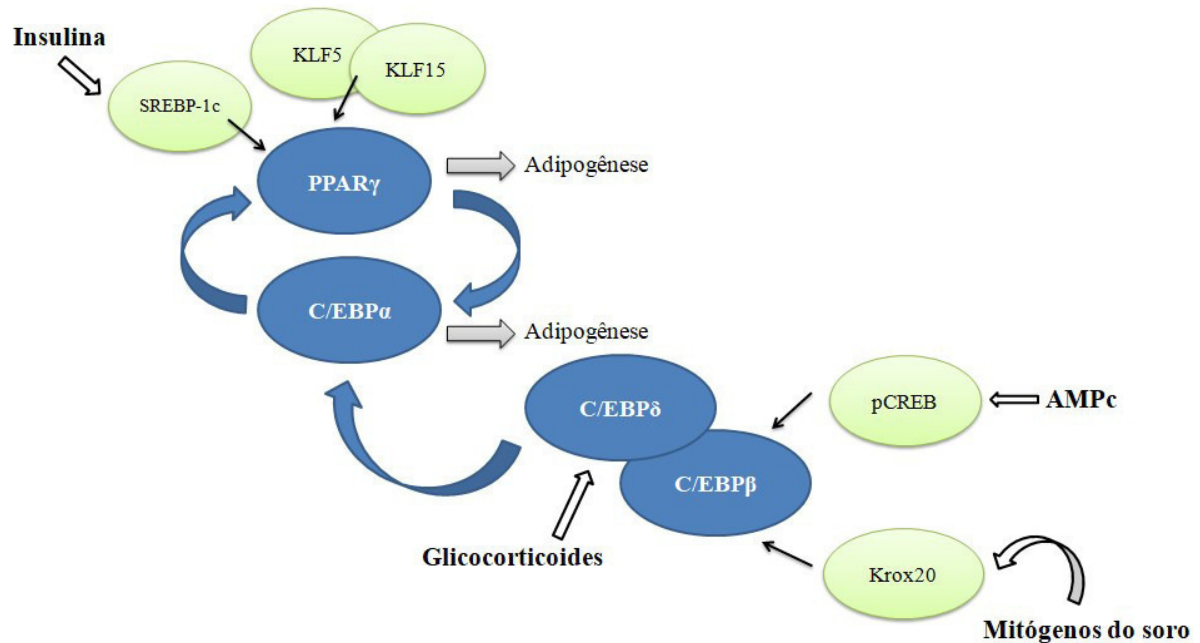
entram na fase de latência do ciclo celular e perdem a morfologia de fibroblastos, acumulando triglicerídeos citoplasmáticos e assumindo fenótipo e metabolismo de adipócito, relacionados com a lipogênese, a biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis e com a expressão de proteínas específicas, como receptores de insulina, transportador de glicose sensível à insulina (GLUT-4), leptina, entre outros (TANG; LANE, 2012).

Nas células dos mamíferos, a elevação dos níveis citosólicos do AMPc estimula a expressão de diversos genes. Todos os genes regulados por AMPc contêm uma sequência de DNA de atuação em *cis*, o elemento de resposta ao AMPc (CRE), que se liga à forma fosforilada de um fator de transcrição denominado CREB (proteína de ligação ao CRE), encontrado apenas no núcleo. A proteína CREB fosforilada se liga aos genes alvo que contêm CRE e interage com um co-ativador denominado CBP/300, que conecta a CREB à maquinaria transcricional basal (LODISH *et al.*, 2005).

Na cascata da adipogênese, imediatamente após a indução da diferenciação dos pré-adipócitos, a proteína CREB torna-se fosforilada e ativa a expressão de C/EBP β . Aproximadamente 14 a 16 horas após a indução, o C/EBP β adquire capacidade de se ligar ao DNA, à medida que os pré-adipócitos foram reintroduzidos no ciclo celular, podendo desempenhar, assim, um papel importante na expansão clonal mitótica, fundamental para a diferenciação das células. No início do processo de diferenciação, o C/EBP β é fosforilado duas vezes, pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e pela glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK3 β) e, uma vez capaz de se ligar ao DNA, leva à expressão de C/EBP α e PPAR γ . A expressão de C/EBP β e C/EBP δ é fundamental para a adipogênese, de modo que um estudo revelou que a supressão concomitante destes dois fatores causa redução do tecido adiposo de camundongos, devido principalmente à redução no número dos adipócitos (ALGIRE; MEDRIKOVA; HERZIG, 2013). A Figura 2 traz um esquema simplificado deste processo.

O aumento da expressão de C/EBP β e C/EBP δ nos pré adipócitos é rápido e transitório. A expressão de PPAR γ e C/EBP α é seguida pela ativação transcricional de muitos genes que codificam proteínas importantes para a geração e manutenção do fenótipo do adipócito, tais como o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4), a esteroil-CoA desaturase-1 (SCD-1), a leptina, adiponectina e a proteína de ligação ao ácido graxo 4 (FABP-4), perilipina e outras (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Figura 2. Cascata transcrricional da adipogênese: esquema simplificado



Fonte: Ali *et al.*, 2013, adaptado. O uso de indutores (insulina, IBMX, dexametasona) na presença de soro fetal bovino ativa uma cascata transcrricional que leva à ativação de PPAR γ e CEBP α , reguladores centrais da diferenciação terminal dos adipócitos. KLF-5, KLF-20 (*Krupel-like factors*) e Krox20 também são fatores de transcrição envolvidos neste processo.

Os receptores intracelulares da maior parte dos hormônios lipossolúveis (como estrogênio, progesterona, ácido retinóico, tiroxina e glicocorticoide) constituem a superfamília dos receptores nucleares e funcionam como ativadores de transcrição quando ligados aos seus ligantes. Já foram determinadas as sequências nucleotídicas características dos sítios de DNA, denominadas elementos de resposta, que ligam diversos receptores nucleares. Os receptores que se ligam a um determinado elemento de resposta direcionado por repetição, o fazem sob a forma de heterodímeros que possuem um monômero de receptor nuclear comum, denominado RXR (LODISH *et al.*, 2005).

O PPAR γ é um membro da super família de receptores nucleares e é considerado o regulador *master* da adipogênese, visto que todos os outros fatores adipogênicos requerem a sua presença para promover a diferenciação dos adipócitos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). O *splicing* alternativo do gene transcrito do PPAR γ dá origem a três isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 (a isoforma predominante e mais eficiente na promoção da adipogênese) e PPAR γ 3. Para exercer seus efeitos sobre os elementos de resposta do proliferador de peroxissoma, os PPARs devem formar heterodímeros com o receptor do ácido retinoide (RXR). Ligantes

endógenos do PPAR γ incluem ácidos graxos insaturados e oxidados, eicosanóides e prostaglandinas. Tais agonistas promovem a transcrição por meio do recrutamento de proteínas coativadoras que recrutam um aparato transcricional que induz a abertura e acessibilidade do DNA (ALGIRE; MEDRIKOVA; HERZIG, 2013).

Uma vez expressos, PPAR γ e C/EBP α se autorregulam num *feedback* positivo para manter a sua expressão, importante para a manutenção do fenótipo nos adipócitos maduros. Ligantes endógenos adicionais para PPAR γ ainda não foram elucidados com sucesso, mas é conhecido que SREBP-1c e C/EBP β pode aumentar a produção destes ligantes (ALGIRE; MEDRIKOVA; HERZIG, 2013).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) têm sido identificados como integradores das redes de sinalização inflamatória e metabólica. Estes receptores possuem natureza lipídica e modulam transcionalmente processos metabólicos em resposta a fatores nutricionais, além de reprimir a expressão gênica pró inflamatória. Os três isotipos de PPAR (PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ) possuem diferentes padrões de distribuição nos tecidos do corpo e ligantes específicos, o que explica suas diferentes funções (GROSS *et al.*, 2017).

A função do PPAR α é bem definida principalmente no fígado, onde participa da resposta adaptativa ao jejum controlando o transporte de ácidos graxos, a beta-oxidação e a cetogênese. Ele é ativado por fibratos, agentes terapêuticos utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia. No tecido adiposo, o PPAR γ regula a aquisição e a manutenção do fenótipo do adipócito e a sua ativação por tiazolidinedionas (rosiglitazona e pioglitazona) é utilizada no tratamento de diabetes mellitus tipo 2. PPAR β/δ é altamente ativo no músculo esquelético, onde participa da resposta ao exercício, regulando o catabolismo de ácidos graxos e a troca glicolítica-oxidativa na fibra muscular. Embora ainda não seja utilizada na clínica, estudos mostram que a ativação de PPAR β/δ melhora a homeostase lipídica, previne o ganho de peso e aumenta a sensibilidade à insulina (GROSS *et al.*, 2017).

Adipócitos, macrófagos, cardiomiócitos, células musculares lisas vasculares e células endoteliais apresentam uma elevada expressão de PPAR γ , cuja ativação tem um importante papel na homeostase da glicose e na adipogênese. Este receptor também apresenta importante papel na regulação do metabolismo de lipídeos nos adipócitos, controlando o estresse oxidativo e mantendo a proliferação e a diferenciação celular. A ativação do PPAR γ também exerce efeito antiinflamatório ao reduzir a expressão de adipocinas envolvidas na resistência à insulina (nomeadamente fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e resistina) e suprimir a produção de espécies reativas de oxigênio nos macrófagos. Assim,

a ativação de PPAR γ tem um importante papel contra doenças como aterosclerose, hipertensão, obesidade e dislipidemia (CHANDRA; MIRIYALA; PANCHATCHARAM, 2017).

Outro fator de transcrição envolvido na adipogênese é a proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis 1 (SREBP-1), também conhecida como fator 1 de diferenciação e determinação do adipócito (ADD1) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

A SREBP possui três domínios distintos: um domínio citosólico N-terminal que inclui um motivo básico hélice-alça-hélice (bHLH) de ligação ao DNA e que funciona como um fator de transcrição; um domínio central de ancoramento na membrana contendo duas hélices α transmembrana e um domínio citosólico regulador C-terminal (LODISH *et al.*, 2005).

No programa de diferenciação adipocitária, o mRNA de SREBP-1c/ADD é ativado após a expressão de C/EBP α e PPAR γ , ou seja, cerca de 20 h após a indução da diferenciação. A SREBP é encontrada complexada com a SCAP (proteína ativada pela clivagem de SREBP) e ligada à membrana do retículo endoplasmático por meio da insig-2a. Após a liberação do retículo endoplasmático por meio do estímulo da insulina, o complexo SCAP/SREBP-1c pode se mover para o aparelho de Golgi, onde a SREBP é clivada por proteases e o domínio contendo o componente bHLH é liberado, podendo ser translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, ocorre a transcrição de genes que codificam enzimas lipogênicas, envolvidas no metabolismo do ácido graxo e na síntese de triacilglicerol, passos importantes para a formação das características do adipócito (LODISH *et al.*, 2005; TANG; LANE, 2012)

Nos mamíferos, existem os genes SREBP1 e SREBP2, sendo que a expressão de SREBP-1 produz as isoformas SREBP-1a e -1c. SREBP-1c está diretamente relacionado com a regulação da lipogênese e da homeostase lipídica. Tanto SREBP-1a quanto SREBP-1c são identificados como fatores de transcrição pró adipogênicos que induzem a expressão de PPAR γ e também medeiam a síntese de lipídeo no adipócito pela ação da insulina (ALI *et al.*, 2013). Enquanto SREBP-1c e SREBP-1a exercem uma maior influência no metabolismo dos ácidos graxos, SREBP-2 tem maior influência no metabolismo do colesterol (LODISH *et al.*, 2005).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) faz parte de uma cascata de quinases importantes na homeostase energética. O comprometimento da sua função está relacionado a alterações metabólicas como resistência à insulina, obesidade e doenças cardiovasculares (LAGE *et al.*, 2008; HARDIE, 2015). Estudos mostram que a inibição da

AMPK induz a adipogênese de células tronco derivadas do tecido adiposo humano (KIM *et al.*, 2012). Estudos com linhagens celulares de pré adipócitos mostram que a ativação de AMPK inibe a diferenciação das células (WANG *et al.*, 2016) e reduz a expressão de genes adipogênicos como PPAR γ e CEBP α (DAGON; AVRAHAM; BERRY, 2006).

1.4 Tratamentos disponíveis para a obesidade

Embora a epidemia da obesidade seja explicada por diversos fatores comportamentais, como sedentarismo e consumo de dieta hipercalórica, a descoberta do envolvimento de fatores genéticos e de alterações da microbiota intestinal, por exemplo, mostra a necessidade de terapias adicionais (PICKETT-BLAKELY; NEWBERRY, 2016). Desse modo, a prática de atividade física e o consumo de dieta equilibrada podem proporcionar bons resultados para alguns pacientes, mas as intervenções cirúrgicas tornam-se necessárias para muitos deles. Além disso, a farmacoterapia é um importante adjuvante às mudanças no estilo de vida (MARTIN; MANI; MANI, 2015).

A regulação central do apetite é um campo de estudo muito importante. A incapacidade de limitar a ingestão excessiva de alimentos contribui para o ganho de peso descontrolado e a disponibilidade de alimentos obesogênicos é grande responsável pelos comportamentos de recompensa alimentar que levam pacientes a um consumo energético além da necessidade metabólica. A relação entre consumo e gasto energético é modulado por fatores comportamentais, ambientais e também por determinantes genéticos e por mecanismos de *feedback* neuroendócrinos (MANCINI; DE MELO, 2017).

Estes mecanismos são regulados pelo hipotálamo, o sítio central para a regulação homeostática do peso corporal. Este órgão integra sinais hormonais periféricos do trato gastrointestinal (grelina, colecistocinina, peptídeo YY, polipeptídeo pancreático (PP), GLP-1), do pâncreas (insulina) e do tecido adiposo (leptina) (MANCINI; DE MELO, 2017).

Estes e outros sinais (colecistocinina, peptídeo YY, polipeptídeo pancreático (PP), GLP-1, insulina) chegam ao sistema nervoso central por via sanguínea, atravessando a barreira hematoencefálica e ligando-se a receptores específicos presentes nas duas populações neuronais no núcleo arqueado do hipotálamo, ou seja, nos neurônios que liberam os neurotransmissores orexígenos [neuropeptídeo Y (NPY) e *agouti-related peptide* (AgRP)] e naqueles que liberam neurotransmissores anorexígenos [proopiomelanocortina (POMC), hormônio alfa estimulador de melanócito (α -MSH) e *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART)] (MANCINI; DE MELO, 2017).

As drogas atuais desenvolvidas para o tratamento da obesidade visam interferir no eixo intestino-cérebro. Os principais agentes estão voltados para mecanismos que controlam o apetite e que estimulam os neurônios que liberam POMC, promovendo, assim, saciedade e redução da ingestão de alimentos (KEITH, 2016).

Os medicamentos catecolaminérgicos (Femproporex, Mazindol e Anfepramona) foram as primeiras drogas aprovadas para o tratamento da obesidade, estando disponíveis no mercado há 50 anos. Ainda hoje apresentam problemas quanto à regulamentação do seu uso, à necessidade de mais estudos de eficácia e segurança de longa duração e à falta de interesse da indústria farmacêutica na realização de estudos de longo prazo. A melhor indicação para o uso de medicamentos catecolaminérgicos (anorexiantes de ação central) inclui aqueles pacientes que não respondem ao orlistate e/ou à sibutramina. Os catecolaminérgicos influenciam a neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica (agindo bloqueando a recaptação e/ou estimulando a liberação). Assim, o principal efeito do seu uso é a inibição do apetite (MANCINI *et al.*, 2010).

No Brasil, Femproporex, Mazindol e Anfepramona tiveram seu uso proibido por meio da RDC 52/11, mas em 15 de dezembro de 2016, por meio da RDC 133/16, a prescrição, dispensação e aviamento destes medicamentos passaram a ser realizados por meio de notificação de receita B2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2016).

Estão aprovados para tratar a obesidade no Brasil: sibutramina, orlistate, liraglutida e cloridrato de lorcaserina (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A sibutramina exerce seu efeito antiobesidade inibindo a recaptação de serotonina e norepinefrina. Estudos sugerem que a ação anoréxica da serotonina pode ser explicada pela ativação dos neurônios POMC no hipotálamo. Embora seja uma das farmacoterapias mais estudadas para este fim, o seu uso foi proibido no Canadá, nos Estados Unidos e na União Europeia por causar maiores riscos de ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais em pacientes com histórico de doença cardiovascular (WHARTON, 2016). A sibutramina não é proibida no Brasil, mas desde 2011 passou a ser acompanhada de um “Termo de responsabilidade do prescritor”, entregue na drogaria dispensadora junto ao receituário do tipo B2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA, 2016).

O Orlistate (Xenical®) foi aprovado pelo FDA em 1999 e até 2012 era o único medicamento disponível para tratar a obesidade. Indicado para perda e manutenção do peso,

seu mecanismo de ação consiste em inibir a lipase gástrica e pancreática, reduzindo 30% a absorção de gordura no trato gastrointestinal. O estudo *XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects* (XENDOS) mostrou que o uso de Orlistate está associado a uma redução de 37,3% na incidência de diabetes. Além disso, melhora a sensibilidade à insulina, reduz os níveis de glicose no sangue, melhora a pressão sanguínea e os níveis de colesterol total e LDL (SAUNDERS *et al.*, 2018).

Entretanto, pacientes em tratamento com o orlistate devem ter uma dieta balanceada, com reduzida ingestão de gordura e fazer uso de multivitamínicos, visto que entre os efeitos colaterais estão urgência fecal, fezes oleosas, incontinência fecal e redução da absorção de vitaminas lipossolúveis (SAUNDERS *et al.*, 2018).

Assim, uma segunda farmacoterapia foi aprovada para o tratamento do sobrepeso e da obesidade: a liraglutida. Este fármaco é um agonista do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon humano (GLP-1) que tem ação prolongada e induz a perda de peso por meio da redução do apetite e da ingestão de alimentos, ao se ligar a receptores de GLP-1 em neurônios distintos do núcleo arqueado, estimulando diretamente a via POMC/CART (anorexígenos) e inibindo indiretamente a neurotransmissão em neurônios que liberam NPY e AgRP via sinalização dependente de ácido gama aminobutírico (GABA) (LAU; TEOH, 2015).

O tratamento com a liraglutida foi associada a uma melhora dos fatores de risco cardiometabólicos e melhora da qualidade de vida. Apresenta também efeitos limitados no esvaziamento gástrico durante o tratamento crônico e seu efeito sobre a perda de peso é dose dependente, na dose de até 3 mg uma vez ao dia. Entretanto, mesmo que fracos e transitórios, são observados efeitos colaterais gastrointestinais como náuseas e diarreias (LAU; TEOH, 2015). Seu uso é aprovado no Canadá, Estados Unidos e União Europeia com o nome comercial de Saxenda® para tratamento da obesidade e em baixas concentrações (0,6 a 1,8 mg por dia) é disponível no Canadá e nos Estados Unidos para o controle da glicemia em diabéticos tipo 2 com o nome comercial de Victoza® (WHARTON, 2016).

Nos Estados Unidos, além do orlistate e da liraglutida também são utilizadas lorcaserina e as combinações fentermina/topiramato e naltrexona/bupropiona (MANCINI; DE MELO, 2017). No passado, os medicamentos disponíveis para o tratamento da obesidade eram utilizados para o tratamento a curto prazo, mas os novos agentes têm sido aprovados para uma terapia de longa duração, visto que se trata de uma doença crônica. Fentermina/topiramato, lorcaserina, naltrexona/bupropiona e liraglutida são indicados para o

tratamento crônico como um adjuvante à dieta de baixa caloria e à prática de atividade física (SAUNDERS *et al.*, 2016)

Aprovada pelo *FDA* em 2012, a lorcaserina (Belviq®) é um agonista seletivo do receptor de serotonina 5HT-2c, promovendo saciedade e reduzindo o consumo de alimentos (FLEMING; MCCLENDON; RICHE, 2013). Além disso, o seu uso foi associado a uma melhora de parâmetros metabólicos e cardiovasculares, como pressão sanguínea, níveis de lipídeos séricos e hemoglobina glicada (SHYH; CHENG-LAI, 2014). Entretanto, entre os efeitos colaterais relatados estão dor de cabeça, náusea, fadiga, boca seca e constipação, devendo ser evitada também por pacientes em uso de inibidores seletivos de recaptção da serotonina ou de inibidores da monoamino oxidase (risco de síndrome serotoninérgica) (BRAY, 2014).

A combinação de fentermina/topiramato foi aprovada pela *FDA* em 2012 para o tratamento de pacientes obesos ou daqueles que apresentam sobrepeso associado a alguma comorbidade. A fentermina aumenta a quantidade de norepinefrina no hipotálamo, estimulando a sinalização POMC e suprimindo o apetite. O mecanismo de ação do topiramato não é bem conhecido, mas estudos em animais sugerem que este promove aumento de gasto energético e supressão de apetite. O estudo CONQUER, duplo-cego e controlado por placebo, mostrou que pacientes que receberam fentermina/topiramato (Qsymia®) apresentaram redução de pressão sistólica, dos valores de hemoglobina glicada, do colesterol LDL, de triglicerídeos e da circunferência abdominal. Entretanto, também apresenta efeitos adversos indesejados, como parestesia, boca seca e discinesia. Além disso, a *FDA* relata a necessidade de estudos sobre o aumento do risco de má formações congênitas em bebês expostos ao fármaco no primeiro trimestre de gestação das mães (UMASHANKER, 2017).

Bupropiona/naltrexona (Contrave®) foi aprovada pelo *FDA* em 2014. A bupropiona é um inibidor de recaptção de dopamina/norepinefrina, enquanto que a naltrexona é um agonista de receptor opioide que antagoniza um ciclo de *feedback* inibitório que limita as propriedades anoréxicas da bupropiona. Essa combinação age na ativação de neurônios POMC presente no núcleo arqueado. Apresenta ainda efeitos colaterais como náuseas, vômitos, constipação, dor de cabeça, discinesia, boca seca e insônia (SAUNDERS *et al.*, 2016).

Assim, ao longo dos últimos 20 anos diferentes medicamentos para o tratamento da obesidade foram descobertos, comercializados e, alguns, retirados do mercado devido aos inúmeros efeitos colaterais relatados com o uso prolongado. Entretanto, o elevado número de pacientes obesos e as complicações relacionadas com esta condição instigam a descoberta de

novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de uma terapia que seja segura e eficaz, o que é favorecido pelos avanços nas áreas da genética e da biologia molecular (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2017).

1.5 Produtos Naturais e obesidade

Devido aos efeitos colaterais relacionados com os medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento da obesidade, outras fontes para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais têm sido investigadas (FU *et al.*, 2016). Extratos brutos e substâncias puras isoladas podem induzir a redução de peso ou prevenir a obesidade induzida por dieta hipercalórica (MOHAMED *et al.*, 2014).

Alguns dos produtos naturais utilizados na medicina popular para combater a obesidade são a aloína (*Aloe Vera*), alcachofra (*Cynara scolymus*), boldo (*Peumus boldus*), carqueja (*Baccharis* sp.), cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), maracujá (*Passiflora alata*), sene (*Cassia angustifolia*), ginseng-falso (*Pfaffia paniculata*), entre outras (SIMÃO, 2013).

Atualmente, a maioria dos produtos naturais estudados são fitoquímicos obtidos a partir da dieta e de plantas medicinais, considerados uma fonte segura e de fácil acesso, como frutas e vegetais. Entre os fitoquímicos estudados estão os polifenóis, os fitoesteróis, os alcaloides e os terpenoides (FENG; REUSS; WANG, 2016). Estes princípios ativos podem agir por meio 1) da redução da absorção de nutriente; 2) redução da adipogênese e aumento do gasto energético (termogênese); 3) supressão do apetite e 4) modificação da composição da microbiota intestinal e aumento da eliminação de gordura. Entretanto, há a necessidade de estudos de eficácia e segurança destes potenciais agentes anti obesidade (FU *et al.*, 2016).

A inibição da atividade da lipase pancreática é uma via pela qual alguns destes produtos exercem seu efeito anti obesidade. Destacam-se algumas saponinas, polifenóis, flavanoides e a cafeína. Entre aqueles que agem por meio da supressão do apetite, estão as saponinas isoladas das raízes de *Panax ginseng*, o ácido hidroxicítrico de *Garcinia cambogia*, o extrato total de *Hypericum perforatum*, entre outros. O aumento do gasto energético causado pela ativação da expressão de UCP-1 é também uma via promissora para novos tratamentos da obesidade, e é verificado na cafeína, na capsaicina, no chá verde e seus extratos. A lipólise também é uma via bastante explorada, visto que a hidrólise dos triglicerídeos reduz as reservas de gordura. Este efeito foi observado na curcumina presente na *Curcuma longa*, nas antocianinas de *Zea mays*, bem como no extrato aquoso de *Panax*

ginseng e de *Morus albam*, entre outros (MOHAMED *et al.*, 2014).

A nível celular, a obesidade é caracterizada pelo aumento no número e no tamanho dos adipócitos, formados a partir dos pré adipócitos presentes no tecido adiposo. Os tratamentos que visam regular este aumento na quantidade e no volume dos adipócitos podem futuramente fornecer um complemento importante para a redução energética no combate à obesidade (WILLIAMS *et al.*, 2013).

Além disso, as células adiposas exercem um importante papel na homeostase lipídica e no balanço energético, estocando triglicerídeos e liberando ácidos graxos de acordo com a necessidade energética. Assim, muitos produtos naturais que agem especificamente na inibição da adipogênese têm sido considerados promissores, embora haja a necessidade de se avaliar o efeito disso sobre outras doenças, como diabetes tipo 2 e aterosclerose (YUN, 2010).

Entre diversos produtos que causam redução da diferenciação dos adipócitos, foram identificados o resveratrol, o ácido retinoico, a genisteína, a curcumina, a berberina, o ginsenosídeo Rh2 e muitos outros (FENG; REUSS; WANG, 2016). Outros ativos, como a capsaicina, podem induzir a apoptose dos adipócitos (YUN, 2010).

Os terpenoides, ou terpenos, constituem uma das maiores famílias de produtos naturais e podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoide (C20), sesterterpenoide (C25), triterpenoides (C30), tetraterpenoides (C40) e politerpenoides (C>40). Muitos destes estão presentes em frutas e vegetais, cujo consumo torna-se útil para o manejo de desordens metabólicas associadas à obesidade, como diabetes tipo 2, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (GONZÁLEZ-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011).

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar o efeito de diferentes triterpenos ou extratos ricos destes constituintes sobre os adipócitos.

Foi evidenciado que o cicloastragenol, um triterpeno aglicona derivado de *Radix astragali* inibe o acúmulo de lipídeos nas células 3T3-L1 e que o influxo de Ca^{2+} nestas células pode favorecer a prevenção da adipogênese (WANG *et al.*, 2014).

O ácido maslínico, triterpeno do tipo oleanano encontrado em plantas como a *Olea europaea* L, apresenta potencial efeito antiadipogênico em células 3T3-L1. Além de melhorar a captação de glicose, este triterpeno reduz os níveis de triglicerídeos nas células reduzindo a expressão gênica de PPAR γ e ap2. O aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular observado pela ação do ácido maslínico pode estar envolvido no seu efeito antiadipogênico (PÉREZ-JÍMENEZ *et al.*, 2016).

O triterpeno lanostano ácido 3 β -hidroxilano-9,24-dieno-21-oico isolado da casca do caule de *Protorhus longifolia* melhora a captação de glicose nas células 3T3-L1 e reduz a diferenciação destas células. Além disso, a captação de glicose também é melhorada em células musculares C2C12 (MOSA *et al.*, 2014). Outros triterpenos do tipo lanostano, isolados de *Ganoderma lucidum* também mostraram efeito de inibição da diferenciação das células 3T3-L1, evidenciado pela redução do acúmulo de lipídeos (LEE *et al.*, 2010a).

Uma revisão de literatura mostrou diversos estudos realizados com triterpenos ginsenosídeos, principais constituintes do ginseng (raíz da espécie *Panax ginseng*), sobre a obesidade (*in vivo*) e a adipogênese *in vitro* (LI; JI, 2018). Diferentes ginsenosídeos mostraram potencial capacidade de reduzir a diferenciação de células 3T3-L1 (KIM *et al.*, 2009).

1.6 *Protium heptaphyllum* e α,β -amirina

Protium heptaphyllum March (Burseraceae) é uma árvore que ocorre em todo o Brasil. Árvore de porte médio a grande, seu tronco tem casca acinzentada e pouco espessa, suas flores são pequenas e seus frutos são da forma de drupas. Além disso, a planta tem boa madeira para carpintaria e marcenaria. O óleo-resina que escoa das incisões feitas no seu tronco tem característica aromática e é de cor amarelo-clara, solidificando ao contato com o ar e sendo facilmente inflamado (BRAGA, 1976).

Popularmente conhecida como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, entre outros, a *Protium heptaphyllum* é largamente encontrada na região amazônica, onde sua seiva é conhecida como breu branco (LORENZI, 1972 *apud* BANDEIRA *et al.*, 2002). Na medicina popular, esta espécie é utilizada como antiinflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante (CORREIA, 1984 *apud* BANDEIRA *et al.*, 2002). As figuras 3 e 4 trazem imagens dessa espécie.

Figura 3. Frutos de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae).



Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/almecega/index.ht>

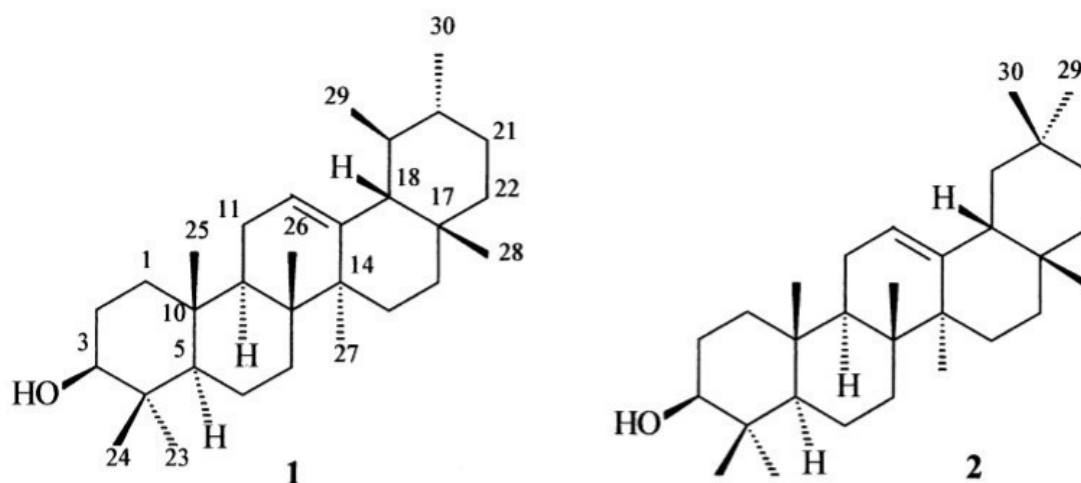
Figura 4. Resina da casca de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae).



Fonte: http://www.ulf-mehlig.de/jpg/dunes/du_protium-1-0.html

Da resina de *Protium heptaphyllum* já foram isolados os compostos triterpênicos α -amirina, β -amirina, breína, maniladiol, α -amirinona, β -amirinona e lupenona (BANDEIRA *et al.*, 2002; JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005). A α -amirina e a β -amirina estão presentes na resina de *P. heptaphyllum* como uma mistura binária (BANDEIRA, 2002) e possuem respectivamente cadeia pentacíclica do tipo ursano e oleanano (AKIHISA *et al.*, 1996). Suas estruturas estão demonstradas na Figura 5.

Figura 5. Estrutura molecular dos triterpenos α -amirina (1) e β -amirina (2).



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2004b.

A resina de *Protium heptaphyllum* possui efeito antiulceroso, mostrado em estudo que revelou a prevenção de dano gástrico induzido por etanol ou etanol acidificado em camundongos, com participação de mecanismo antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

O óleo essencial obtido a partir da resina de *Protium heptaphyllum* coletada no estado brasileiro do Amazonas mostrou-se capaz de reduzir a infiltração de eosinófilos e de inibir o extravasamento de proteínas em camundongos induzidos à pleurisia (SIANI *et al.*, 1999). O óleo da resina também apresentou potente inibição da proliferação de diferentes linhagens de células tumorais (SIANI *et al.*, 1999). Associa-se a atividade antitumoral do óleo da resina à elevada quantidade de monoterpenos em sua composição (SIANI *et al.*, 2011).

O extrato alcoólico da casca de *P. heptaphyllum* também mostrou atividade citostática (em baixas concentrações consegue inibir metade ou totalmente o crescimento celular) contra diferentes linhagens de células tumorais (TAYLOR *et al.*, 2013). Extratos da casca do caule da planta também mostraram atividade antifúngica e antibacteriana (VIOLANTE *et al.*, 2012).

Em diferentes modelos de nocicepção em ratos e camundongos, α,β -amirina apresentou atividade antinociceptiva periférica, espinhal e supra-espinhal, principalmente em modelos inflamatórios de dor (OTUKI *et al.*, 2005). Em modelo de nocicepção induzida por capsaicina na pata de camundongos, a pré-administração oral de α,β -amirina causou uma redução no tempo de lambertura da pata (comportamento relacionado à nocicepção). No modelo de nocicepção visceral induzida pela administração de capsaicina no cólon dos

animais, a α,β -amirina também preveniu que os animais apresentassem comportamentos relacionados à nocicepção (OLIVEIRA *et al.*, 2005a).

A mistura de α,β -amirina isolada de *Protium heptaphyllum* tem efeito ansiolítico e sedativo em camundongos com mecanismo de ação envolvendo, possivelmente, o complexo de receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Também foi observado efeito antidepressivo, cujo mecanismo de ação envolve possivelmente o aumento da atividade noradrenérgica (ARAGÃO *et al.*, 2006). Foi observado efeito antinociceptivo neurogênico e antiinflamatório em camundongos (ARAGÃO *et al.*, 2007).

Em modelo de dano hepático induzido por acetaminofeno em camundongos, o pré-tratamento com α,β -amirina atenuou os danos causados ao fígado dos animais ao promover um menor aumento na atividade das enzimas hepáticas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), recuperar os níveis de glutathione hepática (GSH), que apresenta atividade antioxidante, reduzir consideravelmente as alterações histopatológicas e praticamente anular a mortalidade dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2005b). Em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos, foi observado um efeito gastroprotetor nos animais tratados com a α,β -amirina (OLIVEIRA *et al.*, 2004b). Além disso, a α,β -amirina apresentou atividade antipruriginosa (OLIVEIRA *et al.*, 2004c) e antinociceptiva (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Na colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico em camundongos, a α,β -amirina reverteu os danos teciduais provocados e inibiu a infiltração de células polimorfonucleares. Assim, tem-se um potencial efeito da α,β -amirina no tratamento de respostas inflamatórias em doenças intestinais (VITOR *et al.*, 2009). Apresentou também capacidade antiinflamatória e antioxidante em modelos de pancreatite (MELO *et al.*, 2010a; MELO *et al.*, 2011).

Além das atividades biológicas anteriormente descritas, o Laboratório de Produtos Naturais investigou o efeito da resina e da mistura de triterpenos α,β -amirina sobre diferentes modelos *in vivo* de indução da obesidade ou da diabetes.

A α,β -amirina foi capaz de reduzir significativamente o aumento dos níveis de glicose no sangue em camundongos que foram induzidos à diabetes por estreptozotocina, aumentando também os níveis de insulina nesses animais, quando utilizada na sua maior concentração (100 mg/kg). Além disso, a administração de α,β -amirina em animais alimentados com dieta hipercalórica reduziu significativamente o aumento nos níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos. Nestes animais, também houve redução dos níveis séricos de lipoproteína de baixa densidade (c-LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade

(c-VLDL) e aumentados níveis de lipoproteína de alta densidade (c-HDL). Houve, assim, redução do índice aterogênico (AI) (expresso como (c-LDL+ c-VLDL)/c-HDL) em todas as concentrações de α,β -amirina testadas (SANTOS *et al.*, 2012).

Em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica, camundongos tratados com α,β -amirina apresentaram menor ganho de massa corporal e de gordura visceral quando comparados aos animais que não receberam a mistura de triterpenos. Comparativamente, também houve redução na expressão de PPAR γ e LPL no tecido adiposo dos animais tratados. Os níveis plasmáticos de leptina também foram menores nos animais que receberam α,β -amirina concomitantemente à alimentação com dieta hipercalórica quando comparados àqueles que não receberam a mistura de triterpenos. Além disso, α,β -amirina reduziu os níveis plasmáticos de resistina e de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos [MCP-1]) nos animais alimentados com dieta hipercalórica (CARVALHO *et al.*, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade tem como consequência uma série de problemas de saúde e muitos medicamentos foram desenvolvidos na tentativa de curar esta doença. Entretanto, o histórico desses medicamentos traz à tona a falta de confiabilidade no tratamento e a necessidade de se aplicar abordagens alternativas. As terapias farmacológicas disponíveis levam à redução ou controle do peso alterando o apetite, o metabolismo ou o consumo de calorias. Entretanto, além da síntese difícil, apresentam desagradáveis efeitos colaterais (MIR *et al.*, 2017).

Os produtos naturais são utilizados na medicina tradicional há milhares de anos para o tratamento de diversas doenças, incluindo as desordens metabólicas relacionadas com a obesidade. As moléculas obtidas a partir de produtos naturais são consideradas importantes alvos de estudo para a obtenção de novos fármacos, de modo que fitoquímicos como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos e vitaminas mostraram capacidade de inibir a diferenciação dos adipócitos, estimular a lipólise ou induzir a apoptose dos adipócitos *in vitro* e em roedores, por exemplo (ANDERSEN *et al.*, 2010).

Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Produtos Naturais, foi observado que a resina (RPH) obtida a partir do exsudato do caule da *Protium heptaphyllum* preveniu o ganho de massa em camundongos alimentados com dieta hipercalórica, reduzindo o acúmulo de gordura visceral e os níveis plasmáticos de glicose, amilase, lipase, triglicerídeos e colesterol total, quando comparados aos animais que não foram tratados com a resina. Além disso, a RPH aumenta os níveis plasmáticos de grelina e reduz os níveis de leptina quando comparados aos grupos que receberam apenas a dieta hipercalórica. O tratamento com a resina também reduz os níveis plasmáticos de resistina, TNF- α e IL-6 (CARVALHO *et al.*, 2015). Além de reduzir a expressão gênica de PPAR γ e LPL no tecido adiposo visceral de camundongos obesos, a RPH também reduziu a diferenciação de células 3T3-L1 por meio da redução da expressão proteica de PPAR γ e C/EBP α (CARVALHO *et al.*, 2015).

O estudo fitoquímico da RPH mostrou que esta é constituída por triterpenos pentacíclicos (56%), onde a mistura de triterpenos α,β -amirina é o seu principal constituinte (42,25%). Também podem ser encontrados breína e maniladiol (9,5%) e a mistura de lupenona com α e β -amirinona em menor quantidade (1,25%) (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005).

Desse modo, nosso laboratório também realizou estudos para investigar o efeito da α,β -amirina na obesidade induzida por dieta hipercalórica e problemas a ela relacionados em camundongos. Foi observado que essa mistura de triterpenos pode reduzir a expressão gênica de RNAm de PPAR γ e LPL no tecido adiposo branco desses animais, além de um mais baixo ganho de massa corporal comparado aos animais que não receberam o tratamento. Houve também menor acúmulo de gordura visceral em comparação aos animais que receberam apenas a dieta hipercalórica e níveis mais elevados de leptina e redução nos níveis de grelina. Os níveis séricos de citocinas inflamatórias (TNF- α e MCP-1) também foram reduzidos (CARVALHO *et al.*, 2017). Outro trabalho mostra que a α,β -amirina possui capacidade de promover redução da dislipidemia, da hiperglicemia e do fator de risco aterogênico, além de melhora da tolerância à glicose em camundongos induzidos a diabetes com estreptozotocina (SANTOS *et al.*, 2012).

Vários modelos de cultura de células, como linhagens de pré-adipócitos e culturas primárias estão disponíveis para o estudo da adipogênese. Entretanto a utilização de culturas primárias de tecido adiposo traz diversas dificuldades, devido à presença de pré-adipócitos em diferentes estágios de diferenciação, além de pequenos vasos sanguíneos, fibroblastos e até mesmo tecido nervoso. Assim, a utilização de uma linhagem celular clonal de pré-adipócitos de camundongos ou ratos torna este estudo mais viável. A linhagem de células 3T3-L1 é um modelo bem estabelecido e caracterizado, e sua diferenciação se assemelha ao que acontece no tecido adiposo animal (TUNG *et al.*, 2017).

Assim, os resultados *in vivo* obtidos com a mistura de triterpenos α,β -amirina levaram à necessidade de investigação *in vitro* dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no seu efeito anti-obesidade, que são o objeto de estudo do presente trabalho. Para isso, a linhagem celular 3T3-L1 foi utilizada para estudo dos mecanismos antiadipogênicos da α,β -amirina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da mistura de triterpenos α,β -amirina, isolada da resina de *Protium heptaphyllum*, sobre a adipogênese em células 3T3-L1.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da mistura de α,β -amirina sobre a viabilidade de células 3T3-L1 indiferenciadas e diferenciadas.
- Avaliar o efeito da α,β -amirina sobre a diferenciação de células 3T3-L1 por meio de coloração com *Oil Red O*.
- Determinar a expressão proteica de C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , SREBP-1, AMPK α e AMPK fosforilada em células 3T3-L1 tratadas com α,β -amirina.
- Investigar o efeito da α,β -amirina sobre a expressão gênica de C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ e PPAR γ 2 nas células 3T3-L1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes utilizados

Material	Origem
Albumina bovina sérica (BSA)	Sigma, EUA
Álcool isopropílico	Dinâmica, Brasil
Amersham ECL™ Prime	GE Healthcare, Reino Unido
Coquetel inibidor de protease	Sigma, EUA
DC <i>Protein Assay</i> (kit)	BioRad Laboratories, EUA
Dexametasona	Sigma, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma, EUA
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Gibco by Life Technologies, EUA
Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)	Sigma, EUA
Soro bovino fetal	Gibco by Life Technologies, EUA
Formaldeído	Dinâmica, Brasil
<i>Full-Range Rainbow Marker</i>	GE Healthcare, Reino Unido
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i> (kit)	Applied Biosystems, EUA
Insulina	Sigma, EUA
Membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF)	BioRad Laboratories, EUA
Soro de bezerro recém nascido	Gibco by Life Technologies, EUA
<i>Oil Red O</i>	Sigma, EUA
Ortovanadato de sódio	Sigma, EUA
Penicilina/estreptomicina	Gibco by Life Technologies, EUA
“PureLink™ RNA Mini” (kit)	Thermo Fisher Scientific, EUA

Tampão Ripa	Sigma, EUA
3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma)	Sigma, EUA
3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT)	Sigma, EUA

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Obtenção da mistura de triterpenos α , β -amirina.

A obtenção da resina de *Protium heptaphyllum* e da mistura de triterpenos α e β -amirina foi realizada pela Prof^a Dr^a Mariana Helena Chaves na Universidade Federal do Piauí e pelo Prof. Msc. Armenio André de Carvalho Almeida da Silva, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí.

A resina exsudada do caule de *Protium heptaphyllum* foi coletada no município de Timon, no estado do Maranhão. A identificação botânica foi realizada por Roseli Farias de Melo Barros sob deposição e registro com n° TEPB 18247, no herbário Graziela Barroso pertencente à Universidade Federal do Piauí.

Cerca de 410 gramas da resina bruta de *P. heptaphyllum* foram dissolvidos em solução de metanol/diclorometano (4:1), seguindo-se com a filtração e a evaporação do solvente. Com isso, há um rendimento de 99,5% na obtenção da resina branca amorfa (408 gramas são obtidos). Análises fitoquímicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e espectrofotometria de massa mostraram a presença de 56% de triterpenos pentacíclicos, dos quais 42,25% se tratavam da mistura de α e β -amirina. Breína e maniladiol constituíram 9,5% dos triterpenos, enquanto que 1,25% foram identificados como uma mistura de lupenona e α e β -amirinona (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005).

4.2.2 Cultura de células

A linhagem celular 3T3-L1 (ATCC/CL-173) foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantida em incubadora (NUAIRE, modelo NU-5800E) a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . As células foram mantidas em meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose (DMEM *high glucose*), adicionado de antibióticos a uma

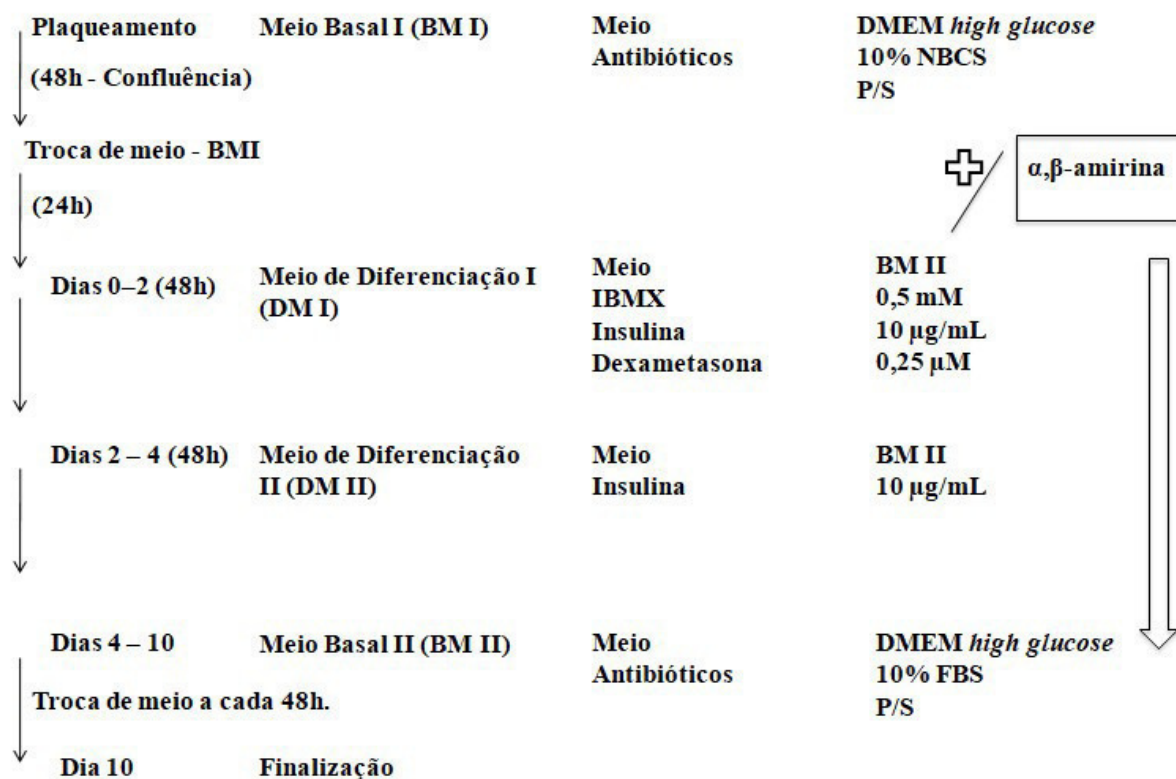
concentração final de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e suplementado com 10% de soro de bezerro recém nascido (NBCS) (SUNG *et al.*, 2010a). As células foram subcultivadas após aproximadamente 4 a 5 dias, quando atingiram uma confluência de 80%. Seu manuseio ocorreu em cabine de segurança biológica (fluxo laminar ESCO classe II, modelo AC2-4E8). O crescimento e a morfologia das células eram acompanhados em microscópio óptico de inversão (NIKON, modelo Eclipse TS100).

4.2.3 Indução da adipogênese das células 3T3-L1

Para induzir a diferenciação dos pré adipócitos 3T3-L1 foi utilizado o protocolo sugerido por Watanabe e colaboradores (WATANABE *et al.*, 2010), com algumas adaptações, como mostra o fluxograma 1. As células 3T3-L1 foram mantidas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^4 células/mL em meio basal I (DMEM *high glucose*, NBCS e antibióticos). Nessa condição, as células atingem a confluência após 48h, quando o meio é trocado pela primeira vez.

Após mais 24h, a indução da diferenciação (**dia 0**) foi iniciada utilizando-se meio basal II (DMEM *high glucose* 89% v/v, soro fetal bovino 10% v/v e antibióticos 1% v/v), contendo 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,25 µM de dexametasona e 10 µg/mL de insulina (meio de indução). No **dia 2**, o meio foi trocado por meio basal II adicionado de 10 µg/mL de insulina (meio de maturação) por 48 h. Após esse período, as células foram mantidas em meio basal II até o **dia 10**, com trocas de meio a cada 48 h. Para avaliar o efeito da α,β -amirina sobre a diferenciação das células, a sua adição ao meio de cultura foi feita a partir do dia 0, sendo readicionada a cada troca de meio.

Fluxograma 1. Metodologia de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.



Fonte: Watanabe *et al.*, 2010, adaptado.

4.2.4 Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT

O efeito da mistura de triterpenos sobre a viabilidade celular foi avaliado pelo método do MTT, o 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio. Este ensaio se baseia no fato deste sal ser reduzido a um produto de coloração púrpura, o sal de formazan, pela atividade de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria da célula viável, o que permite quantificar a porcentagem de células vivas (MOSMANN, 1983).

As células 3T3-L1 indiferenciadas foram plaqueadas na concentração de 6×10^4 células/mL em placa de 96 poços. Após a confluência das células chegar a aproximadamente 70%, a α, β -amirina foi adicionada nos poços nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ por um período de 24 h. Em seguida, o meio foi retirado e o MTT adicionado na concentração final de 1 mg/mL em meio DMEM *high glucose* (150 μL /poço) durante 3 h. Após esse tempo, o meio foi retirado e o formazan (precipitado) foi ressuspensionado com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. As absorbâncias foram

medidas em espectrofotômetro de placa (Biochrom® Asys, UVM 340) a 570 nm (HE *et al.*, 2013).

A viabilidade das células diferenciadas sob a influência da α,β -amirina também foi avaliada. Para isso, as células 3T3-L1 foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 células/mL e, em seguida, submetidas ao processo de diferenciação anteriormente descrito. No 9º dia, a α,β -amirina (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada por um período de tempo de 24 h. O meio foi retirado e o MTT foi, então, adicionado a uma concentração final de 1 mg/mL durante 3h. Após esse período, o meio foi retirado e 200 μL de DMSO foram adicionados para a dissolução do formazan formado, seguindo-se de uma diluição também em DMSO (10 vezes) e leitura da absorbância a 570 nm. A viabilidade celular foi medida como porcentagem do controle (HE *et al.*, 2013).

4.2.5 Avaliação da inibição do processo de diferenciação pela α,β -amirina através da coloração com Oil Red O

Para avaliar o efeito da α,β -amirina sobre a diferenciação das células 3T3-L1, a substância em teste foi incubada com as células nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, desde o dia 0 até o dia 10 do processo de diferenciação, conforme detalhado no item 4.2.3.

As células foram observadas diariamente ao microscópio óptico e fotografadas no dia 10 do processo de diferenciação. Neste dia, as células foram submetidas à coloração com *Oil Red O* com o objetivo de avaliar e mensurar a inibição do processo de diferenciação pela α,β -amirina.

A coloração com *Oil Red O* é um método utilizado para avaliar a diferenciação dos pré adipócitos em adipócitos devido à capacidade que este corante tem de se ligar aos triglicerídeos e ser facilmente extraído com isopropanol. A sua absorbância pode, então, ser medida em espectrofotômetro a 510 nm (RAMÍREZ-ZACARÍAS; CASTRO-MUÑOZLEDO; KURI-HARCUCH, 1992).

A solução de *Oil Red O* foi preparada na concentração de 0,5% (p/v) em álcool isopropílico e mantida sob agitação por cerca de 8 h, seguida de refrigeração a 4 °C (solução estoque). A solução foi, então, filtrada e misturada com água destilada na proporção de 6:4 (solução de trabalho). Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, a solução de trabalho foi filtrada.

Após os dez dias de diferenciação e tratamento com α,β -amirina, os adipócitos foram lavados duas vezes com solução de PBS (tampão fosfato salina) e fixados com

formaldeído 4% em PBS 1x por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e álcool isopropílico 60% e secas a temperatura ambiente. A solução de trabalho de *Oil Red O* foi então adicionada (1,5 mL/poço) por 2 h. Em seguida, as células foram extensivamente lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente para serem fotografadas. Para leitura em espectrofotômetro, o corante foi extraído com álcool isopropílico 60% (1,5 mL/poço) e a absorbância medida a 510 nm. O percentual de corante foi calculado relativo ao controle (KASTURI; JOSHI, 1982; SUNG *et al.*, 2010a).

4.2.6 Western blot

A técnica do *Western blot* é frequentemente utilizada na separação e identificação de proteínas. Por meio de eletroforese, uma mistura de proteínas é separada com base no seu peso molecular e, então, são transferidas para uma membrana adequada. A membrana pode, então, ser incubada com um anticorpo específico para a proteína que se deseja identificar (MAHMOOD; YANG, 2012).

Neste trabalho, a técnica do *Western blot* foi aplicada para avaliar a redução ou o aumento provocado pela α,β -amirina na expressão de proteínas envolvidas na diferenciação dos adipócitos 3T3-L1.

4.2.6.1 Extração de proteínas totais

Após os dez dias de diferenciação e tratamento com α,β -amirina, as células foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, adicionaram-se 300 μ L de tampão RIPA gelado em cada poço. Ao tampão RIPA foram adicionados coquetel inibidor de protease a 1:100 (v/v), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o ortovanadato de sódio, um inibidor de fosfatase, a 1 mM.

Em seguida, foi feita a desaderência mecânica das células com *cell lifter* nesta solução e transferiu-se o conteúdo para tubos tipo *eppendorf*. As amostras ficaram em gelo por 2 horas e a cada 20 min eram agitadas no vortex e sonicadas por 5 min. Ao final, as células foram centrifugadas a 8000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi separado e conservado a -20°C para posterior quantificação das proteínas totais.

4.2.6.2 Quantificação das proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada por meio do método colorimétrico proposto por Lowry *et al.* (1951) com kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories) segundo metodologia do fabricante.

Para calibração do método foi realizada uma curva padrão de BSA (0,25–2,5 mg/mL) diluída em tampão RIPA. Em seguida, 5 µL de cada amostra ou BSA diluída, foram colocados em triplicata na placa de 96 poços. Adicionou-se, então, 25 µL da solução A' (20 µL reagente S + 1 mL do reagente A) e 200 µL do reagente B. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada no escuro sob agitação leve por 10 min e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

A concentração de proteína em cada amostra foi determinada por meio da curva gerada pelo BSA, ao ser plotado o gráfico da absorbância *versus* quantidade de proteínas. A curva foi gerada a partir de regressão linear e os valores de absorbância obtidos para cada amostra foram substituídos na equação da curva a fim de se determinar as respectivas concentrações de proteína por meio do programa GraphPad Prism 5.0.

4.2.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a separação das proteínas por peso molecular, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema vertical (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

A separação das proteínas totais com base no peso molecular foi realizada em sistema vertical BioRad Laboratories mini-PROTEAN® Tetra Cell. Para isso, foi feito um gel de separação com concentração final de 8% de poliacrilamida (para detecção de PPAR γ , SREBP-1, AMPK α e AMPK-fosforilada) ou 12% de poliacrilamida (para detecção de C/EBP β e C/EBP α) em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 (BioRad Laboratories). Sobre este gel, foi aplicado um gel de empacotamento com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 (BioRad Laboratories).

O primeiro poço de cada gel foi preenchido com o marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12 – 225 kDa; GE Healthcare). Cada amostra foi carregada com tampão de *Laemmli* 5x (1:5 v/v) e aquecida a 100 °C por 10 min em banho seco. A seguir, aplicaram-se 20 µg de proteína total de cada amostra no gel e a corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 125 V e amperagem livre (fonte elétrica modelo PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente. O tempo de corrida variou

de 1 h e 20 min a 1 h e 40 min. Os detalhes dos tampões utilizados e do preparo dos géis estão no apêndice.

4.2.6.4 Eletrotransferência

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-RadImmun-Blot PVDF, BioRad Laboratories). A membrana foi previamente molhada em metanol e colocada em contato com o gel em suporte apropriado para a eletrotransferência pelo método de imersão (BioRad Laboratories, modelo MiniTrans Plot Modulo), contendo papéis de filtro e esponjas molhados com tampão de transferência gelado (ver detalhes no apêndice). A eletrotransferência foi realizada sob amperagem constante de 400 mA, voltagem livre e temperatura de 4 °C durante 2 h.

4.2.6.5 Imunodeteção

Com o término da transferência, as membranas ficaram incubadas *overnight* com solução de leite desnatado 5% em TBST 1x ou BSA 5% em TBST 1x, para bloqueio de interações inespecíficas do anticorpo com a membrana. Em seguida, foram incubadas por uma hora com o anticorpo primário de interesse.

Os anticorpos primários utilizados tinham especificidade para reconhecer as seguintes proteínas de camundongo: PPAR γ (Abcam®), C/EBP α (Abcam®), C/EBP β (Abcam®), SREBP-1 (Santa Cruz Biotechnology®), AMPK α (Cell Signaling Technology®) e AMPK fosforilada (Cell Signaling Technology®). O anticorpo primário anti β -actina (Cell Signaling Technology®) foi utilizado como padrão endógeno. O anticorpo anti C/EBP α foi diluído em solução de BSA 5% em TBST 1x na proporção de 1:500. Todos os demais anticorpos primários foram preparados em BSA 5% em TBST 1x na proporção de 1: 1000.

As membranas foram novamente submetidas a 5 lavagens com TBST 1x sob agitação moderada (5 minutos/lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG conjugado com enzima peroxidase (Cell Signaling Technology®), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST 1x. Para detecção por quimioluminescência, foram utilizados cerca de 500 μ L/ membrana do reagente Amersham ECL™ Prime (GE Healthcare). O reagente foi incubado com as membranas no escuro por 5 minutos e a aquisição de imagens foi realizada no equipamento ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad Laboratories).

4.2.6.6 Análise de dados

Para análise das imagens foi utilizado o Software Image Lab™ Software versão 5.1 (BioRad Laboratories). Após a normalização com β -actina, a média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 1 e os resultados foram expressos como unidades arbitárias.

4.2.7 Expressão do RNAm de *C/EBP β* , *C/EBP δ* , *PPAR γ 2* e *C/EBP α* , pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativa)

4.2.7.1 Extração de RNA

A extração do RNA total das células 3T3-L1 foi realizada com kit de extração de RNA PureLink™ RNA Mini (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) de acordo com as condições do fabricante.

No décimo dia de diferenciação e tratamento com α,β -amirina, as células 3T3-L1 foram lavadas duas vezes com tampão PBS. Em cada poço da placa de 6 poços, foram adicionados 300 μ L de *Lysis Buffer* com beta-mercaptoetanol (1% v/v). As células foram, então, desaderidas com *cell lifter* e transferidas para tubos tipo *ependorf* estéreis livres de DNase. O conteúdo de cada tubo foi agitado no vortex e homogeneizado com seringas de agulhas 21G. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g/2 min e o sobrenadante aqui obtido foi transferido para um novo *ependorf* e centrifugado a 20.000 x g/5 min.

O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 500 μ L de etanol 70%. Essa mistura foi agitada no vortex e, em seguida, foram transferidos 700 μ L para uma coluna spin (inserida em um tubo de coleta de 2 mL) e centrifugados a 12.000 x g/20 s. O conteúdo que atravessou a coluna foi descartado e a coluna spin foi reinsertada no mesmo tubo coletor, para que um possível volume de amostra ainda restante fosse centrifugado e o material de interesse recuperado no filtro. O tubo de coleta foi, então, descartado e a coluna spin adicionada a um novo tubo.

A cada coluna foram adicionados 700 μ L de *Wash Buffer I*, seguidos por uma centrifugação de 12000 x g/20 s. O conteúdo que atravessou a coluna foi descartado. A cada coluna foram, então, adicionados 500 μ L de *Wash Buffer II*, seguidos por centrifugação de 12000 x g/20 s. Este passo foi repetido e tudo o que atravessou o filtro para o tubo de coleta foi descartado.

Para remoção completa do *Wash Buffer II*, a coluna spin foi readicionada ao tubo coletor e centrifugada a 12000 x g/2 min. O conteúdo que atravessou o filtro foi descartado e cada coluna spin foi transferida para um novo tubo coletor. Seguiu-se com a adição de 40 µL de água RNase *free* à coluna spin e, após 1 min em repouso para eluição do RNA, foi feita a centrifugação a 13000 x g/2 min.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® na absorbância de 260 nm. A qualidade de cada amostra de RNA foi determinada pela razão entre os valores obtidos nas absorbâncias 260/280, onde as amostras consideradas puras obtiveram valores entre 1,8 -2,0 (PAN; HUNG, 2002).

4.2.7.2 Transcrição reversa e PCR em tempo real (qPCR).

O RNA extraído e quantificado foi submetido à reação de transcrição reversa de acordo com as instruções do fabricante do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para este fim foi utilizado o seguinte ciclo termal: 25°C/ 10 min – 37°C/ 60 min – 37°C/60 min – 85°C/5 min – 4°C/∞.

O cDNA obtido para cada amostra foi submetido à reação de transcriptase reversa seguindo as recomendações do fabricante do kit *GoTaq- qPCR Master Mix®* contendo a sonda SYBER *Green®* (Promega).

Os *primers* obtidos (oligonucleotídeos) foram desenhados no programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen) e estão descritos na tabela 2.

As reações foram realizadas em aparelho Mx3005p PCR System, onde foram realizados 40 ciclos com desnaturação em 95°C/15s, anelamento/extensão em 59°C/60 s. A especificidade dos *primers* na amplificação dos genes de interesse foi analisada por meio da curva de *melting* e a verificação da qualidade e intensidade das bandas formadas na amplificação foi verificada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% com coloração em brometo de etídeo. O registro do gel foi feito em equipamento ChemiDoc™ MP Image System.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata experimental e a análise dos dados foi feita por meio da comparação do *Cycle threshold* (Ct) de cada amostra com as médias relativas à quantificação do gene de referência (ou seja, β-actina) para a obtenção do delta Ct (2-ΔΔ Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Sequência gênica e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados.

Gene	Sequência	Temperatura de anelamento
PPARγ2	Forward 5'GGGATAAAGCATCAGGCTTCC3' Reverse 5'CAGCAAGGCACTTCTGAAACC3'	59°
C/EBPα	Forward 5'GAAGGTGCTGGAGTTGACCAG3' Reverse 5'CCTTGACCAAGGAGCTCTCAG3'	59°
C/EBPβ	Forward 5'GGACAAGCTGAGCGACGAGTA3' Reverse 5'CAGCTGCTCCACCTTCTTCTG3'	59°
C/EBPδ	Forward 5'ACTCCTGCCATGTACGACGAC3' Reverse 5'GAAGAGGTCGGCGAAGAGTTC3'	59°
β-actina	Forward 5'GGGAATGGGTCAGAAGGACTC3' Reverse 5'GGTGTGGTGCCAGATCTTCTC3'	59°

Fonte: GHOSH *et al.*, 2012.

4.2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman Keuls. Os resultados obtidos da quantificação da PCR em tempo real foram avaliados se seguiam uma distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Observada a normalidade, os dados paramétricos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os testes foram utilizados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) e os valores considerados estatisticamente significantes apresentaram valor de $p < 0,05$.

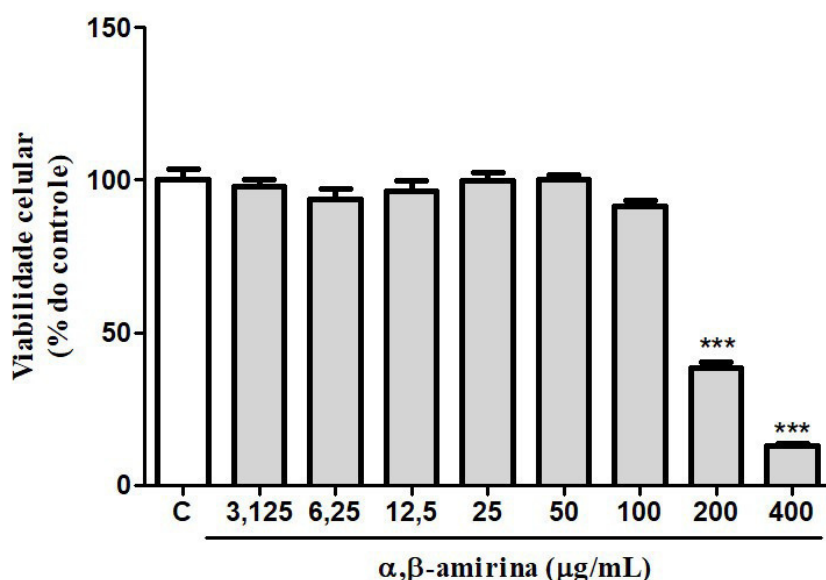
5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT

5.1.1 Efeito da α,β -amirina sobre as células 3T3-L1 indiferenciadas

O efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade das células 3T3-L1 foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT. As células foram incubadas com α,β -amirina em diferentes concentrações (6,25 – 400 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 h. O teste do MTT mostrou que apenas concentrações mais altas de α,β -amirina, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, causaram redução na viabilidade das células (61,5% e 87%, respectivamente) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade das células 3T3-L1 indiferenciadas.



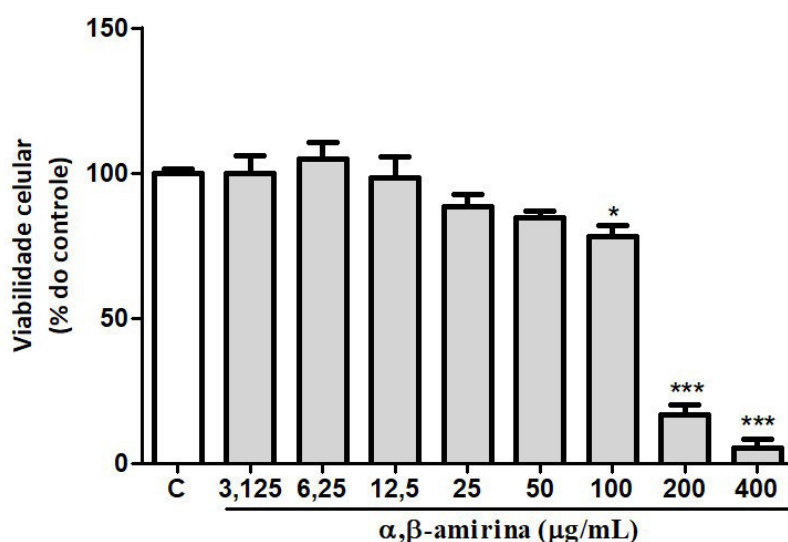
Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após dois experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ vs controle (C) (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

5.1.2 Efeito da α,β -amirina sobre as células 3T3-L1 diferenciadas

O ensaio de viabilidade também foi realizado nas células diferenciadas. Aqui, foi observado que α,β -amirina não causa redução de viabilidade nos adipócitos maduros após 24 h de incubação a 37°C nas concentrações de 3,125 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Houve redução de viabilidade celular a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2). As concentrações de 100, 200 e

400 $\mu\text{g/mL}$ causaram redução da viabilidade celular em 21,9; 83,2 e 94,7%, respectivamente. Assim, as concentrações de 6,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ foram utilizadas nos demais experimentos.

Gráfico 2. Efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade das células 3T3-L1 diferenciadas.



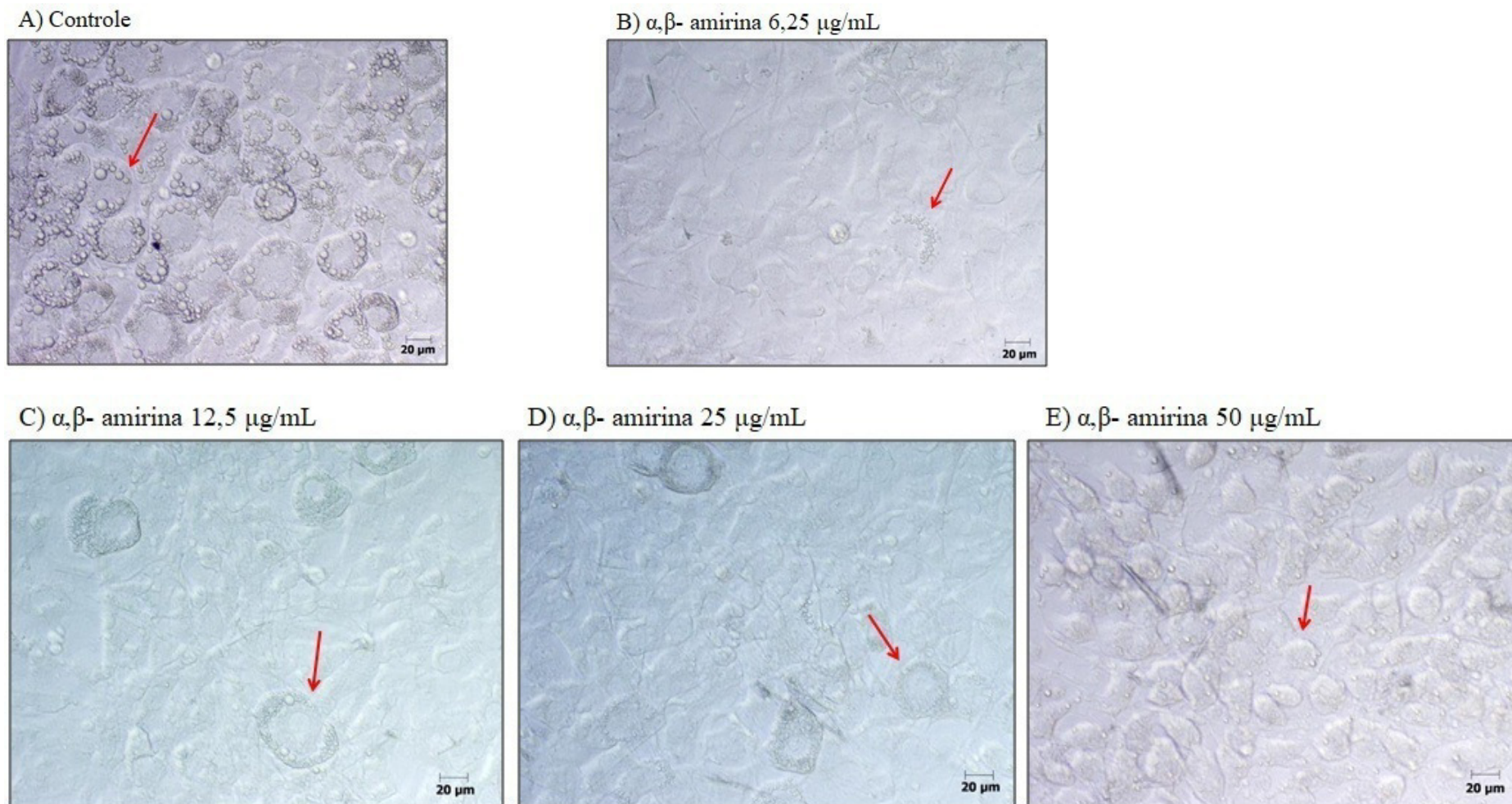
Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

5.2 Análise do efeito da α,β -amirina sobre o processo de diferenciação adipocitária através da coloração com *Oil Red O*

As células 3T3-L1 foram submetidas ao processo de diferenciação e tratadas com α,β -amirina durante 10 dias. As células foram fotografadas ao microscópio no dia 10 (Figura 6) e submetidas à coloração com *Oil Red O* (Figura 7).

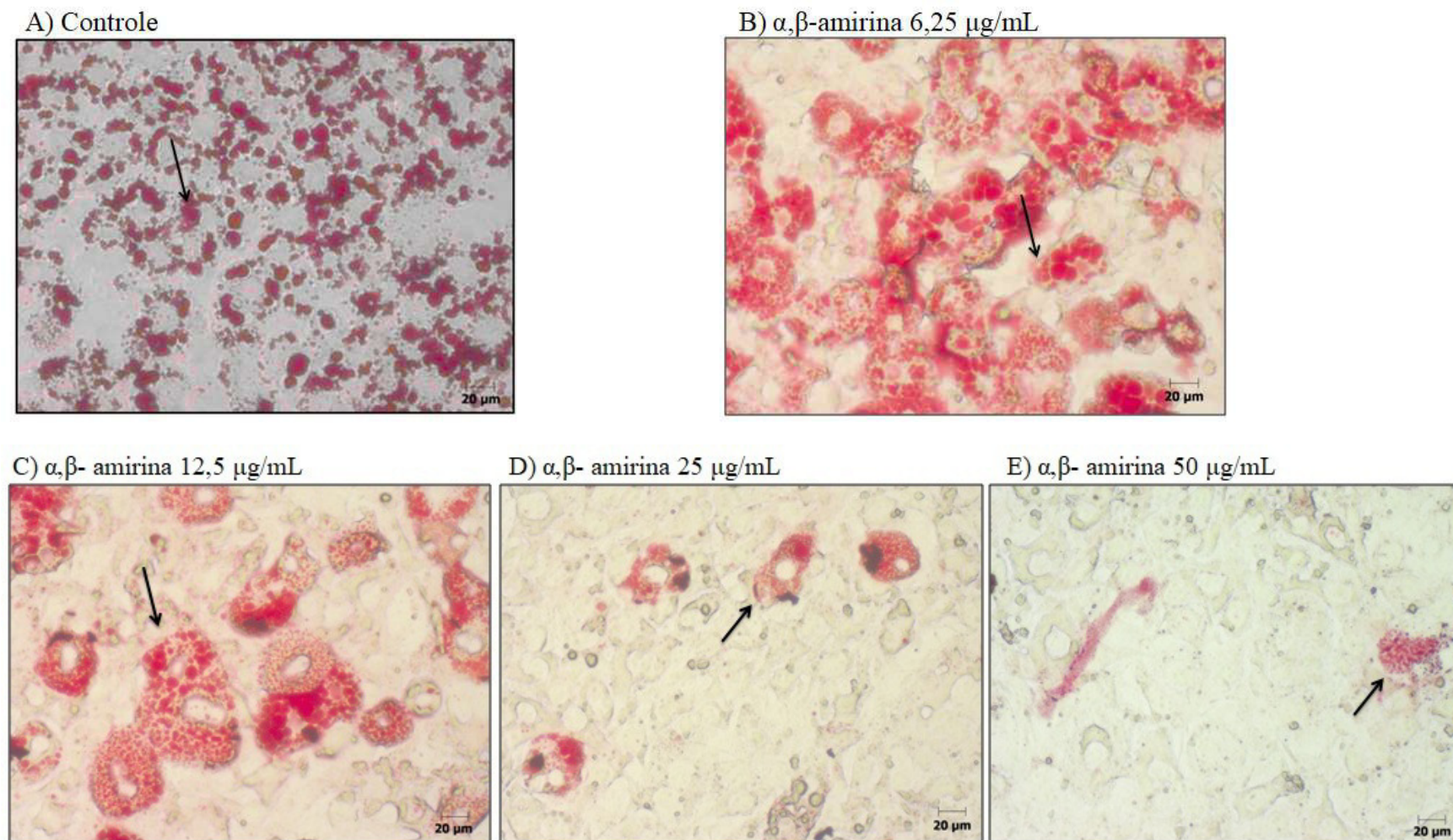
A análise microscópica seguida pela coloração com *Oil Red O* nos adipócitos diferenciados (dia 10) mostra que a α,β -amirina nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu o acúmulo de lipídeo nas células quando comparadas ao grupo controle em aproximadamente 34, 44, 68 e 75%, respectivamente (Gráfico 3). Assim, estes resultados mostram que a α,β -amirina influencia no processo de diferenciação dos adipócitos.

Figura 6. Efeito de α,β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias.



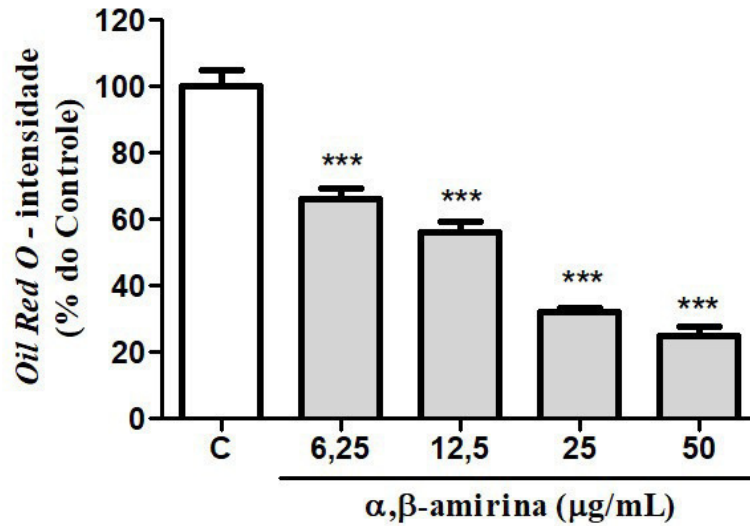
Fotomicrografias de células 3T3-L1 tratadas com α,β - amirina 6,25 – 50 $\mu\text{g/mL}$ no 10º dia após a indução da adipogênese (aumento de 400 x). A seta vermelha indica o acúmulo de lipídeos característico nas células adiposas.

Figura 7. Efeito de α,β -amirina sobre o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias e submetidas à coloração com *Oil Red O*.



Fotomicrografias de células 3T3-L1 tratadas com α,β - amirina 6,25 – 50 $\mu\text{g/mL}$ no 10º dia após a indução da adipogênese (aumento de 400 x). A seta escura indica o acúmulo de lipídeos característico nas células adiposas (corados com *Oil Red O*).

Gráfico 3. Efeito de α,β -amirina sobre os níveis lipídicos corados por *Oil Red O* em células 3T3-L1.



Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após três experimentos independentes realizados em triplicata. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 510 nm. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

5.3 Análise do efeito da α,β -amirina sobre a expressão proteica de fatores de transcrição da adipogênese em células 3T3-L1

A fim de se avaliar o papel da α,β -amirina sobre fatores adipogênicos nas células 3T3-L1, foi feita análise de expressão proteica por *Western Blot*. Considerando-se os melhores resultados obtidos no experimento anterior, decidimos não utilizar a concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para os demais experimentos.

Um dos primeiros fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células 3T3-L1 é o C/EBP β . Sua expressão nas células foi analisada no segundo dia da adipogênese, visto que a sua presença é rapidamente reduzida. Nas células diferenciadas (dia 2), a expressão foi 73,9% maior que no grupo de células indiferenciadas. A α,β -amirina não reduziu a sua expressão em nenhuma das concentrações testadas (Figura 8).

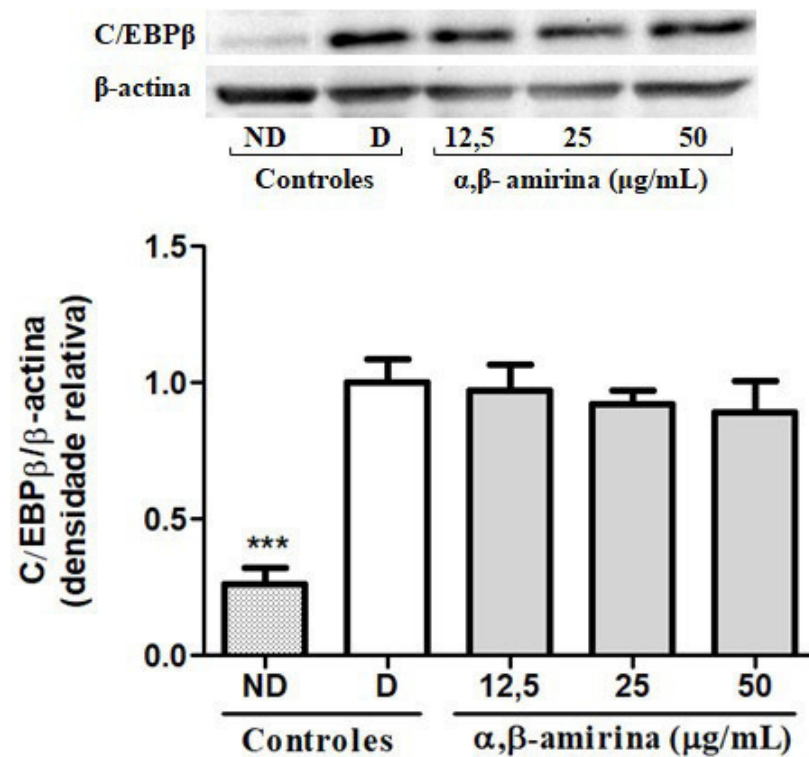
Foi analisada a expressão dos reguladores centrais da adipogênese (C/EBP α e PPAR γ) no décimo dia da diferenciação celular. A expressão da proteína C/EBP α nas células diferenciadas foi 68,9% maior que a expressão no grupo de células indiferenciadas. Os resultados também mostram que a α,β -amirina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a expressão de C/EBP α em 50,9; 50,1 e 62%, respectivamente (Figura 9).

A expressão de PPAR γ foi 44% maior nas células diferenciadas quando comparadas com as células indiferenciadas. Por sua vez, o tratamento das células com α,β -amirina durante a diferenciação reduziu em 54 e 54,8% a expressão de PPAR γ nas células tratadas com 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ dos triterpenos, respectivamente (Figura 9).

A expressão de SREBP-1, fator de transcrição relacionado com a lipogênese, também foi analisada após dez dias de diferenciação e tratamento com α,β -amirina. A expressão deste fator de transcrição foi 39,6% maior nas células diferenciadas quando comparadas às células indiferenciadas. Por sua vez, a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ dos triterpenos reduziu em 41,1% a sua expressão (Figura 10).

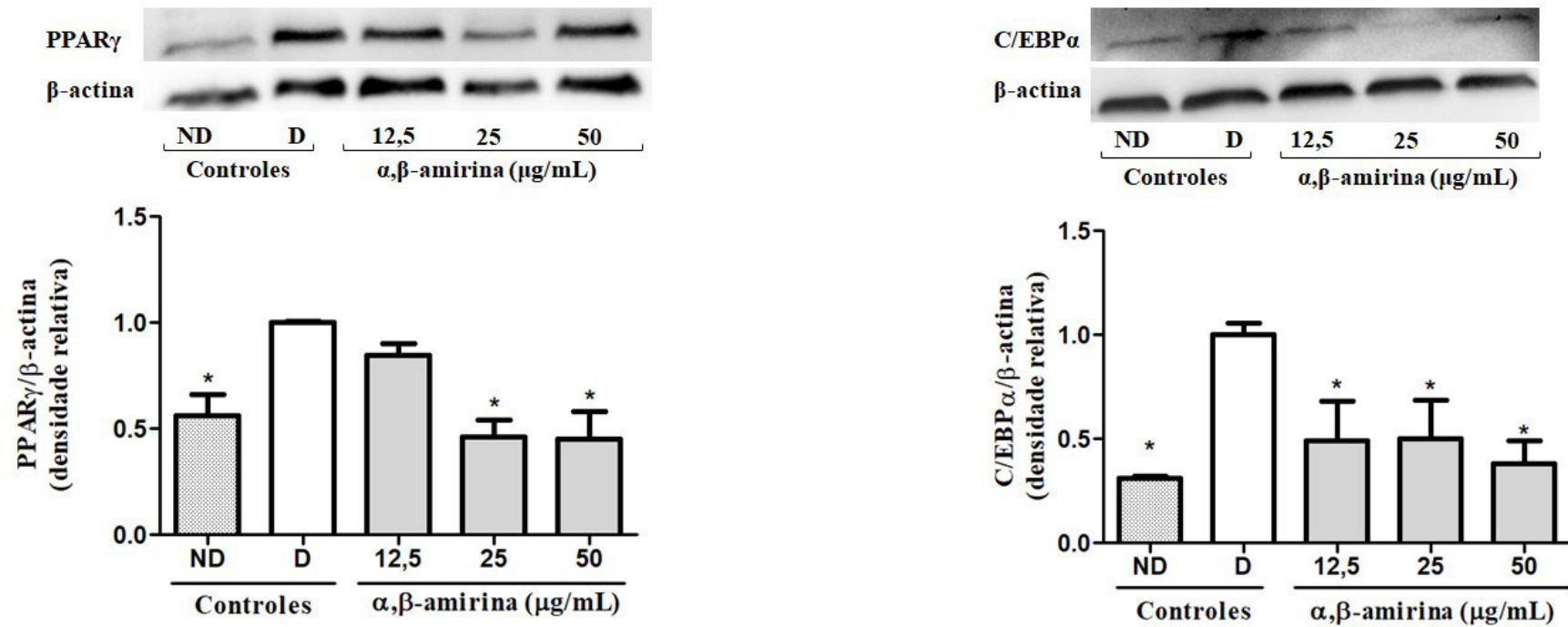
Por fim, foi evidenciado que a α,β -amirina não altera a expressão de AMPK α total e não participa da sua fosforilação em nenhuma das concentrações testadas (Figura 11).

Figura 8. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína C/EBP β após 2 dias de diferenciação das células 3T3-L1.



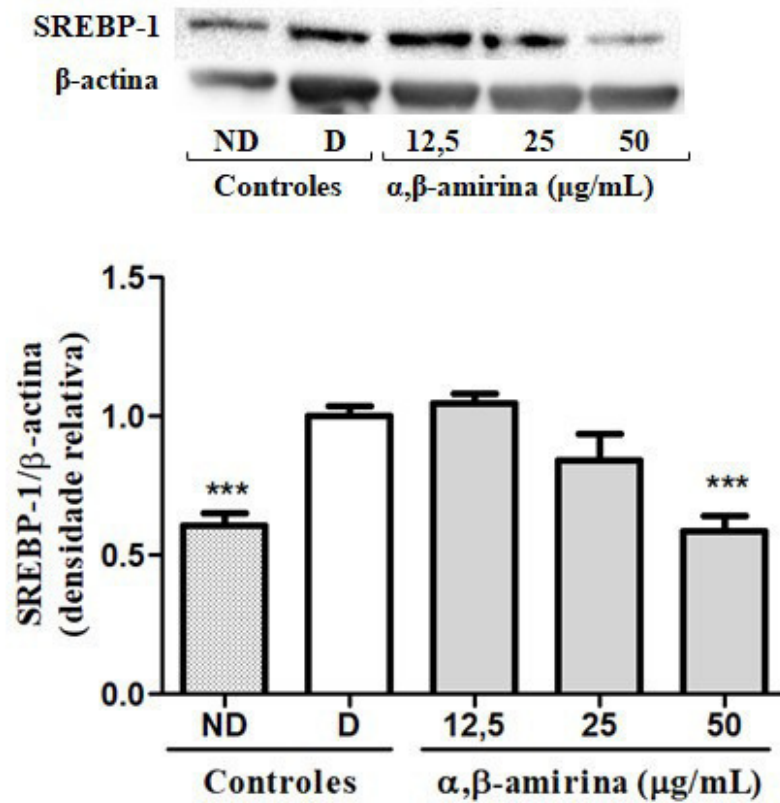
As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 2 dias para análise da expressão de C/EBP β na ausência ou presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A sigla “ND” se refere às células que não foram induzidas à diferenciação e “D” às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após três experimentos independentes realizados em duplicata (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

Figura 9. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão das proteínas C/EBP α e PPAR γ após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.



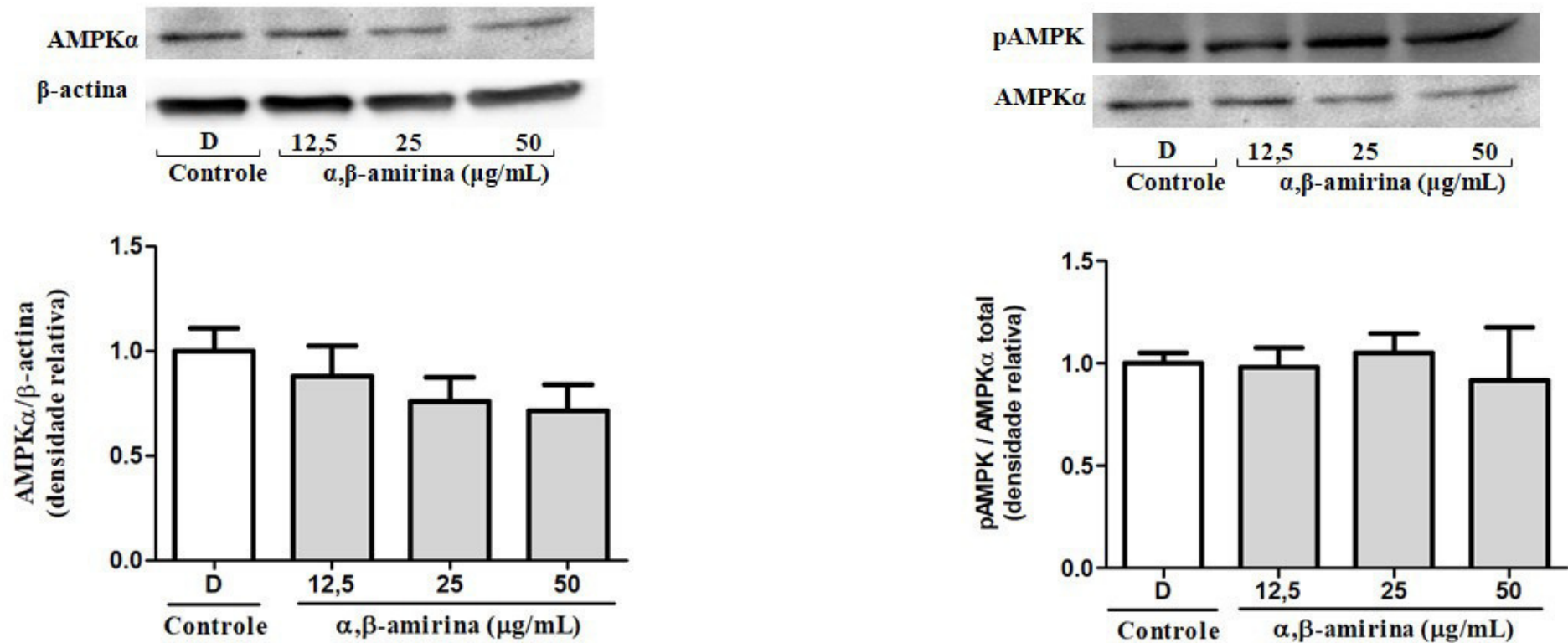
As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 10 dias na ausência ou presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A sigla “ND” se refere às células que não foram induzidas à diferenciação e “D” às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

Figura 10. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína SREBP-1 após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.



As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 10 dias na ausência ou presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A sigla “ND” se refere às células que não foram induzidas à diferenciação e “D” às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após três experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0,01$ vs controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

Figura 11. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão da proteína AMPK α e da sua forma fosforilada após 10 dias de diferenciação das células 3T3-L1.



As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 10 dias na ausência ou presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. "D" às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. Os resultados estão expressos como os valores da média \pm E.P.M. após três experimentos independentes realizados em duplicata.

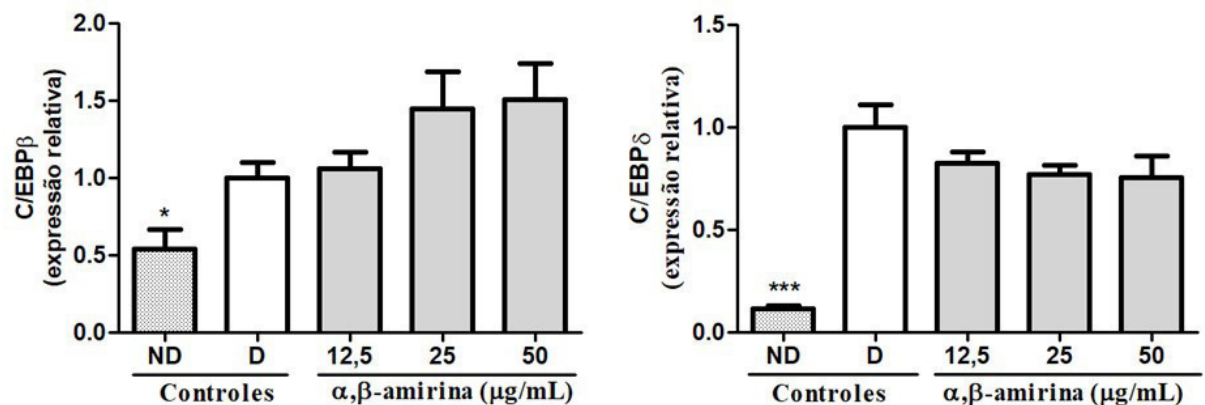
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA, seguido pelo Teste de Newman-Keuls).

5.4 Efeito da α,β -amirina na expressão relativa dos genes C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ 2 e C/EBP α

A análise da expressão gênica por PCR em tempo real mostrou que a expressão do gene C/EBP β foi 1,8 vezes maior nas células diferenciadas por 2 dias, comparativamente ao grupo de células indiferenciadas. A α,β -amirina não influenciou na expressão deste gene em nenhuma das concentrações testadas. Para o gene C/EBP δ a expressão nas células diferenciadas foi 8,7 vezes maior que nas células indiferenciadas. Aqui, a α,β -amirina também não influenciou na expressão deste gene nas células tratadas com as diferentes concentrações (Figura 12).

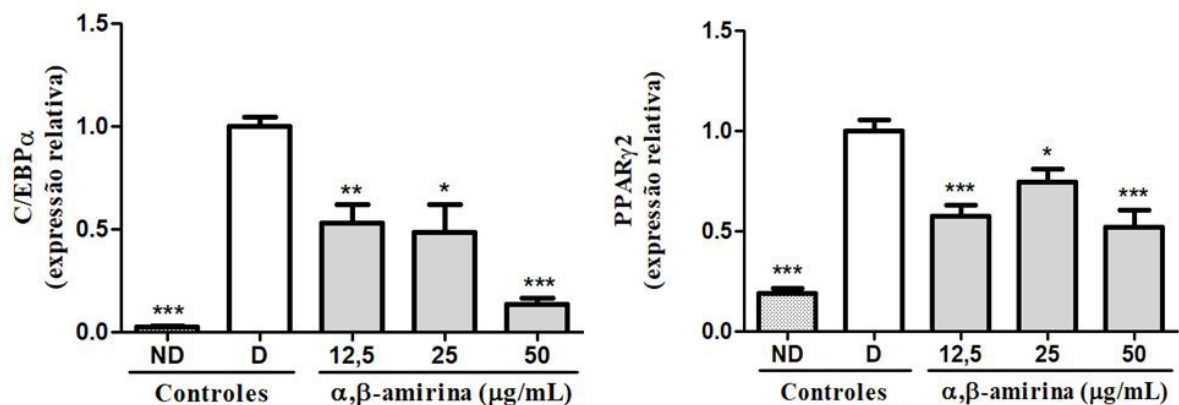
Foi observada que a expressão do gene C/EBP α nas células diferenciadas por 10 dias foi 37,1 vezes maior que no grupo de células indiferenciadas. Além disso, a α,β -amirina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a expressão do gene C/EBP α comparativamente à expressão do gene do grupo controle em 1,9; 2,1 e 7,3 vezes, respectivamente. Já a expressão do gene PPAR γ 2 nas células diferenciadas foi 5,2 vezes maior que a expressão nas células indiferenciadas. A α,β -amirina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a expressão desse gene em 1,7; 1,3 e 1,9 vezes comparativamente à sua expressão no grupo controle (células diferenciadas por 10 dias), como mostra a Figura 13.

Figura 12. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão relativa dos genes C/EBP β e C/EBP δ em células 3T3-L1 diferenciadas por 2 dias.



As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 2 dias na ausência ou na presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A sigla “ND” se refere às células que não foram induzidas à diferenciação e “D”, às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. As expressões de cada gene foram normalizadas usando β -actina como controle interno. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M após dois experimentos independentes realizados em triplicata (Teste t de Student).

Figura 13. Efeito da α,β -amirina sobre a expressão relativa dos genes C/EBP α e PPAR γ 2 em células 3T3-L1 diferenciadas por 10 dias.



As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 10 dias na ausência ou na presença de α,β -amirina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A sigla “ND” se refere às células que não foram induzidas à diferenciação e “D”, às células que foram diferenciadas e não receberam tratamento. As expressões de cada gene foram normalizadas usando β -actina como controle interno. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M após dois experimentos independentes realizados em triplicata (D). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (Teste t de Student).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra o efeito da mistura de triterpenos α,β -amirina sobre a diferenciação das células 3T3-L1 e a inibição da expressão de fatores de transcrição relacionados com este processo.

A exposição dos pré-adipócitos 3T3-L1 aos indutores da diferenciação leva à ativação dos eventos iniciais, caracterizados pela expressão de proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (*CCAAT/enhancer binding proteins*, C/EBPs): C/EBP β e C/EBP δ (QUEIROZ *et al.*, 2009), fatores de transcrição que desempenham funções reguladoras importantes no início do processo de diferenciação terminal dos adipócitos (CAO; UMEK; McKNIGHT, 1991). Alterações genéticas envolvendo o fator C/EBP β causam prejuízo no desenvolvimento do tecido adiposo em camundongos (GUO; LI; TANG, 2015).

Entre os alvos de C/EBP β e C/EBP δ estão os genes que codificam os fatores de transcrição centrais da adipogênese, C/EBP α e PPAR γ , além de SREBP-1, reguladora de genes lipogênicos. PPAR γ e CEBP α se autoregulam para se manter expressos e estimulam o processo de diferenciação pela ativação transcricional de muitos genes que codificam proteínas importantes para a manutenção do fenótipo do adipócito, tais como o transportador de glicose tipo 4 (Glut-4), proteína de ligação a ácido graxo 4 (FABP4), também conhecida como proteína adipocítica 2 (aP2), lipoproteína lipase (LPL), *sn*- 1- acilglicerol-3-fosfato acetiltransferase 2 (AGPAT2), perilipina e hormônios como adiponectina e leptina (DARLINGTON; ROSS; MacDOUGALD, 1998; LOWE; O'RAHILLY; ROCHFORD, 2011).

Observou-se que o efeito da α,β -amirina envolve a redução da expressão de PPAR γ e C/EBP α , reguladores centrais do processo de diferenciação e de SREBP-1, relacionado com a lipogênese. Além disso, não houve alteração na expressão proteica de C/EBP β no 2º dia do processo de diferenciação. Por meio da análise da expressão de RNAm por meio de PCR em tempo real quantitativa, encontramos que a α,β -amirina inibe a expressão gênica de C/EBP α (ao 10º dia de diferenciação), sem causar alterações na expressão de C/EBP β e C/EBP δ (ao 2º dia do processo de diferenciação). Estes resultados indicam que a α,β -amirina pode não agir nos estágios iniciais da adipogênese, mas influencia a expressão dos fatores de transcrição fundamentais neste processo.

Os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico apresentam estrutura química semelhante à da α,β -amirina (AKIHISA *et al.*, 1996).

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, o triterpeno ácido oleanólico inibe a diferenciação de células 3T3-L1 reduzindo a expressão proteica de PPAR γ e C/EBP α após 6 dias de diferenciação, bem como a expressão gênica de RNAm, analisado por RT-PCR convencional (SUNG *et al.*, 2010b). Além disso, um estudo com camundongos mostrou que o ácido oleanólico provocou redução de peso corporal e da gordura abdominal, além de melhora dos níveis de glicose e de lipídeos no sangue em camundongos submetidos à dieta hipercalórica (MELO *et al.*, 2010b).

Outro estudo realizado com o triterpeno ácido ursólico mostrou a sua capacidade de reduzir o acúmulo intracelular de lipídeos em células 3T3-L1, evidenciado pela coloração com *Oil Red O*, e de estimular a lipólise (HE *et al.*, 2013). Também foi observada melhora da captação de glicose em adipócitos 3T3-L1 diferenciados e estímulo à translocação do GLUT-4 citoplasmático para a membrana por mecanismo que envolve a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (HE *et al.*, 2014).

Diferente do que foi observado na ação da α,β -amirina, o ácido ursólico reduz a expressão de C/EBP β no dia 2 do processo de diferenciação e subsequentemente reduz a expressão proteica de PPAR γ e C/EBP α , no dia 6 da adipogênese (HE *et al.*, 2013). Nesse período, também houve redução na expressão de SREBP-1c. Ao reduzir a expressão destes importantes fatores de transcrição, a expressão proteica de alvos para estes fatores também foi avaliada. O tratamento com ácido ursólico reduziu a expressão de acetil-Coenzima A carboxilase (ACC) pelo aumento da sua fosforilação (pACC) e redução na expressão de FAS e FABP4. Sabe-se que ACC, FAS e FABP4 são importantes proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos e triacilglicerol (HE *et al.*, 2013).

Corroborando com os resultados obtidos com a α,β -amirina, o triterpeno ginsenosídeo Rh1 inibe a diferenciação de células 3T3-L1 ao reduzir a expressão gênica de PPAR γ e C/EBP α , além de FAS e FABP, sem alterar a expressão de CEBP δ no estágio inicial da diferenciação (GU; KIM; KIM, 2013). O ginsenosídeo F2 reduz a diferenciação das células 3T3-L1 também reduzindo a expressão gênica do PPAR γ (SIRAJ *et al.*, 2015).

Também foi avaliado o efeito de α,β -amirina sobre a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK α).

A AMPK é uma enzima sensibilizadora do balanço energético celular, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP, com o objetivo de manter esta razão praticamente constante. Assim, processos que interfiram tanto na produção quanto no consumo do ATP podem causar a sua ativação (JÚNIOR *et al.*, 2008).

Uma vez ativada, a AMPK exerce seus efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídeos, tanto na expressão gênica quanto na síntese de proteína. Essa enzima atua no fígado, no músculo esquelético, no coração, no tecido adiposo, no pâncreas, entre outros. A redução do conteúdo energético celular ativa a AMPK, que “desliga” vias metabólicas que consumam ATP (por exemplo, as vias anabólicas de síntese de ácidos graxos e de colesterol), ao mesmo tempo que estimula vias metabólicas que produzam ATP (como as vias catabólicas de oxidação de ácidos graxos e de glicose) (JÚNIOR *et al.*, 2008).

No estado ativado, a AMPK fosforila uma série de proteínas e modula a transcrição de genes envolvidos na regulação do metabolismo energético. O tecido adiposo exerce um papel fundamental na homeostase energética e na regulação da sensibilização à insulina, ao liberar ácidos graxos no sangue e secretar hormônios como a leptina e a adiponectina (DAVAL; FOUFELLE; FERRÉ, 2006). Em células 3T3-L1 o tratamento com um ativador da AMPK, o AICAR (*5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside*) inibe a diferenciação dessas células, bloqueando a expressão de PPAR γ e de C/EBP α e reduzindo a expressão de marcadores adipogênicos tardios, como ácido graxo sintase (FAS) e acetil-coenzima A carboxilase (ACC) (HABINOWSKI; WITTERS, 2001).

A relação entre a ativação de AMPK com a expressão de PPAR γ foi relatada em um trabalho publicado por LEE e colaboradores (2009). Neste trabalho, foi observado que a ativação de AMPK α com curcumina nas células 3T3-L1 reduziu a adipogênese. Houve redução da atividade transcrricional de PPAR γ e aumento de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas. O tratamento dos adipócitos com o AICAR, outro ativador de AMPK α , reduz a diferenciação dos adipócitos por meio de aumento de fosforilação de ACC e redução na expressão proteica de PPAR γ (LEE *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foi observado que a mistura de α,β -amirina não participa da ativação de AMPK α , indicando que a inibição da diferenciação das células 3T3-L1 não ocorre por esta via.

Entretanto, outros trabalhos encontrados na literatura mostram a importância desta via para a inibição da adipogênese. O triterpeno ginsenosídeo Rh2, encontrado na espécie *Panax ginseng* reduz a diferenciação de células 3T3-L1 por meio da ativação da via de sinalização da AMPK (HWANG *et al.*, 2007). O ginsenosídeo Rg3 também ativa a AMPK e reduz a expressão gênica do PPAR γ , via pela qual esta molécula reduz a diferenciação dos adipócitos (HWANG *et al.*, 2009).

As isoformas mais expressas do PPAR γ são PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que ocorrem como resultado de um *splicing* alternativo do RNA. Ambas as isoformas estão presentes no tecido adiposo e se diferem pela presença de 30 aminoácidos a mais na região N-terminal de PPAR γ 2. Além disso, PPAR γ 1 está abundantemente expresso no cólon, na retina, nas células hematopoiéticas e foi detectado em baixos níveis no fígado, no baço e no coração (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

As diferentes funções exercidas por estas isoformas na adipogênese foi avaliada por meio do bloqueio da expressão de PPAR γ 2 em células 3T3-L1 com a utilização de proteínas repressoras artificiais do tipo *zinc finger*. A redução de 95% da expressão de PPAR γ 2 causou um bloqueio na diferenciação das células, enquanto que a indução exógena de ativadores de PPAR γ 2 nas células restaurou a diferenciação adipocítica. Por outro lado, a reativação de PPAR γ 1 não provocou efeitos na adipogênese, sugerindo o papel chave de PPAR γ 2, e não de PPAR γ 1, durante o processo. Assim, PPAR γ 2 tem sido bem descrito como um receptor de hormônio nuclear específico dos adipócitos e pode ser transcricionalmente ativado por ácidos graxos poliinsaturados. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que função do PPAR γ é necessária e suficiente para a adipogênese e a formação, assim, do fenótipo do adipócito (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

A importância do PPAR γ 2 no balanço energético foi evidenciada em um estudo realizado com camundongos ob/ob. Este estudo mostrou que a ablação de PPAR γ 2 resulta em supressão na formação do tecido adiposo, grave resistência insulínica, falência de células beta e dislipidemia. (MEDINA-GOMES, 2007). Este receptor é bastante estudado como alvo de drogas antidiabéticas da classe das tiazolidinedionas, que revertem a resistência insulínica (ao se ligar a este receptor, esta classe de drogas reduz a formação de adipocitocinas relacionadas com esta condição), mas causam ganho de peso. A fosforilação de PPAR γ reduz a sua atividade *in vitro*, mas é responsável pela sensibilidade à insulina *in vivo*. Assim, alguns agonistas parciais, como FOMC-L-leucina previnem a fosforilação de PPAR γ 2 ou induz a conformação da forma não fosforilada para melhorar a sensibilidade à insulina sem causar ganho de peso (SARAF *et al.*, 2011). A fosforilação de PPAR γ inibe a sua atividade transcricional e inibe a diferenciação adipocitária (FENG; REUSS; WANG, 2016).

No presente trabalho, avaliamos um efeito mais específico da mistura triterpênica de α,β -amirina sobre o PPAR γ 2 presente nas células adiposas. A redução na expressão gênica de PPAR γ 2 corrobora com os achados na inibição da diferenciação destas células, mas outros estudos devem ser avaliados sobre os efeitos de α,β -amirina sobre a resistência insulínica.

Assim, sugere-se aqui uma redução na atividade transcricional de PPAR γ , demonstrado pela redução na expressão gênica e proteica de PPAR γ 2 e PPAR γ , respectivamente.

A regulação do metabolismo dos lipídeos deve-se muito a um conjunto de fatores transcricionais, inclusive múltiplas SREBPs que controlam a expressão de proteínas que fazem parte da síntese, degradação, transporte e armazenamento dos lipídeos. Estas SREBPs podem regular as atividades dos genes que codificam várias proteínas diferentes, incluindo aquelas que participam da captação celular de lipídeos (por exemplo, receptor LDL e lipoproteína lipase) e diversas enzimas nas vias para sintetizar colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos (LODISH *et al.*, 2005), regulando assim a lipogênese celular e a homeostase lipídica (ALI *et al.*, 2013).

A SREBP-1 pertence à família de fatores de transcrição que possuem um motivo básico hélice-alça-hélice (bHLH) de ligação ao DNA. Na diferenciação dos adipócitos, SREBP-1 é ativado e translocado para o núcleo, onde reconhece os elementos de resposta ao esterol (SRE) e induz a expressão de enzimas lipogênicas, como acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), lipoproteína lipase (LPL) e esteroil-CoA desaturase-1 (SCD1) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Os resultados deste trabalho mostram que a α,β -amirina reduziu a expressão proteica de SREBP-1, constituindo assim uma via pela qual a mistura de triterpenos inibe a adipogênese *in vitro*.

Corroborando com estes resultados, temos que triterpenos lanostanos isolados de *Ganoderma lucidum* inibem a diferenciação de células 3T3-L1 reduzindo a expressão gênica do subtipo SREBP-1c e de seus genes alvos FAS e ACC, relacionados com a formação do fenótipo do adipócito (LEE *et al.*, 2010b).

Diversos outros estudos *in vivo* foram realizados com estes triterpenos na busca de novos tratamentos para a hiperlipidemia e para melhora de níveis glicêmicos. O acetato de α -amirina possui importante atividade antihiperlipidêmica em ratos, embora a própria α -amirina tenha uma eficácia menor nesta atividade (NARENDER *et al.*, 2009). O acetato de α -amirina também mostrou uma capacidade de diminuir os níveis de triglicérides, colesterol total e LDL e aumentar os níveis de HDL em experimento realizado com camundongos (SINGH *et al.*, 2009). Um estudo realizado com ratos diabéticos por indução com estreptozotocina mostrou que os animais tratados com o acetato de α -amirina tiveram aliviados os danos hepáticos causado pela diabetes, evidenciado pela redução dos níveis de TGO, TGP e ALP (KARAN *et*

al., 2013). Entretanto, nenhum estudo ainda tinha mostrado o papel de α,β -amirina sobre a diferenciação de adipócitos 3T3-L1, o que dá relevância aos achados deste trabalho.

Corroborando com os resultados do presente trabalho, foi observado que o triterpeno lupenona, presente na RPH, também apresenta capacidade de inibir a diferenciação das células 3T3-L1, causando redução do acúmulo de lipídeo nas células tratadas como verificado pela coloração com *Oil Red O* (AHN; OH, 2013). Esse triterpeno também foi capaz de reduzir a expressão gênica e proteica de PPAR γ e C/EBP α em células 3T3-L1 após 8 dias sob processo de diferenciação, além de reduzir a expressão de RNAm (análise por PCR quantitativa em tempo real) de ap2 e resistina nas células diferenciadas (AHN; OH, 2013). O lupeol, um triterpeno lupano, também inibe a diferenciação de células 3T3-L1 reduzindo a expressão gênica de PPAR γ e C/EBP α (HATA *et al.*, 2008).

Assim, semelhante a outros estudos com triterpenos, a α,β -amirina inibe o processo de adipogênese através dos reguladores centrais da cascata de diferenciação, enriquecendo o que foi mostrado em trabalhos *in vivo* realizados anteriormente. Sugere-se, assim, que o mecanismo pelo qual essa mistura de triterpenos exerce seu efeito anti-obesidade envolve mecanismo de inibição da adipogênese. Torna-se, assim, uma substância promissora para estudos de novos tratamentos para a obesidade.

7 CONCLUSÃO

A mistura de triterpenos α,β -amirina causa redução significativa na diferenciação de células 3T3-L1, sem causar redução de viabilidade celular após 24 h de exposição às células indiferenciadas e diferenciadas nas concentrações de 6,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$. A via pela qual esta mistura de triterpenos inibe a adipogênese não envolve a ativação da AMPK, mas leva à redução da expressão proteica de C/EBP α PPAR γ e SREBP-1, bem como à redução da expressão gênica de PPAR γ 2 e C/EBP α .

A ausência de alteração na expressão gênica e/ou proteica de C/EBP β e C/EBP δ pode indicar que a fase inicial da diferenciação das células não seja o alvo de ação da α,β -amirina, havendo necessidade de novos estudos para comprovar essa hipótese. Assim, estes estudos *in vitro* corroboram os estudos *in vivo* já realizados com essa mistura de triterpenos, o que indica que ela pode ser uma substância promissora para estudos de novos tratamentos para a obesidade.

REFERÊNCIAS

- ADABAG, S.; HUXLEY, R. R.; LOPEZ, F. L.; CHEN, L. Y.; SOTOODEHNIA, N.; SISCOVICK, D.; DEO, R.; KONETY, S.; ALONSO, A.; FOLSOM, A. R. Obesity related risk of sudden cardiac death in the atherosclerosis risk in communities study. **Heart**, v. 101, n. 3, p. 215-21, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Sibutramina e remédios para emagrecer: entenda. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3423550. Acesso em 31 out. 2017.
- AHN, E.; OH, J.S. Lupenone isolated from *Adenophora triphylla* var. *japonica* extract inhibits adipogenic differentiation through the downregulation of PPAR γ in 3T3-L1 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 761 – 766, 2013.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1255 – 1260, 1996.
- ALGIRE, C.; MEDRIKOVA, D.; HERZIG, S. White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, p. 896 – 904, 2013.
- ALI, A.T.; HOCHFELD, W.E.; MYBURGH, R.; PEPPER, M.S. Adipocyte and adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, p. 229 – 236, 2013.
- ANDERSEN, C.; RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M.A.; BAILE, C.A. Phytochemicals and adipogenesis, **BioFactors**, v. 36, n.6, p. 415-422, 2010.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 85, p. 827 - 834, 2006.
- ARAGÃO, G.; PINHEIRO, M.; BANDEIRA, P.; LEMOS, T.; VIANA, G.; Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Isomeric Mixture of Alpha- and Beta-Amyrin from *Protiumheptaphyllum*(Aubl.)March. **Journalof Herbal Pharmacotherapy**, v. 7, p. 31 – 47, 2007.
- ARROYO-JOHNSON, C.; MINCEY, K.D. Obesity Epidemiology Worldwide. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, p. 571 – 579, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO** – 4ª edição, São Paulo, 2016.
- BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. **Química Nova**, Fortaleza, v. 25, p. 1078 - 1080, 2002.

BRAGA, Renato. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3 ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade**/ ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2014a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRAY, G.A. Medical treatment of obesity: the past, the present and the future. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n.4, p. 665-684, 2014.

CAO, Z.; UMEK, R.M.; McKNIGHT, S.L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion. **Genes and development**, v. 5, p. 1538 – 1552, 1991.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **The journal of endocrinology**, v.220, p. 47 – 59, 2014.

CARVALHO, K.M.; MARINHO FILHO, J.D.; DE MELO, T.S.; ARAÚJO, A.J.; QUETZ, J.S.; DA CUNHA, P.; DE MELO, K.M.; DA SILVA, A.A.; TOMÉ, A.R.; HAVT, A.; FONSECA, S.G.; BRITO, G.A.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. The resin from *Protium heptaphyllum* prevents high fat diet- induced obesity in mice: scientific evidence and potential mechanisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

CARVALHO, K.M.; DE MELO, T.S.; DE MELO, K.M.; QUINDERÉ, A.L.; DE OILVEIRA, F.T.; VIANA, A.F.; NUNES, P.I.; QUETZ, J.D.; VIANA, D.A.; DA SILVA, A.A.; HAVT, A.; FONSECA, S.G.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Amyrins from *Protium heptaphyllum* reduce high-fat diet-induced obesity in mice via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory responses. **Planta Medica**, Fortaleza, v. 83, p. 285 - 291, 2017.

CHANDRA, M.; MIRIYALA, S.; PANCHATCHARAM, M. PPAR γ and its role in cardiovascular diseases. **PPAR Research**, v. 2017, p. 1- 11, 2017.

DAGON, Y.; AVRAHAM, Y.; BERRY, E.M. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n.1, p. 43 -47, 2006.

DARLINGTON, G.J.; ROSS, S.E.; MacDOUGALD, O.A. The role of the C/EBP genes in adipocyte differentiation. **The journal of biological chemistry**, v. 273, p. 30057 – 30060, 1998.

DAVAL, M.; FOUFELLE, F.; FERRÉ, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. **The Journal of physiology**, v. 574, p. 55-62, 2006.

FARMER, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, Boston, v. 4, p. 263 – 273, 2006.

FENG, S.; REUSS, L.; WANG, Y. Potential of natural products in the inhibition of adipogenesis through regulation of PPAR γ expression and/or its transcriptional activity. **Molecules**, v. 21, p. 1–19, 2016.

FLEMING, J.W.; MCCLENDON, K.S.; RICHE, D.M. New obesity agents: lorcaserin and phentermine/topiramate. **The Annals of pharmacotherapy**, v.47, p. 1007-1016, 2013.

FRANK, A.P.; PALMER, B.F.; CLEGG, D.J. Do estrogens enhance activation of brown and beige of adipose tissues? **Physiology & Behavior**, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.09.026., 2017.

FU, C.; JIANG, Y.; GUO, J.; SU, Z. Natural products with anti-obesity effects and different mechanisms of action. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, p. 9571 – 9585, 2016.

GHOSH, C.; CHUNG, H.Y.; NANDRE, R. M.; LEE, J. H.; JEON, T. I.; KIM, I. S.; YANG, S. H.; HWANG, S. G. An active extract of *Ulmus pumila* inhibits adipogenesis through regulation of cell cycle progression in 3T3-L1 cells. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, Gyeonggi-do, v. 50, n. 6, p. 2009–2015, 2012.

GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? **Endocrinology**, v. 154, n.9, p. 2992 – 3000, 2013.

GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. **Pharmacological Research**, v. 64, p. 438-455, 2011.

GREEN, H.; KEHIND, O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. **Cell**, Cambridge, v.1, p. 113 -116, 1974.

GROSS, B.; PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, Lille, v. 13, p. 36-49, 2017.

GU, W.; KIM, K. A.; KIM, D. H. Ginsenoside Rh1 ameliorates high fat diet-induced obesity in mice by inhibiting adipocyte differentiation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 102-107, 2013.

- GUO, L.; LI, X.; TANG, Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/Enhancer- binding protein (C/EBP) β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 755–761, 2015.
- HABINOWSKI, S.A.; WITTERS, L.A. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.286, p. 852–856, 2001.
- HALAMA, A.; HORSCH, M.; KASTENMÜLLER, G.; MÖLLER, G.; KUMAR, K.; PREHN, C.; LAUMEN, H.; HAUNER, H.; ANGELIS, M.; BECKERS, J.; SUHRE, K.; ADAMSKI, J. Metabolic switch during adipogenesis: From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 589, p. 1 -15, 2016.
- HARDIE, D.G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 1–7, 2015.
- HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 13, p. 1252 – 1263, 2013.
- HATA, K.; HIWATASHI, K.; ITOH, M.; SUZUKI, N.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, J.; SASAKI, H. Inhibitory effects of lupeol on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 191–194, 2008.
- HE, Y. LI, Y.; ZHAO, T.; WANG, Y.; SUN, C. Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway. **Plos One**, v.8, p. 1–12, 2013.
- HE, Y.; LI, W.; LI, Y.; ZHANG, S.; WANG, Y.; SUN, C. Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes. **Plos One**, v. 9, p. 1–8, 2014.
- HWANG, J.T.; KIM, S.H.; LEE, M.S.; KIM, S.H.; YANG, H.J.; KIM, M.J.; KIM, H.S.; HA, J.; KIM, M.S.; KWON, D.Y. Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 364, n.4, p. 1202-1208, 2007.
- HWANG, J.; LEE, M.; KIM, H.; SUNG, M.; KIM, H.Y.; KIM, M.S.; KWON, D.Y. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR-gamma signal pathways. **Phytotherapy research**, v. 23, n.2, p. 262-266, 2009.
- JÚNIOR, A.C.S.; UGOLINI, M.R.; SANTOMAURO, A.T.; SOUTO, R.P. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.52, p. 120-125, 2008.
- JÚNIOR, G.; DE SOUZA, C.; CHAVES, M. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, p. 183 – 187, 2005.
- KARAN, S.K.; MONDAL, A.; MISHRA, S.K.; PAL, D.; ROUT, K.K. Antidiabetic effect of

Streblus asper in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 369-375, 2013.

KASTURI, R.; JOSHI, V. Hormonal regulation of stearyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 257, p. 12224 - 12230, 1982.

KEITH, J.N. Pharmacotherapy in treatment of obesity. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, p. 663 – 672, 2016.

KIM, E.; LIM, S.; PARK, J.; SEO, J.K.; KIM, J. H.; KIM, K. T.; RYU, S. H.; SUH, P. Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. **Journal of Cell Physiology**, v. 227, p. 1680 – 1687, 2012.

KIM, S.N.; LEE, J.H.; SHIN, H.; SON, S.H.; KIM, Y.S. Effects of in vitro-digested ginsenosides on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. **Planta Medica**, v.75. n.6, p. 596-601, 2009.

KIM, S.H.; PLUTZKY, J. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. **Diabetes & Metabolism Journal**, v.40, n.1, p. 12-21, 2016.

KIVIMÄKI, M.; KUOSMA, E.; FERRIE, J.E.; LUUKKONEN, R.; NYBERG, S.T.; ALFREDSSON, L.; BATTY, G.D.; BRUNNER, E.J.; FRANSSON, E.; GOLDBERG, M.; KNUTSSON, A.; KOSKENVUO, M.; NORDIN, M.; OKSANEN, T.; PENTTI, J.; RUGULIES, R.; SHIPLEY, M.J.; SINGH-MANOUX, A.; STEPTOE, A.; SUOMINEN, S.B.; THEORELL, T.; VAHTERA, J.; VIRTANEN, M.; WESTERHOLM, P.; WESTERLUND, H.; ZINS, M.; HAMER, M.; BELL, J.A.; TABAK, A.G.; JOKELA, M. Overweight, obesity, and risk of cardiometabolic multimorbidity: pooled analysis of individual-level data for 120 813 adults from 16 cohort studies from the USA and Europe. **The Lancet Public Health**, v. 2, p. 277– 285, 2017.

LAGE, R.; DIÉGUEZ, C.; VIDAL-PUIG, A.; LÓPEZ, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, p. 539-549, 2008.

LANTHIER, N.; LECLERCQ, I.A. Adipose tissue as endocrine target organs. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n.4, p. 545-558, 2014.

LAU, D.C.W.; TEOH, H. Current and Emerging Pharmacotherapies for Weight Management in Prediabetes and Diabetes. **Canadian journal of diabetes**, v. 39, p. 134 – 141, 2015.

LEE, Y.K.; LEE, W.S.; HWANG, J.T.; KWON, D.Y.; SURH, Y.J.; PARK, O.J. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 305-310, 2009.

- LEE, I.; SEO, J.; KIM, J.; KIM, H.; YOUN, U.; LEE, J.; JUNG, H.; NA, M.; HATTORI, M.; MIN, B.; BAE, K. Lanostane Triterpenes from the Fruiting Bodies of *Ganoderma lucidum* and Their Inhibitory Effects on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. **Journal of Natural Products**, v.73, n.2, p. 172 – 176, 2010a.
- LEE, I.; KIM, J.; RYOO, I.; KIM, Y.; CHOO, S.; YOO, I.; MIN, B.; NA, M.; HATTORI, M.; BAE, K. Lanostane triterpenes from *Ganoderma lucidum* suppress the adipogenesis in 3T3-L1 cells through down-regulation of SREBP-1c. **Bioorganic & Medicinal**, v.20, n.18, p.5577-5581, 2010b.
- LI, Z.; JI, G.E. Ginseng and obesity. **Journal of Ginseng Research**, v. 42, n.1, p. 1-8, 2018.
- LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; OLIVEIRA, F.A.; GURGEL, L.A.; CAVALCANTE, I.J.M.; SANTOS, K.A.; CAMPOS, D.A.; VALE, C.A.L.; SILVA, R.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Medica**, v. 72, n.1, p. 34-39, 2006.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DeltaDeltaCT method. **Methods**, v. 25, p. 402 – 408, 2001.
- LODISH, H.; KAISER, C.A.; BERK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P.; SCOTT, M.P. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LOWE, C.E.; O'RAHILLY, S.; ROCHFORD, J.J. Adipogenesis at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 2681 - 2686, 2011.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.
- LUDWIG, R.G.; ROCHA, A.L.; MORI, M.A. Circulating Molecules that Control Brown/Beige Adipocyte Differentiation and Thermogenic Capacity. **Cell biology international**, p.1-23, 2018. Disponível online.
- LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 3, p. 77 – 99, 2016.
- MA, X.; LEE, P.; CHISHOLM, D.J.; JAMES, D.E. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1-8, 2015.
- MAHMOOD, T.; YANG, P. Western Blot: Technique, theory and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, p. 429 - 434, 2012.
- MANCINI, M.C.; De MELO, M.E. The burden of obesity in the current world and the new treatments available: focus on liraglutide 3.0 mg. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, p. 1 – 14, 2017.

MANCINI, M.C.; NETO, B.G.; SALLES, J.E.N.; DE LIMA, J.G.; CARRA, M.K. **Tratado de Obesidade**. 1 ed. Itapevi: AC Farmacêutica, 2010.

MARTIN, K.A.; MANI, M.V.; MANI, A. New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 64 – 74, 2015.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.L.; YETUKURI, L.; SHIMOMURA, K.; VIRTUE, S.; CAMPBELL, M.; CURTIS, R.K.; JIMENEZ-LINAN, M.; BLOUNT, M.; YEO, G.S.H.; LOPEZ, M.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; ASHCROFT, F.M.; ORESIC, M.; VIDAL-PUIG, A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. **Plos Genetics**, v. 3, p. 634-647, 2007.

MELO, C.M.; CARVALHO, K.M.M.B.; NEVES, J.C.S.; MORAIS, T.C.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A.; BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H. α,β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, p. 4272 - 4280, 2010a.

MELO, C.L.; QUEIROZ, M.G.; FONSECA, S.G.; BIZERRA, A.M.; LEMOS, T.L.; MELO, T.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n.1, p. 59-65, 2010b.

MELO, C.M.; MORAIS, T.C.; TOMÉ, A.R.; BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation research**, v. 60, p. 673-681, 2011.

MIR, S.A.; SHAH, M.A.; GANAI, S.A.; AHMAD, T.; GANI, M. Understanding the role of active components from plant sources in obesity management. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.04.003>.

MOHAMED, G.A.; IBRAHIM, S.R.M.; ELKHAYAT, E.S.; DINE, R.S.E. Natural anti-obesity agents. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v.52, n.2, p.269-284, 2014.

MORRISON, S.; MCGEE, S.L. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. **Adipocyte**, v.4, p. 295-302, 2015.

MOSA, R.A.; NAIDOO, J.J.; NKOMO, F.S.; MAZIBUKO, S.E.; MULLER, C.J.; OPOKU, A.R. In vitro antihyperlipidemic potential of triterpenes from stem bark of *Protorhus longifolia*. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1685-1691, 2014.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1 – 24, 2016.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

MUELLER, E. Understanding the variegation of fat: Novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 3, p. 352-357, 2014.

NARENDER, T.; KHALIK, T.; SINGH, A.B.; JOSHI, M.D.; MISHRA, P.; CHATURVEDI, J.P.; SRIVASTAVA, A.K.; MAURYA, R.; AGARWAL, S.C. Syntesis of α -amyrin derivates and their in vivo antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1215-1222, 2009.

NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L.P. Obesity: current and potential pharmacotherapeutics and targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 170, p. 116-147, 2017.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; FLORENCIO, M.G.; LIMA, R.C.J.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β - Amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v. 70, p. 780 – 782, 2004b.

OLIVEIRA, F.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Pentacyclic triterpenoids, α,β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 719 – 725, 2004c.

OLIVEIRA, F.A.; COSTA, C.L.S.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; CAVALCANTE, I.J.M.; LIMA, A.F.; LIMA Jr., R.C.P.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, Fortaleza, v.77, p. 2942-2952, 2005a.

OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.A.C.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of α - and β - amyrin, a triterpen mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Fortaleza, v.98, p. 103 – 108, 2005b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesity and overweight**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 30 out. 2017.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase pathways. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Florianópolis, v. 313, p. 310–318, 2005.

PAN, M.; HUNG, W. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Matrix Metalloproteinase-2 via Suppression of the ERK/Sp1-mediated Transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 32775 – 32780, 2002.

PÉREZ-JÍMENEZ, A.; RUFINO-PALOMARES, E.E.; GALLEGO, N.F.; ORTUÑO-COSTELA, M.C.; REYEZ-ZURITA, F.J.; PERAGÓN, J.; GARCÍA-SALGUERO, L.; MOKHTARI, K.; MEDINA, P.P.; LUPIÁÑEZ, J.A. Target molecules in 3T3-L1 adipocytes differentiation are regulated by maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea*. **Phytomedicine**, v. 23, n.12, p. 1301-1311, 2016.

PICKETT-BLAKELY, O.; NEWBERRY, C. Future Therapies in Obesity. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.45, n.4, p. 705-714, 2016.

QUEIROZ, J.C.F.; ALONSO-VALE, M.I.C.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582 - 594, 2009.

RAMÍREZ-ZACARÍAS, J.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; KURI-HARCUCH, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O. **Histochemistry**, v. 97, p. 493 – 497, 1992.

RODRÍGUEZ, A.; EZQUERRO, S.; MÉNDEZ-GÍMENEZ, L.; BECERRIL, S.; FRÜHBECK, G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **American Journal of physiology, endocrinology and metabolism**, v. 309, p. 691-714, 2015.

ROSEN, E.D.; WALKEY, C.J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes and development**, Boston, v.14, p.1293 – 1307, 2000.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, p. 20 – 44, 2014.

RUIZ-OJEDA, F.J.; RUPÉREZ, A.I.; GOMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A.; AGUILERA, C.M. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D.A. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1842, p. 340 – 351, 2014.

SANTOS, F.A.; FROTA, J.T.; ARRUDA, B.R.; MELO, T.S.; SILVA, A.A.; BRITO, G.A.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, 2012.

SARAF, N.; SHARMA, P.K.; MONDAL, S.C.; GARG, V.K.; SINGH, A.K. Role of PPAR γ 2 transcription factor in thiazolidinedione-induced insulin sensitization. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 161-171, 2011.

SAUNDERS, K.H.; UMASHANKER, D.; IGEL, L.I.; KUMAR, R.B.; ARONNE, L.J. Obesity Pharmacotherapy. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n.1, p. 135-148, 2018.

SAUNDERS, K.H.; SHUKLA, A.P.; IGEL, L.I.; KUMAR, R.B.; ARONNE, L.J. Pharmacotherapy for Obesity. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 45, n.3, p. 521–538, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Tratamento da Obesidade e a Nova RDC 133/2016. Disponível em <http://www.endocrino.org.br/tratamento-da-obesidade-nova-rdc/> Acesso em 31 out. 2017.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA Jr., O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory- related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 57-69, 1999.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MONTEIRO, S.S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, R.O.A. Essential oils of the oleo resins from *Protium heptaphyllum* growing in the Brazilian South eastern and their cytotoxicity to neoplastic cells lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Rio de Janeiro, v.14, p. 373-378, 2011.

SIMÃO, A.A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. 2013. 182f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SINGH, A.B.; YADAV, D.K.; MAURYA, R.; SRIVASTAVA, A.K. Antihyperglycaemic activity of α -amyrin acetate in rats and db/db mice. **Natural Product Research**, v. 23, p. 876-882, 2009.

SIRAJ, F.M.; SATHISHKUMAR, N.; KIM, Y.J.; KIM, S.Y.; YANG, D.C. Ginsenoside F2 possesses anti-obesity activity via binding with PPAR γ and inhibiting adipocyte differentiation in the 3T3-L1 cell line. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n.1, p. 9-14, 2015.

SHYH, G.; CHENG-LAI, A. New antiobesity agents: lorcaserin (Belviq) and phentermine/topiramate ER (Qsymia). **Cardiology in review**, v.22, n.1, p. 43-50, 2014.

SUNG, H. ; HONG, C.; SUH, Y.; CHO, H.; PARK, J.; BAE, J.; PARK, W.; HAN, J.; SONG, D. Role of (–)-epigallocatechin-3-gallate in cell viability, lipogenesis, and retinol-binding protein 4 expression in adipocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 303 – 310, 2010a.

SUNG, H.; KANG, S.; KIM, J.; LI, J.; LEE, E.; GONG, J.; HAN, S.J.; KANG, Y. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. **Nutrition Research**, v. 30, p. 831-839, 2010b.

TANG, Q.Q.; LANE, M.D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual review of biochemistry**, v.81, p. 715-736, 2012.

TAYLOR, P.; ARSENAK, M.; ABAD, M.J.; FERNÁNDEZ, A.; MILANO, B.; GONTO, R.; RUIZ, M.; FRAILE, S.; TAYLOR, S.; ESTRADA, O.; MICHELANGELI, F. Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic activity against Tumor Cell Lines. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 530- 539, 2013.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.76, p. 4350 - 4354, 1979.

TUNG, Y.; HSIEH, P.; PAN, M.; HO, C. Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, p. 100 – 110, 2017.

UMASHANKER, D.; IGEL, L.I.; KUMAR, R.B.; ARONNE, L.J. **Current and Future Medical Treatment of Obesity**, v. 27, p. 181 – 190, 2017.

VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; BATISTA, A.L.; CHANG, M.R.; POTT, V.J.; GARCEZ, F.R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campo Grande, v. 43, p. 1302-1308, 2012.

VITOR, C.E.; FIGUEIREDO, C.P.; HARA, D.B.; BENTO, A.F.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO, J.B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenos, α - and β - amyrin, in a mouse model of colitis. **British Journal of Pharmacology**, v.157, p. 1034-1044, 2009.

WANG, S.; ZHAI, C.; LIU, Q.; WANG, X.; REN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WU, Q.; SUN, S.; LI, S.; QIAO, Y. Cycloastragenol, a triterpene aglycone derived from *Radix astragali*, suppresses the accumulation of cytoplasmic lipid droplet in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n.1, p. 306-311, 2014.

WANG, Y.; QU, X.; YANG, Y.; HAN, X.; WANG, L.; QIAO, H.; FAN, Q.; TANG, T.; DAI, K. AMPK promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis through AMPK-Gfi1-OPN axis. **Cellular signaling**, v.28, n.9, p. 1270 – 1282, 2016.

WATANABE, T.; HATA, K.; HIWATASHI, K.; HORI, K.; SUZUKI, N.; ITOH, H. Suppression of murine preadipocyte differentiation and reduction of visceral fat accumulation by a *Petasitesjaponicus* ethanol extract in mice fed a high-fat diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.74, p. 499 - 503, 2010.

WHARTON, S. Current Perspectives on Long-term Obesity Pharmacotherapy. **Canadian journal of diabetes**, v. 40, p. 184 – 191, 2016.

WILLIAMS, D.J.; EDWARDS, D.; HAMERNIG, I.; JIAN, L.; JAMES, A.P.; JOHNSON, S.K.; TAPSELL, L.C. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 323-333, 2013.

YUN, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – a review. **Phytochemistry**, v.71, n. 14-15, p. 1625-1641, 2010.

APÊNDICE – SOLUÇÕES

Cultura de células

PBS (*phosphate buffer solution*, pH 7,2)

Para 500 mL de PBS 10x

40 g de NaCl

1 g de KCl

5,75 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Western Blot

Tampão de corrida – TGS 10x (pH 8,3), BioRad Laboratories

Trizma base 25mM

Glicina 192 mM

SDS 0,1%

Tampão de transferência – TG 10x (pH 8,3), BioRad Laboratories

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

Metanol 20%

Tampão de amostra (Laemmli) 5x (Eletroforese)

0,3786 g de Trizma base.

1 g de SDS

5 mL de Glicerol

0,05 g de azul de bromofenol

1 mL de β -mercaptoetanol

Completar com água destilada para 10 mL

TBS (*Tris-Buffered saline*) 10x, pH 7,6

60,6 g de TRIS

87,6 g de NaCl

Completar o volume para 1L após aferição do pH.

Para TBST 1x (*Tris-Buffered saline with Tween 20*)

900 mL H₂O destilada + 100 mL TBS 10x + 1 mL Tween 20