



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ROSE ANNY COSTA SILVA RIPARDO**

**EFEITO DOS TRITERPENOS ÁCIDO OLEANÓLICO, ÁCIDO URSÓLICO E  
ALFA, BETA-AMIRINA NO DISTÚRBO METABÓLICO INDUZIDO POR  
OLANZAPINA EM CAMUNDONGOS E EM CÉLULAS 3T3-L1**

**FORTALEZA**

**2021**

ROSE ANNY COSTA SILVA RIPARDO

EFEITO DOS TRITERPENOS ÁCIDO OLEANÓLICO, ÁCIDO URSÓLICO E  
ALFA, BETA-AMIRINA NO DISTÚRPIO METABÓLICO INDUZIDO POR  
OLANZAPINA EM CAMUNDONGOS E EM CÉLULAS 3T3-L1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Flávia Almeida Santos.

FORTALEZA

2021

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)

---

- R455c Ripardo, Rose Anny Costa Silva.  
Efeito dos triterpenos ácido oleanólico, ácido ursólico e alfa, beta-amirina no distúrbio metabólico induzido por olanzapina em camundongos e em células 3t3-l1 / Rose Anny Costa Silva Ripardo. – 2021.  
132 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.
1. ácido oleanólico. 2. triterpenos pentacíclicos. 3. olanzapina. 4. resistência à insulina. 5. ganho de peso.  
I. Título.

CDD 610

---

ROSE ANNY COSTA SILVA RIPARDO

EFEITO DOS TRITERPENOS ÁCIDO OLEANÓLICO, ÁCIDO URSÓLICO E  
ALFA, BETA-AMIRINA NO DISTÚRBO METABÓLICO INDUZIDO POR  
OLANZAPINA EM CAMUNDONGOS E EM CÉLULAS 3T3-L1

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas da  
Universidade Federal do Ceará, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: **25/08/2021**.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Binda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Rosa Pinto Quidute  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira  
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Francilene Vieira Da Silva Freitas  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

A Deus, tudo é para Ele e por Ele.  
Ao meu marido Bruno Ripardo e filha  
Julia Maria, pessoas mais importantes da  
minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do mundo e Pai amado, por me dar muito mais do que eu preciso, por me abençoar com muito mais do que eu mereço, por me presentear com os dons necessários para a conclusão deste trabalho.

À professora Flávia Almeida Santos, pela impecável orientação no decorrer desses anos, pelo acolhimento em seu laboratório. Agradeço pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim.

Ao meu esposo e amor da minha vida, Bruno Ripardo, o principal responsável por eu ter chegado até aqui, que me deu forças nos momentos difíceis e fez todo o meu percurso ser mais leve.

À minha amada filha, Julia Maria, que me mostrou o real sentido da vida, me fazendo querer sempre ser uma melhor pessoa.

Aos meus pais, Ana Rosa e Henrique Silva, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida. Por nunca terem medidos esforços para a minha felicidade, por me mostrarem que o trabalho dignifica o homem e que o árduo estudo é o único caminho válido.

À minha irmã e ao meu cunhado, Rose Heidi e Marcel Novais, pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos meus sogros, Evilásio e Marilene Ripardo, que me acolheram como filha e não mediram esforços para me ajudar a chegar ao fim desse projeto, sendo sempre tão solícitos e de corações imensos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), tenho a alegria de dizer que os dias no laboratório foram mais felizes com vocês. À Tuelly Bandeira, que se tornou uma grande amiga, com quem compartilhei todas as angústias acadêmicas. Aos companheiros Iury Nunes, Renan Lima, Gabrielle de Paula e Ana Virgínia, pela ajuda tanto nos experimentos no laboratório, quanto pelas excelentes companhias nas tardes de trabalho. Aos colegas que passaram pelo LPN e deixaram sua marca neste trabalho: Karina Moura, Ana Flávia Seraine, Amanda Braga, Ana Luiza Quinderé, Luri Sasahara e Thais Moreira, cada uma contribuiu de forma especial na finalização desta tese.

Aos meus amigos, Thaminne Felix, Aparecida Josino, Felipe Peixoto, Gustavo Barbosa, Marianne Rabelo e Joanita Leite, que de perto ou de longe fisicamente, me incentivaram e confiaram em meu potencial.

Ao Laboratório Multiusuário da Universidade Federal do Ceará.

Ao Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Ceará.

Ao Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

À Universidade Federal do Ceará, ao corpo docente, pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos ao longo da graduação, mestrado e doutorado.

Muito obrigada!

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas  
voa alto para alcançar a sabedoria.”  
(Santo Agostinho).

## RESUMO

A olanzapina (OLZ) é um fármaco antipsicótico atípico utilizado no tratamento da esquizofrenia que possui efeitos adversos metabólicos como o ganho de peso, a hiperglicemia e a resistência insulínica. No presente estudo, avaliou-se o efeito protetor dos triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU) e alfa, beta-amirina (AMI) nos distúrbios metabólicos causados pelo uso da OLZ em modelos experimentais *in vivo* em camundongos C57BL6 e *in vitro* em células 3T3-L1. Os camundongos foram divididos em cinco grupos: alimentados com dieta padrão (DP); alimentados com a dieta associada à OLZ (DO); alimentados com DO e tratados com AO (20 mg/kg, v.o), AU (10 mg/kg, v.o) e AMI (20 mg/kg, v.o), na água de beber durante as últimas seis, das nove semanas de tratamento. Foi realizado o teste comportamental de campo aberto e o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI) uma semana antes do fim dos tratamentos. Após o sacrifício dos animais, foram realizadas análises séricas e teciduais com os materiais coletados. No teste de campo aberto o número de cruzamentos e o número de eventos de autolimpeza diminuíram com o tratamento com OLZ, como já era esperado. Porém os tratamentos AO e AMI causaram aumento no número de cruzamentos, obtendo resultados próximos ao grupo DP. Já o tratamento com AU não gerou alterações comportamentais em relação ao grupo DO. Os animais dos grupos AO e AMI demonstraram diminuição significativa do peso corporal, no IMC, assim como no peso do fígado em relação ao grupo DO. Além disso, o tratamento com AO aumentou o peso da gordura subescapular, que havia sido reduzido pelo tratamento com OLZ. Os tratamentos com os triterpenos AO, AU e AMI reverteram o aumento do nível plasmático de glicose causado pela OLZ no grupo DO. Porém, apenas o grupo AO conseguiu regularizar os níveis plasmáticos de insulina, diminuir o índice de HOMA-IR e a área sob a curva no TTGI, além de aumentar o glicogênio hepático, revertendo assim, a resistência à insulina e à glicose causada pelo tratamento com OLZ. Pelos melhores resultados metabólicos nos animais, a histologia e os testes de *Western blot* seguiram apenas com o triterpeno AO. Não houve diferença entre os grupos tanto na histologia hepática quanto na do tecido adiposo. O grupo DO teve aumento na expressão de p-IRS (ser307) e diminuição significativa da expressão p-AKT no fígado, com conseqüente diminuição da expressão do mGLUT no músculo em relação ao DP, alterações estas revertidas pelo tratamento com AO. Em modelo celular com pré-adipócitos 3T3-L1, as concentrações não tóxicas utilizadas foram: AO = 6,25; 12,5; 25  $\mu$ M; AU = 3,125; 6,25; 12,5  $\mu$ M e AMI = 12,5; 25; 50  $\mu$ M. As células sofreram adipogênese com o tratamento com OLZ 10  $\mu$ M de forma semelhante ao controle positivo, rosiglitazona 2  $\mu$ M. Houve aumento de conteúdo lipídico intracelular, alteração revertida por praticamente todos os tratamentos testados. A OLZ também aumentou os triglicérides e colesterol total intracelular. Todas as doses testadas de AO conseguiram reduzir estes parâmetros nas células, resultado não visto nos tratamentos com AU e AMI. Pelos melhores resultados bioquímicos nas células, os testes de *Western blot* seguiram apenas com o triterpeno AO. Em relação à expressão proteica, notou-se que o tratamento com OLZ aumentou a expressão de SREBP-1 e FAS e diminuiu a expressão de pAMPK/AMPK. A dose de 25  $\mu$ M de AO conseguiu regularizar todas as expressões alteradas pelo tratamento com OLZ. Dessa forma, esses resultados indicam que, dentre os triterpenos testados, o AO é um adjuvante potencial para prevenir a disfunção metabólica, através da via PI3K/AKT, e o aumento de peso, pela via AMPK/SREBP-1, causados pelo uso da OLZ.

**Palavras-chave:** ácido oleanólico; ácido ursólico; alfa, beta-amirina; olanzapina; ganho de peso; resistência insulínica.

## ABSTRACT

Olanzapine (OLZ) is an atypical antipsychotic drug used in the treatment of schizophrenia that has adverse metabolic effects such as: weight gain, hyperglycemia and insulin resistance. In the present study, the protective effect of pentacyclic triterpenes oleanolic acid (AO), ursolic acid (AU) and alpha, beta-amirine (AMI) on metabolic disorders caused by the administration of OLZ in experimental models in mice C57BL6 and in 3T3-L1 cells was evaluated. The mice were divided into 5 groups: fed with standard diet (DP), fed with the diet associated with OLZ (DO), fed with DO and treated with AO (20 mg/kg), AU (10 mg/kg) and AMI (20 mg/kg), in drinking water during the last 6 of the 9 weeks of treatment. The open field behavioral test and the intraperitoneal glucose tolerance test (TTGI) were performed one week before the end of the treatments. After the animals were euthanized, serum and tissue analysis were performed with the collected materials. The number of crossings in the open field test increased with the AO and AMI treatments, when compared to the DO group, obtaining results close to the DP group. AU treatment, on the other hand, did not generate behavioral changes in comparison to the DO group. The animals in the AO and AMI groups showed a significant decrease in body weight, in BMI, as well as in the weight of the liver regarding the DO group. In addition, treatment with AO increased the weight of subscapular fat in contrast to the DO group. The treatments with the AO, AU and AMI triterpenes reversed the increase in the plasma glucose level caused by OLZ in the DO group. However, only treatment with AO managed to regulate plasma insulin levels, decreased the HOMA-IR index and the area under the curve in the intraperitoneal glucose tolerance test, in addition to increasing hepatic glycogen, thus reversing insulin and glucose resistance caused by treatment with OLZ. Due to the better metabolic results in the animals, the histology and the Western blot tests followed only with the AO triterpene. There was not difference in the histology between the groups in both hepatic or adipose tissue. The DO group had an increase in the expression of p-IRS (ser307) and a significant decrease in the expression of p-AKT in the liver, with consequent decrease in mGLUT expression in muscle when compared to DP, changes that were reversed by the treatment with AO. In a cell model with 3T3-L1 pre-adipocytes, the non-toxic concentrations used were AO = 6.25; 12.5; 25  $\mu$ M; AU = 3.125; 6.25; 12.5  $\mu$ M; and AMI = 12.5; 25; 50  $\mu$ M. The cells underwent adipogenesis with the treatment with OLZ 10  $\mu$ M in a similar way to the positive control, rosiglitazone 2  $\mu$ M. There was an increase in intracellular lipid content, which was reversed by practically all tested treatments. OLZ also increased triglycerides and intracellular total cholesterol. All the tested doses of AO managed to reduce these parameters in the cells, a result not seen in the treatments with AU and AMI. For the best biochemical results in the cells, Western blot tests followed only with the AO triterpene. Regarding protein expression, it was noted that treatment with OLZ increased the expression of SREBP-1 and FAS and decreased the expression of pAMPK / AMPK. The 25  $\mu$ M dose of AO was able to regulate all expressions altered by the treatment with OLZ. Thus, these results indicate that, among the tested triterpenes, AO is a potential adjuvant to prevent metabolic dysfunction, through the PI3K / AKT pathway, and weight gain, through the AMPK / SREBP-1 pathway, caused by the administration of OLZ.

**Keywords:** oleanolic acid; ursolic acid; alpha, beta-amirine; olanzapine; weight gain; insulin resistance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência da obesidade (IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> ) no Brasil em adultos nos últimos treze anos (2006-2018) .....	17
Figura 2.	Distribuição do tecido adiposo branco e marrom no organismo humano e características dos adipócitos.....	21
Figura 3.	Mecanismo da expansão do tecido adiposo por desequilíbrio do consumo energético.....	25
Figura 4.	Controle central da homeostase energética .....	27
Figura 5.	Processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.....	30
Figura 6.	Representação esquemática das principais vias de sinalização que aumentam a translocação de GLUT-4 por estímulo da insulina.....	33
Figura 7.	Exemplos de frutas e vegetais contendo os triterpenos: ácido oleanólico e ácido ursólico .....	40
Figura 8.	Resina extraída da <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) .....	43
Figura 9.	Estrutura química dos constituintes triterpênicos da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> .....	44
Figura 10.	Representação esquemática do delineamento experimental <i>in vivo</i> . .....	51
Figura 11.	Representação esquemática do delineamento experimental <i>in vitro</i> .....	56
Figura 12.	Efeito da olanzapina e de ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina no teste de campo aberto em camundongos C57BL6 .....	60
Figura 13.	Evolução do peso corporal de animais C57BL/6 em dieta com olanzapina por 9 semanas .....	63
Figura 14.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina sobre a tolerância a glicose durante dieta associada à olanzapina. (A) Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal de 0 a 120 min, (B) Área sobre a curva (AUC) .....	68
Figura 15.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina sobre o glicogênio hepático (A) e muscular (B) após dieta com OLZ .....	70

Figura 16.	Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos à dieta associada à olanzapina e tratamento com ácido oleanólico ....	72
Figura 17.	Fotomicrografia representativa do tecido adiposo de animais submetidos à dieta associada à olanzapina e tratamento com ácido oleanólico.....	73
Figura 18.	Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica hepática de pIRS-1 (A), PI3K (B) e pAKT (C) após dieta com OLZ .....	74
Figura 19.	Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica muscular de GLUT-4 após dieta com olanzapina .....	75
Figura 20.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina sobre a viabilidade de células 3T3-L1 .....	77
Figura 21.	Fotomicrografias de células 3T3-L1 diferenciadas com olanzapina e submetidas à coloração com <i>Oil Red O</i> após tratamento com ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina .....	79
Figura 22.	Quantificação dos níveis lipídicos de células 3T3-L1 diferenciadas por olanzapina, tratadas com ácido oleanólico (A), ácido ursólico (B) e $\alpha$ , $\beta$ -amirina (C) e coradas com <i>Oil Red O</i> .....	80
Figura 23.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina sobre o acúmulo intracelular de (A) triglicerídeos e (B) colesterol total durante diferenciação de células 3T3-L1 com olanzapina .....	82
Figura 24.	Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica de PPAR $\gamma$ (A), SREBP-1 (B), pAMPK/AMPK (C) e FAS (D) em células 3T3-L1 diferenciadas .....	85
Figura 25.	Esquema representativo e resumido dos mecanismos de ação do ácido oleanólico na proteção dos distúrbios metabólicos causados pela olanzapina .....	104
Figura 26.	Esquema representativo e resumido dos mecanismos de ação do ácido oleanólico na alteração da adipogênese causada pela olanzapina .....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação internacional de sobrepeso e obesidade de acordo com o IMC para adultos.....	19
Tabela 2.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina no peso corporal, IMC, consumo de ração, consumo de água durante dieta associada à olanzapina .....	62
Tabela 3.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea após dieta associada à olanzapina .....	65
Tabela 4.	Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ , $\beta$ -amirina nos parâmetros séricos após dieta associada à olanzapina .....	67
Tabela 5.	Resumo dos resultados em camundongos C57BL6 em relação ao grupo dieta associada à olanzapina .....	71
Tabela 6.	Resumo dos resultados em células 3T3-L1 em relação ao grupo olanzapina .....	83

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5HT	Serotonina
ACAT	Colesterol acetiltransferase
ACC	Acetil coenzima A carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína serina/treonina cinase B
AMI	$\alpha$ , $\beta$ -amirina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
AUC	Área sobre a curva
C/EBP	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
CPT1	Carnitina palmitoil transferase-1
CT	Colesterol total
CTM	Células tronco mesenquimais
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DO	Dieta associada á olanzapina
DP	Dieta padrão
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Ácidos graxos sintase
GLUT-4	Proteína transportadora de glicose -4
GSH	Glutationa reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase – resistência à insulina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IL	Interleucina

IMC	Índice de massa corporal
IRS	Substratos do receptor de insulina
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
MDA	Malondialdeído
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
OLZ	Olanzapina
PDK-1	Cinase fosfatidil Inositol dependente 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPAR $\gamma$	Receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
RI	Resistência á insulina
SCAP	Proteína ativada pela clivagem de SREBP
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SREBP	Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis
SUS	Sistema único de saúde
TAB	Tecido adiposo branco
TABe	Tecido adiposo bege
TAM	Tecido adiposo marrom
TAR	Tecido adiposo rosa
TBST	Solução salina tamponada com tris e tween
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TTGI	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
TZD	Tiazolidinedionas
UCP-1	Proteína desacopladora 1
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Obesidade .....	16
1.1.1 Visão Geral.....	16
1.1.2 Fisiopatologia.....	20
1.1.3 Adipogênese.....	27
1.2 Resistência Insulínica .....	30
1.3 Obesidade e Resistência Insulínica Induzida Por Fármacos .....	34
1.4 Olanzapina .....	36
1.5 Triterpenos .....	39
1.5.1 Ácido Oleanólico .....	40
1.5.2 Ácido Ursólico .....	42
1.5.3 $\alpha$ , $\beta$ -amirina .....	43
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>46</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
4.1 Drogas e Reagentes.....	48
4.2 Obtenção da Olanzapina .....	49
4.3 Animais.....	49
4.4 Composição das Dietas .....	50
4.5 Protocolo Experimental Animal .....	50
4.5.1 Testes comportamentais .....	51
4.5.2 Consumo de água e ração e acompanhamento do peso corporal .....	52
4.5.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal .....	52
4.5.4 Coleta de sangue, tecidos e órgão .....	52
4.5.5 Análises séricas .....	53
4.5.6 Análises teciduais.....	53
4.6 Protocolo Experimental em Células .....	56
4.6.1 Cultura de Células .....	56
4.6.2 Indução da adipogênese em células 3T3-L1 .....	57

4.6.3 Ensaio de viabilidade celular .....	57
4.6.4 Avaliação do efeito dos triterpenos na adipogênese induzida por olanzapina em células 3T3-L1.....	58
4.6.5 Quantificação de colesterol e triglicerídeos intracelulares.....	58
4.6.6 Determinação de proteínas de sinalização do metabolismo lipídico .....	59
4.7 Análise Estatística.....	59
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
5.1 Alterações comportamentais .....	60
5.2 Peso corporal, medidas murinométricas e consumo de água e ração durante dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	61
5.3 Peso do fígado e da gordura corporal após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6.....	64
5.4 Parâmetros plasmáticos após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	66
5.5 Teste de tolerância à glicose durante dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	68
5.6 Níveis de glicogênio hepático e muscular após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	69
5.7 Avaliação das alterações histológicas do tecido hepático e tecido adiposo após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	72
5.8 Avaliação da expressão proteica hepática de pIRS-1, PI3K e pAKT após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6 .....	73
5.9 Avaliação da expressão proteica muscular de GLUT-4 após dieta com olanzapina em C57BL/6 .....	75
5.10 Viabilidade celular em células 3T3-L1 .....	76
5.11 Efeito dos triterpenos sobre a diferenciação de 3T3-L1 induzida por olanzapina .....	78
5.12 Quantificação de colesterol total e triglicerídeos intracelulares em células 3T3-L1 .....	81
5.13 Avaliação da expressão proteica de fatores de transcrição da adipogênese em células 3T3-L1 .....	84
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO I - ESPECTRO DE RMN DA OLANZAPINA .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO II – FOLHAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>130</b>

## 1. INTRODUÇÃO

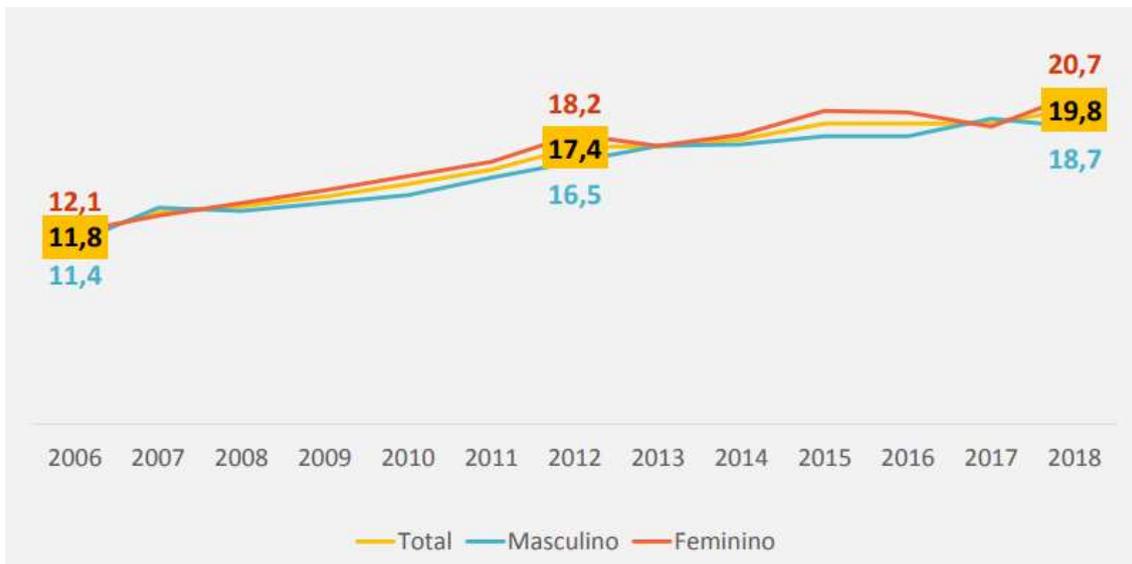
### 1.1. Obesidade

#### 1.1.1. Visão Geral

A obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. A causa fundamental para a obesidade e o sobrepeso é o crônico balanço energético positivo, e este ocorre quando as calorias consumidas são maiores que as calorias gastas. Nas últimas décadas, a prevalência da obesidade tem aumentado em todo o mundo, alcançando proporções epidêmicas. Em 2016, mais que 1,9 bilhões de adultos em todo o mundo tinham sobrepeso ( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ ), desses, quase 650 milhões são clinicamente obesos ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ). No geral, cerca de 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres) estava obesa em 2016. A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1980 e 2016, demonstrando a atual relevância desse problema (OMS, 2018). O aumento da epidemia de obesidade na população mundial gera um grande temor na área da saúde, pois a obesidade está claramente associada ao aumento de risco para desenvolvimento de diabetes, hipertensão, hiperlipidemia e osteoartrite, entre outras causas de morbidade e de mortalidade (KARAKURT *et al.*, 2019).

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade vêm aumentando em todas as faixas etárias e em ambos os sexos, em todos os níveis de renda, sendo a velocidade de crescimento mais expressiva na população com menor rendimento familiar. A pesquisa Vigitel 2019 (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 55,4% da população brasileira (maiores de 18 anos e residentes nas capitais e Distrito Federal) e a obesidade atinge 20,3%. Entre as mulheres, o percentual de excesso de peso foi de 53,9% e de obesidade, 20,3%. Houve um aumento de 67,8% na prevalência da obesidade de 2006 para os dias de hoje (Figura 1). Já entre os homens, o percentual de excesso de peso foi de 57,1% e o de obesidade, 20,3% (BRASIL, 2020).

Figura 1. Prevalência da obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) no Brasil em adultos nos últimos treze anos (2006-2018).



Fonte: Brasil, 2019.

O maior percentual de adultos (maiores de 18 anos) com excesso de peso foi observado na capital Manaus (60,9%), enquanto a menor frequência foi observada em Vitória (49,1%). A maior porcentagem de adultos obesos também foi observada na cidade de Manaus (23,4%), enquanto Palmas foi a capital que apresentou a menor porcentagem (15,4%) de pacientes obesos. Na cidade de Fortaleza, a pesquisa mostrou que a obesidade atinge 19,9% da população adulta, enquanto o excesso de peso atinge 55,6% (BRASIL, 2020).

Desde a década de 1990, a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN, 1999), do Ministério da Saúde, definiu diretrizes para organizar as ações de prevenção e tratamento da obesidade no SUS. Hoje em dia, o Ministério da Saúde estabeleceu a linha de cuidado para obesidade como parte da Rede de Atenção à Saúde das Pessoas com Doenças Crônicas (BRASIL, 2017). O risco de morte por obesidade é de 1,95 para cada 100.000 habitantes, além desta comorbidade ocupar o 4º lugar entre as internações pelo SUS por causas endócrinas, nutricionais e metabólicas em 2018 (BRASIL, 2020).

A quantidade de gordura presente na dieta da maioria das pessoas aumentou durante os últimos 50 anos. Aliado a isso, o baixo nível de atividade física da população, devido a formas de trabalho cada vez mais sedentárias, mudanças nos meios de transportes, aumento da urbanização, colaboram para explicar o aumento do peso corporal descrito nos dados acima (OMS, 2018).

A obesidade, portanto, pode ser considerada uma patologia multifatorial. Apesar de vários estudos sugerirem como causa principal da obesidade a ingestão anormal de alimentos, os hábitos alimentares (KUŽBICKA, RACHOŃ, 2013) e alguns outros parâmetros estão ganhando igual destaque nos estudos em andamento em todo o mundo, como a inatividade física (POJSKI, ESLAMI, 2018), os fatores genéticos (LOCKE *et al.*, 2015), os fatores socioeconômicos (WAGNER *et al.*, 2018) e os fatores psicológicos (MEHTA *et al.*, 2011).

Muitos indicadores antropométricos têm sido propostos para diagnosticar os riscos para a saúde levando em consideração o aumento da gordura corporal. O perímetro da cintura é uma das medidas propostas que atingem resultados mais próximos do real, já que os depósitos de gordura abdominal também causam, sozinhos, vários problemas de saúde, estando diretamente associado aos riscos cardiovasculares e outras doenças crônicas (VECCHIE *et al.*, 2018). A circunferência abdominal e a razão cintura-estatura (melhora o parâmetro isolado de perímetro da cintura, pois leva em conta a altura) são os parâmetros que consideram que a obesidade na região central está mais associada às doenças cardiovasculares (MILAGRES *et al.*, 2019). Porém, ainda hoje o indicador mais usado ainda é o índice de massa corporal (IMC).

O IMC é um índice simples de peso por altura, comumente usado para classificar sobrepeso e obesidade em adultos. É definido como o peso de uma pessoa em quilogramas dividido pelo quadrado da sua altura em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Ele permite definir para homens e mulheres valores médios de referência correspondentes a  $22,5 \text{ kg}/\text{m}^2$  e  $21,5 \text{ kg}/\text{m}^2$ , respectivamente. Esses valores permitem classificar os pacientes em obesos e não obesos (Tabela 1) (OMS, 2018). Entretanto esses valores não permitem distinguir massa muscular de tecido adiposo, fazendo-se necessária lançar mão de algum outro indicador.

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

<b>Classificação</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) – principais pontos de corte</b>
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, 2018.

Como consequência do excesso de peso, há um aumento do risco de adquirir diversas doenças não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer, como endométrio, mama, ovário, próstata, fígado, dentre outros. Em relação às crianças, a obesidade infantil está associada a uma maior chance de morte prematura, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, resistência à insulina e efeitos psicológicos (VECCHIE *et al.*, 2018).

Antes considerado um problema apenas em países desenvolvidos, o impacto das doenças crônicas está crescendo continuamente em países de baixa e média renda e vem gerando grandes efeitos adversos na qualidade de vida dos indivíduos afetados, além de impactos econômicos negativos para as famílias, comunidades e sociedades em geral. As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbidade e morte prematura em todo o mundo e contribuem substancialmente para o alto gasto com assistência médica e cuidados com a saúde (OMS, 2018).

A obesidade foi uma das doenças preexistentes associadas tanto ao aumento das complicações, quanto à morte no atual cenário de pandemia pelo COVID-19. Uma associação da maior mortalidade por COVID-19 na Itália em relação à China foi feita devido ao aumento da prevalência da obesidade em idosos na Itália em comparação com a China. Esta relação surge como possível resposta em meio a tantos questionamentos sobre a evolução desta doença (DIETZ, BURGOA, 2020). A obesidade foi o fator de risco que mais afetou o grupo etário menor de 60 anos no Brasil e nos Estados Unidos (BRASIL, 2020; LIGTHER *et al.*, 2020). Além disso, as condições que estão associadas à obesidade, como disfunções cardíacas e diabetes, são aquelas com maiores riscos de complicações (BRASIL, 2020).

### 1.1.2. Fisiopatologia

O tecido adiposo é o principal órgão de reserva de gordura e energia do organismo, sendo o responsável pela homeostase energética e termoregulação. Este reservatório é regulado por nervos, hormônios, nutrientes, mecanismos autócrinos e parácrinos, sendo considerado também um importante órgão endócrino com funções reguladoras em diversas vias neuroendócrinas. Este dinâmico tecido é capaz de expandir em resposta ao excesso de ingestão de alimentos, e de liberar nutriente pela lipólise em caso de escassez de comida (TRITES; CLUGSTON, 2019).

Parte desta regulação ocorre mediante inervação simpática e parassimpática. A inervação simpática está relacionada principalmente com as ações catabólicas, como a lipólise, mediada pela atividade dependente do receptor  $\beta$ -adrenérgico da lipase hormônio sensível. Por outro lado, a ativação parassimpática está envolvida em efeitos anabólicos, como a absorção de glicose e ácidos graxos estimulada pela insulina (YAMAGUSHI *et al.*, 2019).

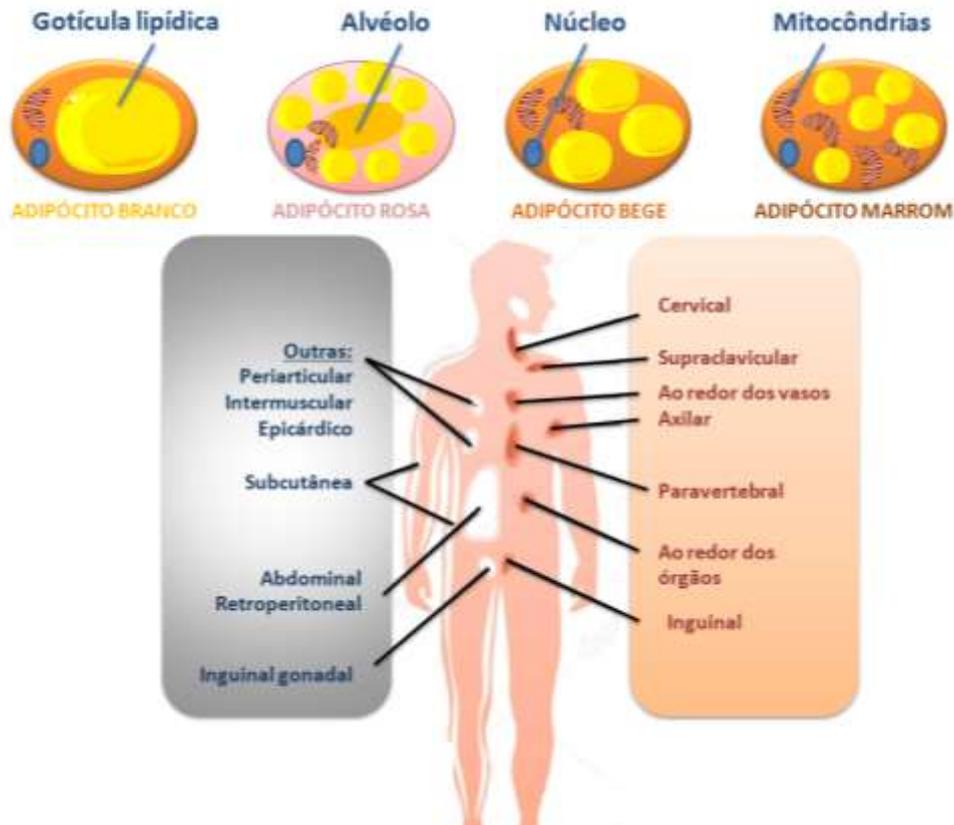
Histologicamente existem quatro tipos de tecido adiposo: tecido adiposo branco (TAB), que representa mais de 95% da massa adiposa; tecido adiposo marrom (TAM), que representa de 1 a 2% de gordura, ocorrendo nas regiões cervical, axilar e paraespinal; tecido adiposo bege (TABe), que é mais difícil quantificar, mas representa células intercaladas do TAB que são capazes de se transformar em adipócitos marrons após determinados estímulos; e o tecido adiposo rosa (TAR), que ocorre apenas em mulheres, permitindo a amamentação (Figura 2) (KAHN, WANG, LEE, 2019).

O tecido adiposo branco (TAB) ou tecido adiposo unilocular é o tipo predominante, além de ser um órgão endócrino ativo que secreta adipocinas, como adiponectina e leptina. Há suporte para que esses hormônios desempenhem um papel no balanço energético, na sensibilidade à insulina e no metabolismo da gordura. Este tecido também oferece proteção mecânica, fornecimento e armazenamento de energia através dos triglicerídeos (SULSTON; CAWTHORN, 2016). Ele é capaz de uma eficiente estocagem em períodos de abundância energética, e fundamental na sobrevivência durante a escassez (MARCELIN *et al.*, 2019).

Anatomicamente o TAB é classificado, principalmente, em tecido adiposo subcutâneo e visceral. O tecido adiposo subcutâneo está localizado sob as camadas dérmicas, onde protege contra o frio e isolamento físico. Já o tecido adiposo visceral encontra-se na cavidade intra-abdominal e é capaz de se comunicar com os demais órgãos devido a proximidade. Apesar de serem morfologicamente semelhantes, estudos mostram que, em relação à regulação metabólica, estes tecidos têm características distintas (HWANG, KIM, 2019). Em

humanos obesos, a gordura visceral expandida é diretamente relacionada a elevado risco de distúrbios metabólicos. Esta relação não é observada em obesos com tecido adiposo subcutâneo expandido (COUTINHO *et al.*, 2011).

Figura 2. Características dos adipócitos e distribuição do tecido adiposo branco e marrom no organismo humano.



Fonte: o autor.

O tecido adiposo marrom (TAM) ou tecido adiposo multilocular participa ativamente na regulação da temperatura corporal (termogênese) pela geração de calor através da proteína desacopladora 1 (UCP-1). Os adipócitos marrons possuem morfologia multilocular, ou seja, seu citoplasma contém inúmeras gotículas de lipídeos. Além disso, a alta concentração de citocromo oxidase nas mitocôndrias contribui para o escurecimento dessa célula (NAVARRETE; REAL, 2019). Por meio da queima de lipídeos, esse tecido combate a hipotermia e a obesidade. Desta forma, a massa dele se correlaciona inversamente com a adiposidade, podendo desempenhar um importante papel na homeostase energética. Enquanto o TAB estoca energia na forma de triglicerídeos, o TAM dissipa energia na forma de calor (LUO; LIU, 2016).

O tecido adiposo bege (TABe) foi nomeado assim em função de sua coloração se assemelhar à cor castanha/bege pelo aumento de UCPI. Estímulos termogênicos, como condições de frio e/ou ativação do receptor  $\beta$ 3-adrenérgico, dão origem à formação de adipócitos bege em depósitos de gordura subcutânea. Dessa forma, há um escurecimento das células adiposas inicialmente brancas, que passam a ter sua coloração bege em função da presença do ferro no oxigênio utilizado para gerar ATP (BONFANTE *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2019). Vários estudos demonstram a atividade do TAM e do TABe associada à proteção contra obesidade e desenvolvimento de doenças metabólicas (COHEN *et al.*, 2014; MARCELIN *et al.*, 2019).

Mais recentemente estudos relatam o surgimento de um novo subtipo de tecido adiposo, o tecido adiposo rosa (TAR). Este tecido pode ocorrer apenas em mulheres. Durante a gravidez, lactação e pós-lactação, os adipócitos brancos subcutâneos se convertem em glândulas produtoras de leite, formadas por elementos ricos em lipídios que podem ser definidos como adipócitos rosa. Elas são chamadas assim porque são células parenquimais do órgão adiposo contendo gotas de lipídeos citoplasmáticos grandes, com uma função específica: produção de leite. Na fase pós-lactação, os adipócitos rosas se convertem em adipócitos branco e marrom (CINTI, 2018).

Dentre estes tecidos, o TAB apresenta as funções mais abrangentes. Ele oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permite adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, é um excelente isolante térmico, tendo papel importante na manutenção da temperatura corporal, e, como já descrito, tem a capacidade de armazenar energia (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Além disso, este tecido também possui importante papel endócrino, realizando a secreção de proteínas importantes na regulação metabólica do organismo. Estas proteínas são denominadas adipocinas (MARCELIN *et al.*, 2019).

As adipocinas foram classificadas em uma variedade de grupos de proteínas com papéis na hemostasia/coagulação, pressão arterial, metabolismo lipídico, apetite e balanço energético, angiogênese, resistência à insulina, imunidade e inflamação/ resposta de fase aguda (CÔTE *et al.*, 2019). As adipocinas incluem moléculas pró-inflamatórias: a adipocina aP2 ativada por lipídios, resistina, visfatina, adiposina e leptina e mediadores anti-inflamatórios: proteínas relacionadas ao fator 1q/TNF (CTRP), omentina, apelina e adiponectina. Parece que, durante a obesidade há um desequilíbrio entre essas duas classes de mediadores, passando para o estado pró-inflamatório e, eventualmente, contribui para o desenvolvimento das doenças associadas (GONG *et al.*, 2018).

Dentre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, algumas tem importante papel na regulação metabólica, como a leptina, adiponectina, TNF-alfa e resistina.

A leptina sinaliza ao SNC sobre os estoques corporais de energia. Ela atua inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético total pela ativação de neurônios anorexígenos, que sintetizam os hormônios pró-ópio-melanocortina (POMC) e transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART). Além disso, a leptina age também sobre outra população de neurônios, dessa vez orexígenos, inibindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo agouti (AgRP), envolvidos no aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético (MA *et al.*, 2016). Somado a esta importante função energética, a leptina também modula a reprodução, a resposta imune, o controle da pressão sanguínea, a osteogênese, além de ser lipostática (SCWARTZ *et al.*, 2000; AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015). A teoria lipostática descreve que o tecido adiposo produz um sinalizador, a leptina, para o resto do organismo, que originalmente eram os triacilgliceróis e seus metabólitos, para a transmissão de informações referentes às reservas energéticas para o restante do corpo, e assim, regular o peso corporal (WANG, 2020).

A proteína produzida em mais abundância pelo tecido adiposo é a adiponectina, que ao contrário das demais adipocinas, age como fator protetor das doenças cardiovasculares. Dentre as moléculas de sinalização ativadas pela adiponectina está principalmente a proteína quinase ativada por adenosina fosfato (AMPK). Ela é responsável pelos efeitos metabólicos contra a resistência insulínica no fígado e nos rins, também está envolvida em ações mediadas por adiponectina nas células endoteliais vasculares e no coração, de maneira que é relatada como benéfica na proteção contra doenças cardiovasculares, como por exemplo, no estímulo da produção de NO (MAEDA *et al.*, 2020). Dessa forma, a adiponectina também participa da proteção vascular, por seu efeito modulador de NFκB e inibidor do TNF-α (OUCHI; WASH, 2007). Portanto, há uma correlação inversa entre níveis circulantes deste hormônio e o risco de obesidade, de resistência à insulina e de doenças cardiovasculares (MAEDA *et al.*, 2020).

O TNF-α é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória. Juntamente com outras citocinas da mesma classe, como IL-6, IL-1β e IL-8, está diretamente relacionada à indução da inflamação na obesidade. Existe uma forte correlação inversa entre TNF-α e metabolismo de glicose, devido à supressão pelo TNF-α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e da atividade da PI3K (fosfatidil-inositol-3-cinase), com redução da síntese e da translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana, e consequente diminuição na captação de glicose mediada pela insulina. Além disso, em relação aos adipócitos, age diretamente em processos dependentes de insulina,

incluindo a homeostase do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, além de parecer estar associada com mudança no número e volume de adipócitos (LIU, TIE; 2019)

Como já citado, outra função importante do TAB é estocar o excesso de calorias ingeridas na forma de triglicerídeos. Estes são uma forma energeticamente eficiente, com teor calórico mais de duas vezes superior por grama em comparação com carboidratos (glicogênio) ou proteínas, além do menor conteúdo de água. Os adipócitos possuem a maquinaria necessária para, dependendo do balanço energético, realizar lipólise ou lipogênese dos triglicerídeos.

A lipólise dos triglicerídeos, por meio da lipase lipoproteica (LPL), gera ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. Este processo ocorre principalmente pelo estímulo por glucagon ou por catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que geram a ativação da enzima lipase hormônio-sensível. O ácido graxo livre é uma significativa fonte de energia, fundamental para a homeostase energética. O destino do glicerol depende da necessidade energética do organismo, podendo ser facilmente convertido novamente em glicerol-3-fosfato por glicerol-quinases, para ser utilizado na síntese de acil-gliceróis, ou ser rapidamente incorporado na via glicolítica, formando piruvato caso haja necessidade energética (ATP) (ROTONDO *et al.*, 2017).

O acúmulo de lipídeos no TAB depende da captação de ácidos graxos livres, para posterior lipogênese. A lipogênese é a síntese de ácidos graxos esterificados que formam os triglicerídeos. A insulina é provavelmente o mais importante fator hormonal envolvido na regulação deste processo. Assim, em períodos prolongados de balanço energético positivo (quando a ingestão de energia é superior à sua despesa), o tecido adiposo responde recrutando pré-adipócitos que se proliferam e hipertrofiam para adipócitos maduros com consequente crescimento estromal e vascular (BAUTISTA *et al.*, 2019).

Da mesma forma, o balanço energético positivo aumenta a concentração de ácidos graxos livres na circulação sistêmica e no acúmulo de lipídios no músculo esquelético e no fígado, resultando em lipotoxicidade que aumenta a incidência de resistência insulínica (AHMED *et al.*, 2019), dislipidemia (FINGERET *et al.*, 2018), doença hepática gordurosa não alcoólica (POLYSOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019) e riscos cardíacos (GADDE *et al.*, 2018).

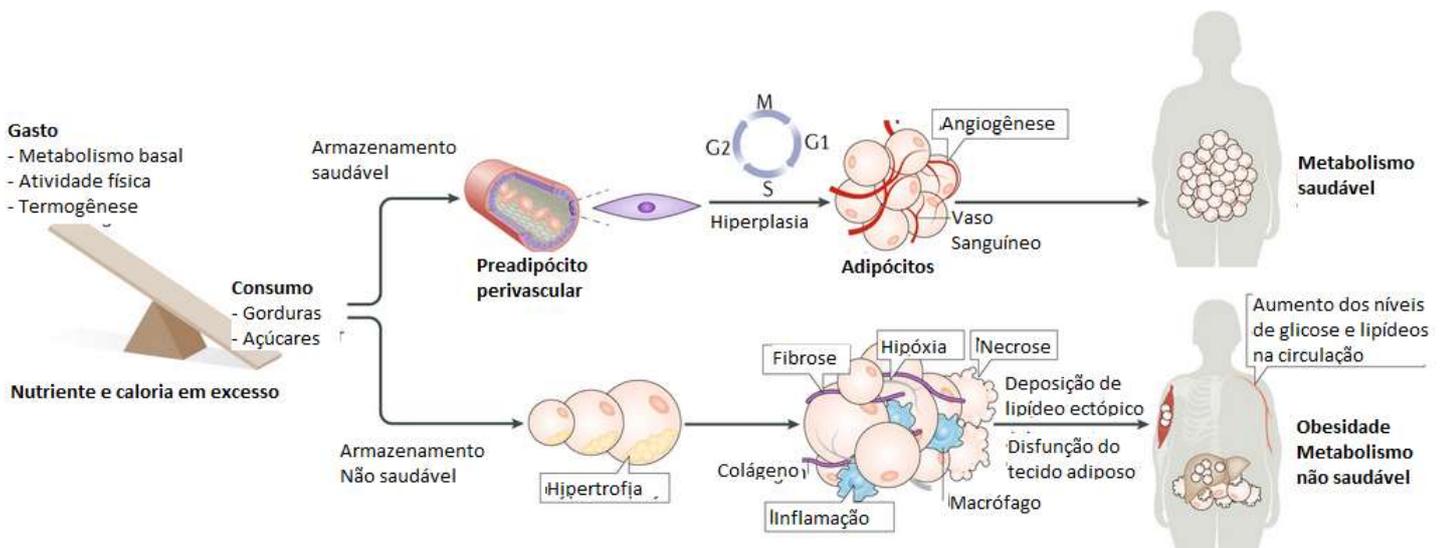
Neste estado de desequilíbrio, onde o consumo alimentar é maior que o gasto energético (metabolismo basal, atividade física, termogênese), inicia-se a expansão do tecido adiposo, que pode ocorrer de duas maneiras, por hiperplasia ou por hipertrofia. Ambos são

regulados pelo ambiente local e fatores genéticos, tendo evidências que estes processos estão intimamente ligados à manutenção da homeostase do tecido adiposo.

A hiperplasia requer a proliferação e diferenciação de células precursoras de tecido residentes para formar novos adipócitos. Neste caso o tecido é considerado saudável e adaptável, porque ele é vascularizado e os níveis adequados do hormônio antiinflamatório, sensível à insulina, adiponectina e outras adipocinas são mantidos (MARCELIN *et al.*, 2019).

Já na hipertrofia do tecido adiposo, os adipócitos aumentados exibem numerosas anormalidades necróticas, como ruptura da membrana plasmática, retículo endoplasmático dilatado, células debris no espaço extracelular e o aparecimento de pequenas gotículas lipídicas no citoplasma. Em adição às estas anormalidades morfológicas, há um aumento na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e MCP-1, levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Há também um aumento na hipoxia e posterior fibrose tecidual (Figura 3). Este quadro, associado ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, provoca aumento de ingestão alimentar, diminuição do gasto energético, além da alteração na homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado, promovendo acúmulo ectópico de gordura, inflamação e resistência à insulina (GHABEN; SCHERER, 2019).

Figura 3. Mecanismo da expansão do tecido adiposo por desequilíbrio do consumo energético.

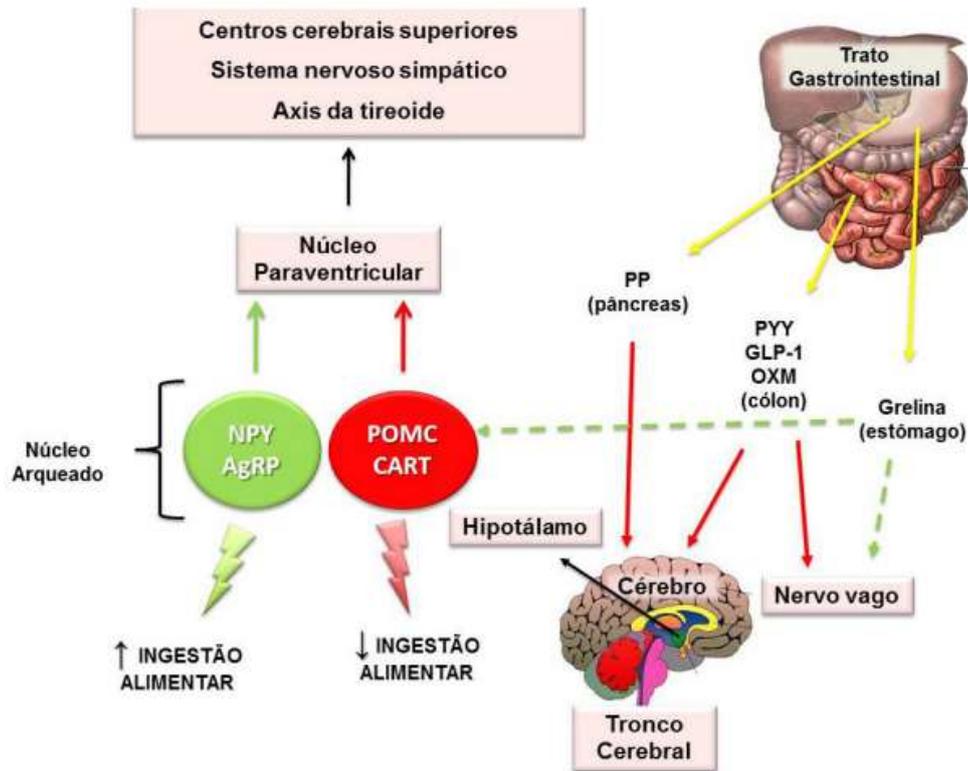


Fonte: Adaptado de Ghaben e Scherer (2019).

A nível de SNC, existe um complexo sistema que coordena a ingestão alimentar e o gasto energético a partir de sinais hormonais, de nutrientes e neurais. Esse sistema é centrado no hipotálamo e no tronco cerebral. A leptina e a insulina são os sinais hormonais de adiposidade, eles são responsáveis por informações a respeito dos estoques estáveis de energia. Em relação às informações do fluxo momentâneo de gasto de energia pelo trato digestório, os sinais de saciedade, encontram-se os hormônios: insulina, colecistocinina, o glucagon, o peptídeo 1 semelhante ao glucagon e a grelina. Ambos sinais são detectados inicialmente por neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, que, a seguir, se integram com os neurônios localizados nos núcleos paraventricular e área lateral hipotalâmica. A modulação da atividade do núcleo arqueado do hipotálamo se dá pela ação dos hormônios citados, associados à presença dos nutrientes, glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Já os sinais neurais oferecem informações instantâneas a respeito da presença de nutrientes no trato digestório, informações estas levadas ao SNC pelo nervo vago, alcançando o núcleo do trato solitário (Figura 4) (VELLOSO; ARAÚJO, 2021).

No núcleo arqueado do hipotálamo, dois grupos de neurônios agem como sensores dos sinais da periferia: orexígenos (estímulo de apetite, ativados no jejum), que são neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à agouti (AgRP), e anorexígenos (saciedade, ativados em períodos pós-pandriais), que são pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) (ALVAREZ-LEITE; SOARES; TEIXEIRA, 2016).

Figura 4. Controle central da homeostase energética.



Fonte: ALVAREZ-LEITE; SOARES; TEIXEIRA, 2016.

### 1.1.3. Adipogênese

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídeos na forma de triglicerídeos em seu citoplasma, sem que sua integridade funcional seja prejudicada. Existem quatro tipos de adipócitos: branco, marrom, bege e rosa. Eles diferem em origem, morfologia, abundância de mitocôndrias e expressão de genes termogênicos (CÔTE *et al.*, 2019).

A adipogênese é controlada por ações coordenadas dos fatores de transcrição determinantes da linhagem e reguladores epigenômicos. Os adipócitos, que compõem principalmente o tecido adiposo, são derivados de células-tronco mesenquimais multipotentes (CTMs). Duas fases da adipogênese são bem caracterizadas, o comprometimento das CTMs com os pré-adipócitos e a diferenciação terminal dos pré-adipócitos em relação aos adipócitos maduros (GHABEN; SCHERER, 2019).

Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP), proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis 1 (SREBP-1) e receptor de ativação proliferativa de peróxido gama (PPAR $\gamma$ ) são os principais fatores de transcrição responsáveis por diferenciação e regulação

da fase final de um grande número de genes envolvidos no metabolismo dos lipídios (BOUGHANEM *et al.*, 2019). A adipogênese é controlada por uma cascata de transcrição, iniciada pela ativação do C/EBP $\beta$ . As proteínas C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  são expressas nos estágios iniciais da adipogênese, e induzem a expressão de C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ . O PPAR $\gamma$  controla a diferenciação terminal dos adipócitos, sendo necessário para formar o seu estado diferenciado. Vale ressaltar que a família C/EBP não funciona bem sem o PPAR $\gamma$ . Nos pré-adipócitos 3T3-L1, a expressão no PPAR $\gamma$  e outros genes adipogênicos ocorre após 4h do tratamento com um coquetel adipogênico (Figura 5) (LEE *et al.*, 2019).

O PPAR $\gamma$  é um membro da superfamília 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 (MIRZA; ALTHAGAFI; SHAMSHAD, 2019). No tecido adiposo, o PPAR $\gamma$  regula a aquisição e a manutenção do fenótipo do adipócito. Já no músculo, esta proteína melhora a sensibilidade à insulina e a sua ativação por tiazolidinedionas (rosiglitazona e pioglitazona) é utilizada no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (GROSS *et al.*, 2017).

As SREBPs são uma família de fatores de transcrição que regulam a biossíntese lipídica e adipogênese, controlando a expressão de várias enzimas necessárias para a síntese de colesterol, ácidos graxos, triacilglicerol e fosfolipídios. Nos vertebrados, a ativação do SREBP é controlada principalmente por um mecanismo de *feedback* complexo e bem caracterizado mediado pelo colesterol (CREWE *et al.*, 2019).

No programa de diferenciação adipocitária, o mRNA de SREBP-1c é ativado após a expressão de C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , 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 sua 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 (BOUGHANEM *et al.*, 2019).

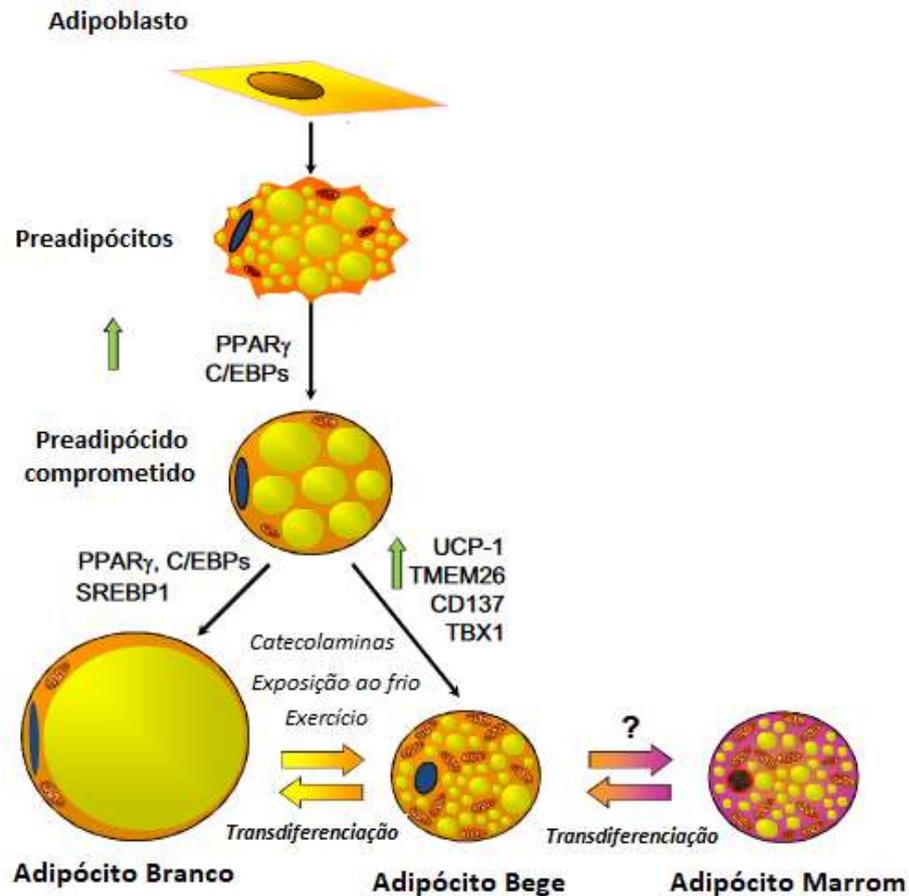
A sinalização de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma via chave no metabolismo de lipídios. A oxidação de ácidos graxos, a hidrólise lipídica de triglicerídeos e a produção lipídica pelos adipócitos são regulados pela via AMPK (STEINBERG; CARLING, 2019). A ativação deste caminho requer a fosforilação do AMPK, resultando na inibição da

síntese lipídica e na regulação positiva da hidrólise lipídica e oxidação de ácidos graxos (LI *et al.*, 2016). Algumas proteínas relacionadas à via AMPK incluem: acetil coenzima A carboxilase 1 (ACC1); proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c); transportador de glicose 4 (GLUT-4); e carnitina palmitoiltransferase 1A (CPT1) e estão todos altamente envolvidos no metabolismo lipídico (BU *et al.*, 2019).

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 isoladas a partir de células *Swiss 3T3* não clonais e já comprometidas (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).

As células 3T3-L1 foram originalmente derivadas como um subclone da linhagem celular de fibroblasto embrionário do mouse 3T3, selecionando células de culturas 3T3 em repouso (confluentes) exibindo acúmulo lipídico espontâneo (GREEN; KEHINDE, 1974). Estudos de acompanhamento mostraram que o soro fetal bovino, dexametasona, insulina e isobutil-metil-xantina (IBMX, um inibidor de fosfodiesterase) ativam respectivamente os 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 adipogênese nestas células (QUEIROZ *et al.*, 2009; WATANABE *et al.*, 2010; NOH *et al.*, 2013). Mas é digno de nota que a capacidade de conversão espontânea de adipogênese foi aparentemente perdida ao longo das gerações de linhagem celular (REED *et al.*, 1977; WILLIAMS; POLAKIS, 1977).

Figura 5. Processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.



FONTE: Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2015a.

## 1.2. Resistência Insulínica

A glicose é o principal açúcar circulante no sangue dos mamíferos. A produção de glicose é alcançada via glicogenólise, pela quebra do glicogênio em monômeros de glicose constituintes ou por gliconeogênese, onde há a síntese de novas moléculas de glicose a partir de outras moléculas precursoras não classificadas como carboidratos. A escolha do organismo entre glicogenólise *versus* gliconeogênese para a produção de glicose depende em parte da duração do jejum e da abundância de reservas de glicogênio (SARGSYAN; HERMAN, 2019). Considera-se que a glicogenólise é o principal contribuinte para a produção de glicose em indivíduos saudáveis no período pós-prandial. Já a contribuição da gliconeogênese para a produção de glicose aumenta para 95% com o jejum prolongado. Embora a contribuição da gliconeogênese à produção de glicose aumente ao longo da duração de um jejum, a produção

líquida de glicose hepática diminui, isto é, a gliconeogênese não substitui totalmente a diminuição da glicogenólise (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017).

A regulação da produção e do consumo de glicose ocorre principalmente pela ação da insulina. A insulina é um hormônio pancreático que desempenha um papel essencial na regulação da glicose no sangue, bem como no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. Ele é um hormônio polipeptídico, composto por duas cadeias de aminoácidos, produzido pelas células  $\beta$  pancreáticas. Esse hormônio tem meia vida de seis minutos, sendo estimulado pelo aumento dos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos e aminoácidos (HIRSCH; GAUDIANI, 2020).

Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR). Este receptor é um heterotetrâmero composto por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  transmembranares, ligadas entre si por ligações dissulfeto. A insulina liga-se à porção alfa, levando a uma alteração conformacional que permite que as subunidades  $\beta$  adquiram atividade cinase, o que promove a auto fosforilação de resíduos de tirosina localizados na região intracelular do IR. Uma vez ativa, a porção  $\beta$  fosforila em tirosina vários substratos proteicos intracelulares, incluindo o IRS-1 e o IRS-2 (substratos do receptor de insulina 1 e 2). Estes substratos, quando fosforilados em tirosina, se associam e ativam a enzima PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) que, por sua vez, catalisa a formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3P), um regulador alostérico da cinase fosfatidilinositol-dependente (PDK). Este último aumenta a fosforilação em serina da proteína serina/treonina cinase B (AKT). Esta associação é importante na translocação do transportador de glicose (GLUT4), na captação de glicose estimulada por insulina, na ativação do glicogênio sintetase e para a inibição de lipólise (Figura 6) (FERRARI *et al.*, 2019; GARGIULO *et al.*, 2019).

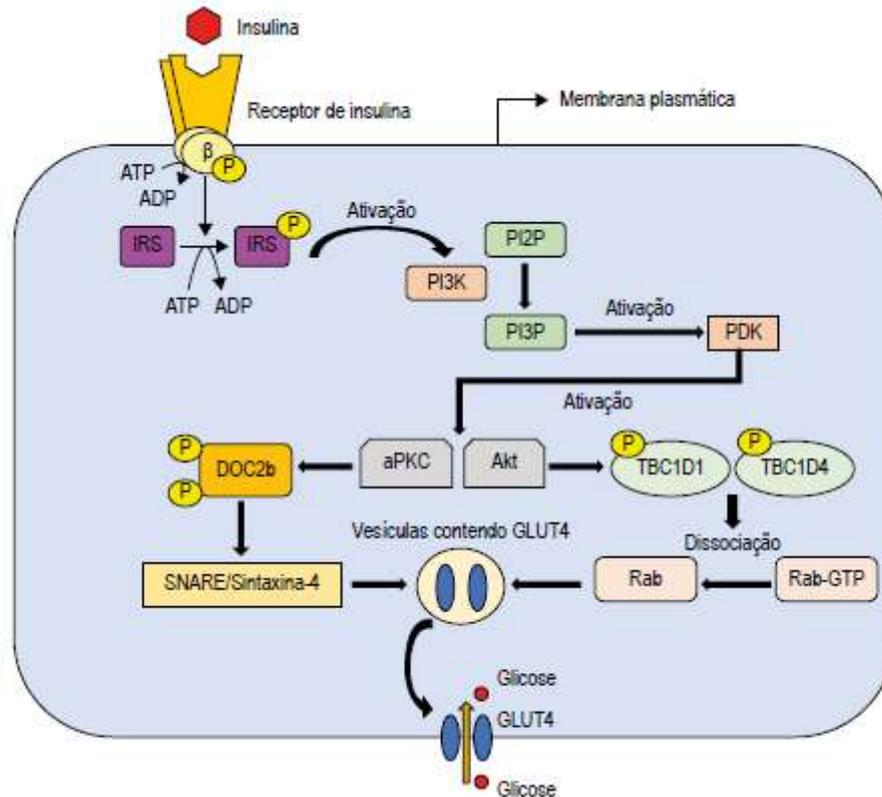
No fígado a insulina inibe a glicogenólise e a gliconeogênese e estimula a síntese de glicogênio, já na musculatura esquelética estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio. No tecido adiposo estimula a captação de glicose e redução da liberação de ácidos graxos e síntese de triglicérides. Também estimula a entrada de aminoácidos nas células para promover a síntese proteica (HATTING *et al.*, 2018).

A glicose é uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática, e o seu transporte é realizado através de difusão facilitada, mediado por transportadores de membrana específicos, GLUTs. A isoforma GLUT4 é considerado transportador insulino-sensível, cujo principal papel é proporcionar captação de glicose mediada pela insulina em tecido adiposo e muscular. No estado basal, ou seja, sem estímulo de insulina, boa parte do GLUT4 localiza-se

intracelularmente. A presença de insulina gera a cascata descrita anteriormente, determinando a movimentação do GLUT4 para a membrana plasmática, com consequente aumento de captação de glicose por esta célula (CHAO *et al.*, 2019; PETERSEN; SHULMAN, 2017).

Já no fígado, o transportador de glicose é o GLUT-2, presente na superfície dos hepatócitos, e permite que a quantidade de açúcar dentro desta célula seja semelhante à do sangue. A glicose que entra no fígado é fosforilada pela glicocinase, a fim de que seja produzida a glicose-6-fosfato, metabólito versátil que pode entrar em várias rotas metabólicas, como na liberação glicose livre na corrente sanguínea, no armazenamento de glicose pelo glicogênio hepático e na produção tanto de ATP quanto de ácidos graxos.

Figura 6. Representação esquemática das principais vias de sinalização que aumentam a translocação de GLUT-4 por estímulo da insulina.



Fonte: FERRARI *et al.*, 2019.

O diabetes é uma doença metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, que levam, ao longo do tempo, danos graves ao coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos. O diabetes mellitus tipo 1 (DM1), conhecido como diabetes juvenil, é uma condição crônica na qual o pâncreas deixa de produzir insulina devido à uma disfunção de células  $\beta$  do pâncreas. Já o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), geralmente acomete mais adultos e ocorre quando o corpo se torna resistente à insulina produzida, ou esta produção é insuficiente (HARREITER; RODEN, 2019).

A resistência à insulina (RI) é definida clinicamente como a incapacidade de uma quantidade conhecida de insulina exógena ou endógena em aumentar a captação e a utilização de glicose em um indivíduo, produzindo menor resposta biológica. Cronicamente, a combinação de resistência insulínica e de hiperinsulinemia gera alterações cardiovasculares que resultam em DM2, dislipidemias, doenças coronarianas, dentre outras (SAKLAYEN, 2018).

A supernutrição, alteração de lipídios, alterações nas adipocinas, aumento de ácidos graxos circulantes, atividade inflamatória são alguns fatores relacionados ao surgimento da RI (LI *et al.*, 2014).

A relação entre RI e obesidade é vastamente estudada. O aumento do tecido adiposo abdominal gera uma elevação de ácidos graxos livres para o fígado através da veia porta, bem como aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estudos avaliaram a associação da RI a marcadores inflamatórios clássicos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e foi mostrado que adipócitos tratados com TNF- $\alpha$  apresentavam prejuízo na sinalização insulínica. Essa resposta foi associada, principalmente, com redução na transcrição de IRS-1 e GLUT4 (FERRARI *et al.*, 2019).

### **1.3. Obesidade e Resistência Insulínica Induzida Por Fármacos**

O ganho de peso é um efeito colateral comum a muitos medicamentos, podendo levar ao sobrepeso e à obesidade, especialmente em indivíduos suscetíveis. Em uma revisão sistemática e metanálise, o ganho de peso mais significativo e consistente foi associado ao uso de agentes no tratamento do diabetes (pioglitazona, glimepirida e glicazida) e com medicação neuropsicotrópica, como as drogas antiepilépticas (gabapentina, topiramato), os antidepressivos (amitriptilina, mirtazapina, fluoxetina) e os antipsicóticos atípicos (olanzapina, quetiapina, risperidona). Para outras classes de medicamentos, como agentes bloqueadores  $\beta$  e corticosteróides, os dados foram mais heterogêneos neste estudo (DOMECQ *et al.*, 2015).

A insulina é um antidiabético responsável por ganho de peso. Alguns dos mecanismos pelos quais a insulina causa este efeito são o estímulo de apetite, desencadeado pela hipoglicemia, a necessidade de ingestão de açúcares para evitar mal-estar pela queda da glicemia e as características anabólicas oriundas da própria insulina (aumento da síntese proteica, inibição de proteólise e lipólise) (BLAZINA; SELPH, 2019). Outro exemplo é a pioglitazona, nesse caso o ganho de peso se deve a retenção de líquido, aumento de estoque lipídico e adipogênese, que ocorre quase que totalmente no tecido subcutâneo (SUMIDA *et al.*, 2020).

Antidepressivos estão sendo cada vez mais prescritos. Dados mostram que os antidepressivos foram prescritos em 23% dos 1,5 milhões de indivíduos na população da atenção básica pelo menos uma vez entre 1995 e 2011 no Reino Unido (MARS *et al.*, 2017). No Brasil, estudos mostram que os maiores usuários de psicotrópicos são do sexo feminino,

adultos, casados, com baixo nível de escolaridade (FARIAS *et al.*, 2016). Em um estudo separado, entre 128 pacientes deprimidos que foram tratados com imipramina por 33 semanas, 13% demonstraram aumento no peso de mais de 10% ao longo de 5 meses (FRANK *et al.*, 1990). A maior parte do ganho de peso ocorre nos primeiros 6 meses e é mais proeminente se o paciente já estiver com sobrepeso. Alguns dos preditores de ganho de peso incluem idade jovem, sexo feminino, baixo IMC e histórico familiar de obesidade, a dose e a duração do tratamento (GEBHARDT *et al.*, 2009). O ganho de peso é amplamente conhecido como um efeito adverso associado ao uso de antidepressivos e antipsicóticos por indivíduos afetados por esquizofrenia, depressão, distúrbios bipolares e demência. Em consequência, as condições metabólicas geralmente pioram em pacientes que utilizam este tipo de medicamento (PEDRERO; RASTROLLO; MARTI, 2019).

Diversos antipsicóticos bloqueiam receptores histamínicos, e parece existir uma relação logarítmica entre a afinidade com esses receptores e o ganho de peso, sendo a olanzapina a droga com maior afinidade (CHEN *et al.*, 2020). Muitas das drogas antipsicóticas estimulam o apetite e a preferência por alimentos doces ou gordurosos, o que supõe uma ação direta sobre sistemas metabólicos e centros nervosos ligados ao controle da saciedade e do peso (OKASAKI; YAMAMURO; KISHIMOTO, 2017).

Estudos relataram um aumento de peso em 40% a 80% dos indivíduos tratados com antipsicóticos. A clozapina, a olanzapina, a quetiapina e a risperidona têm maior probabilidade de produzir um ganho de peso severo. A comparação entre cinco medicamentos antipsicóticos (haloperidol, sulpirida, perfenazina, risperidona e olanzapina) em Ensaio Clínico Antipsicóticos de Efetividade de Intervenção, demonstrou que o grupo olanzapina teve o maior ganho de peso com os participantes randomizados, ganhando uma média de  $14,3 \pm 10,1$  kg acima do seu peso base (YOON, 2008).

Como consequência do ganho de peso, surge os distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e o diabetes mellitus. Dados demonstram uma prevalência 2,5% maior de diabetes em paciente em uso de antipsicóticos e derivados valpróicos, de amostragem pareados por idade, do que na população em geral na Califórnia em 2009 (SELVIN *et al.*, 2014).

O diabetes induzido pelo uso dos antipsicóticos pode ser mediado por vários mecanismos: o primeiro deles é que esses medicamentos podem inibir a via de sinalização da insulina nas células-alvo, como células musculares, hepatócitos e adipócitos, causando a resistência à insulina; a obesidade induzida pelos antipsicóticos pode resultar em altos níveis de gordura livre e inflamação, que também podem causar resistência à insulina, além de que,

podem causar danos diretos às células  $\beta$ , levando à disfunção e apoptose (CHEN *et al.*, 2017). Uma aceitável teoria considera que tanto o dano das células  $\beta$ , quanto a resistência à insulina são fatores necessários para o desenvolvimento de diabetes (KAHN *et al.*, 2014).

Os efeitos adversos da olanzapina no metabolismo glicêmico e lipídico, no peso e na composição corporal são de séria preocupação e requerem monitorização cuidadosa. Este medicamento apresenta um dos maiores riscos para a síndrome metabólica entre os antipsicóticos atípicos de segunda geração, especialmente durante o tratamento a longo prazo e com a administração de doses elevadas, de acordo com um relatório de associações profissionais de psiquiatras, endocrinologistas e diabetologistas (GRAJALES; FERREIRA; VALVERDE, 2019).

Em uma análise de 13 monoterapias de olanzapina controladas por placebo e de curto prazo (exposição média: 6 semanas), o ganho médio de peso com olanzapina foi de 2,6 kg comparada com perda de peso de 0,3 kg do grupo placebo (ELI LILLY, 2018).

Uma literatura estabelecida propõe que pessoas com esquizofrenia têm risco inerente de metabolismo anormal da glicose, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia, independente do tratamento com antipsicóticos. Essas características seriam devido às influências genéticas. Porém, estudo com indivíduos jovens e saudáveis, revelou que a olanzapina aumenta a ingestão de alimentos, o que leva ao ganho de peso que, por sua vez, induz consequências metabólicas, mas também por outros efeitos diretos no metabolismo lipídico e glicêmico independente da ingestão de alimentos e do ganho de peso. Desta forma, sugere-se que estas drogas induzem alterações no metabolismo da glicose de forma, pelo menos parcial, independente do risco genético e/ou do metabólico preexistente na esquizofrenia (BALLON *et al.*, 2018).

O fato dos medicamentos psicotrópicos contribuírem para o ganho de peso, obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia e síndrome metabólica levam a não adesão à medicação, retrocedendo no tratamento.

#### **1.4.Olanzapina**

A olanzapina é um medicamento da classe dos antipsicóticos atípicos, que inclui, entre outros, risperidona, ziprazidona, clozapina, quetiapina, amisulprida e aripripazol. Estes fármacos em geral podem ser considerados os de primeira escolha naqueles pacientes que

apresentaram intolerância aos efeitos colaterais dos antipsicóticos tradicionais (BETHESTA, 2014).

Quimicamente a olanzapina é chamada de 2-metil4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b] [1,5]benzodiazepina. A fórmula molecular é  $C_{17}H_{20}N_4S$  e tem um peso molecular de 312,44. Apresenta-se como um sólido cristalino amarelo, que é praticamente insolúvel em água. É um tiobenzodiazepínico que assim como os outros de sua classe apresenta afinidade pelos receptores de serotonina (5HT<sub>2A/C</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>6</sub>), dopamina (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>), muscarínicos (M<sub>1-5</sub>),  $\alpha$ 1-adrenérgico e histamina (H<sub>1</sub>), sendo um antagonista seletivo monoaminérgico (MEDEIROS *et al.*, 2008).

Este medicamento é bem absorvido após administração oral, atingindo concentrações plasmáticas máximas dentro de 5 a 8 horas. A absorção não é afetada pelo alimento. As concentrações plasmáticas de olanzapina foram lineares e proporcionais à dose em estudos clínicos nas doses de 1 a 20 mg. Sofre extensivo metabolismo de primeira passagem, eliminando cerca de 40% da dose administrada antes de alcançar a circulação sistêmica (URBAN; CUBALA, 2017).

Após administração oral a indivíduos saudáveis, a meia-vida média de eliminação da olanzapina foi de 33 horas (21 a 54 h) e o *clearance* plasmático médio foi de 26 L/h (12 a 47 L/h). A concentração plasmática, tempo de meia-vida e *clearance* da olanzapina podem variar entre os indivíduos de acordo com o gênero, idade e seus padrões de tabagismo (SUN *et al.*, 2019).

A olanzapina é metabolizada no fígado pelas vias conjugativa e oxidativa. O maior metabólito circulante é o 10-N-glucuronida (44% em estado de equilíbrio), que em teoria não ultrapassa a barreira hematoencefálica. As isoenzimas CYP1A2 e CYP2D6 do citocromo P450 contribuem para a formação dos metabólitos N-desmetil e 2-hidroximetil, ambos exibindo significativamente menor atividade farmacológica *in vivo* do que a olanzapina em estudos animais (SUN *et al.*, 2019).

A atividade antipsicótica se dá pelos efeitos aos receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos. O antagonismo aos receptores acima pode explicar os efeitos terapêuticos e os adversos. Os efeitos anticolinérgicos se dão pelo antagonismo aos receptores muscarínicos, a sonolência, pelo antagonismo aos receptores de histamina, já a hipotensão ortostática está relacionada ao receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico (MEDEIROS *et al.*, 2008).

A vantagem dos antipsicóticos atípicos é a menor incidência de sintomas extrapiramidais (como acatisia, parkinsonismo farmacológico, distonia aguda, tremor perioral

e discinesia tardia), causado pelo bloqueio dopaminérgico na via nigroestriatal (FREDERICO *et al.*, 2008).

Suas aplicações incluem tratamento agudo e de manutenção da esquizofrenia e outras psicoses, nas quais sintomas positivos (exemplo: delírios, alucinações, alterações de pensamento, hostilidade e desconfiança) e/ou sintomas negativos (exemplo: afeto diminuído, isolamento emocional e social, pobreza de linguagem) são proeminentes, sendo também eficaz nos sintomas afetivos secundários, comumente associados com esquizofrenia e transtornos relacionados. A olanzapina também é indicada, em monoterapia ou em combinação com lítio ou valproato, para o tratamento de episódios de mania aguda ou mistos do transtorno bipolar, com ou sem sintomas psicóticos e com ou sem ciclagem rápida. Além disso, a olanzapina é indicada para prolongar o tempo de eutimia e reduzir as taxas de recorrência dos episódios de mania, mistos ou depressivos no transtorno bipolar (CITROME *et al.*, 2019).

As principais reações adversas associadas ao uso da olanzapina são: ganho de peso, hiperglicemia, dislipidemias, resistência à insulina e elevação da prolactina. Dentre esses efeitos, o ganho de peso tem grande relevância, já que é o fator associado aos distúrbios metabólicos como um todo, provavelmente facilitando o surgimento das demais reações e está diretamente relacionado à morbimortalidade cardiovascular (KROGMANN *et al.*, 2019; CITROME *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos propostos para o ganho de peso devido ao uso de antipsicóticos atípicos, está o antagonismo aos receptores de histamina H<sub>1</sub>, que já é bem descrito por causar ganho de peso devido ao aumento de apetite. Estudos demonstram que a afinidade com esse receptor dos antipsicóticos atípicos está bem correlacionada com a casualística desse efeito adverso. O antagonismo aos receptores de 5HT<sub>2</sub> pode desempenhar um papel aditivo (SALVI *et al.*, 2016).

Na clínica, a afinidade da olanzapina pelo receptor H<sub>1</sub> se correlaciona com o ganho de peso. Em ratos, o tratamento com olanzapina altera a expressão do mRNA do receptor H<sub>1</sub> no hipotálamo, que está negativamente correlacionado com o ganho de peso (HAN *et al.*, 2008). Portanto, o antagonismo do receptor H<sub>1</sub> parece ser um fator-chave na obesidade induzida por olanzapina (HE *et al.*, 2014). De fato, a betaistina (um agonista do receptor H<sub>1</sub> / antagonista do receptor H<sub>3</sub>) tem sido usado para impedir o ganho de peso induzido pela olanzapina em humanos (POYUROVSKY *et al.*, 2013) e ratos (DENG *et al.*, 2012).

## 1.5 Triterpenos

Os terpenos são uma família de compostos quimicamente diversos, encontrados no reino vegetal, essenciais ao crescimento desenvolvimento e sobrevivência dos organismos. A estrutura básica dos terpenos consiste em uma unidade isoprenóide ( $C_5H_8$ ), sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (HAUŁ; HOD, 2020). Os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isoprenos que sua estrutura possui: hemiterpenos (1), monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), triterpenos (6), tetraterpenos (8) e politerpenos ( $>8$ ) (AYAD; AKKAL, 2019).

Dessa forma, os triterpenos são moléculas derivadas dos terpenos, constituídas por 30 átomos de carbono, 6 unidades isoprenóides e possuem várias ações farmacológicas descritas (MUKHERJEE, 2019). Este grande grupo é estruturalmente diverso de metabólitos secundários, distribuídos de forma ubíqua no reino vegetal e amplamente presentes em várias plantas medicinais. Os triterpenos estão entre os produtos naturais mais abundantes, com mais de 20.000 estruturas identificadas até o momento.

Os triterpenos podem ser classificados em tetracíclicos e pentacíclicos e divididos em grupos conforme seus esqueletos estruturais: ursano, lupano, oleano, ursano e gamacerano (PARK *et al.*, 2017).

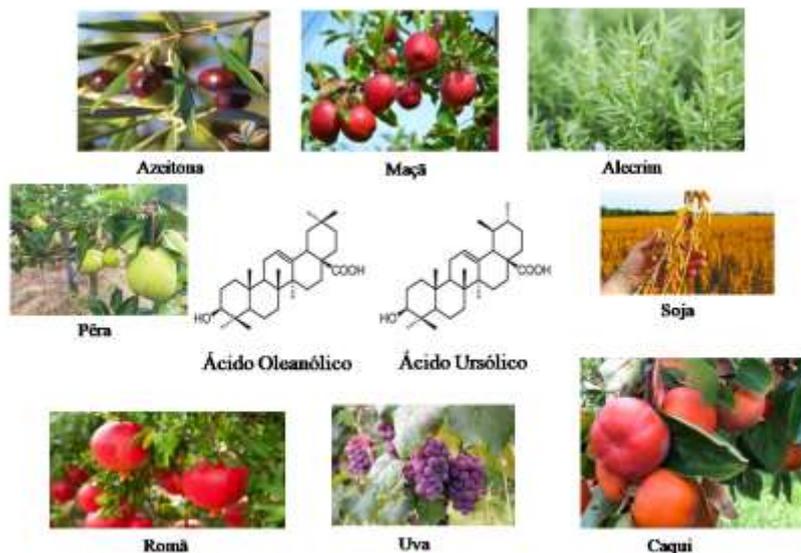
Do ponto de vista biológico, a classe dos triterpenos pentacíclicos, de estrutura molecular básica com cinco anéis, tem atraído muita atenção devido ao seu notável espectro de atividades farmacológicas, como anticâncer, antiinflamatório, imunomodulador, antioxidantes, antivirais, antimicrobianos, antidiabéticos, hepato e cardioprotetores, além de ter efeito antiadiposidade e antiobesidade (SHENG, SUN, 2011).

Os triterpenos pentacíclicos podem ser potentes agentes antiobesidade, uma vez que afetam diferentes estágios da adipogênese, lipólise e oxidação de ácidos graxos, visando os fatores de transcrição destes processos. Por exemplo, o ácido oleanólico e o ácido  $18\beta$ -glicirretínico ( $18\beta$ -GA) suprimem a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e o acúmulo de lipídios por regular negativamente a expressão celular de C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (SUNG *et al.*, 2010). Da mesma forma, amirinas ( $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina) em camundongos alimentados com dieta hipercalórica atenuam o peso corporal, a gordura visceral, a área da superfície dos adipócitos através da regulação negativa da expressão de PPAR $\gamma$  (CARVALHO *et al.*, 2016).

### 1.5.1 Ácido Oleanólico

O ácido oleanólico, do grupo oleano, e seu isômero, o ácido ursólico, do grupo ursano, pertencem à classe de compostos triterpenoide e são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm sido frequentemente isolados como mistura isomérica (LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2015). Já foi constatada a presença de ácido oleanólico em mais de 1600 plantas (FAI, TAO, 2009). A figura 7 ilustra alguns desses exemplos: a fruta e a folha da azeitona (GUINDA *et al.*, 2010), alecrim (ALTINIER *et al.*, 2007), casca da romã (LI *et al.*, 2011), casca da maçã (JÄGER *et al.*, 2009), a fruta e a folha do caqui, uva, casca da pera (ZHANG *et al.*, 2014a) e soja (ZHANG, POPOVICH, 2009). Numerosos estudos revelaram que os triterpenóides são mais concentrados nos compartimentos de cera intracuticular, por isso o teor deste composto em geral é maior na casca do que na polpa das frutas (SZAQUIEL *et al.*, 2012).

Figura 7. Exemplos de frutas e vegetais contendo os triterpenos: ácido oleanólico e ácido ursólico.



Na Região Nordeste do Brasil, o ácido ursólico e o ácido oleanólico são encontrados nas espécies de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* (Caprifoliaceae), *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) e nos gêneros *Eucalyptus* sp, *Ocimum* sp e *Rosmarinus* sp (LIU *et al.*, 1995; BEGUM *et al.*, 2004).

Em relação à toxicidade, apesar de ter características hepatoprotetoras, em altas doses o ácido oleanólico demonstrou hepatotoxicidade. Em experimentos *in vitro* com hepatócitos de ratos, a concentração de 300 µg/mL de AO foi citotóxica (KINJO *et al.*, 1999). Em animais, camundongos machos da linhagem C57BL6 tiveram aumentos das enzimas hepáticas (ALT, AST, ALP e bilirrubina total) com o tratamento de 100 mg/kg/dia de AO por 14 dias (SATO *et al.*, 2007) e por 5 dias (LIU *et al.*, 2013).

O ácido oleanólico e os triterpenos relacionados modulam diferentes vias de sinalização metabólica, que são diretamente relacionadas às suas atividades. A atividade da enzima colesterol acetiltransferase (ACAT), responsável pela síntese de ésteres de colesterol, está intimamente relacionada ao desenvolvimento da aterosclerose. Lee e colaboradores (2006) testaram os triterpenos pentacíclicos ácidos ursólico, oleanólico e betulínico na inibição das enzimas humanas ACAT-1 e ACAT-2. Todos demonstraram efeito inibitório, com destaque para o ácido betulínico, que apresentou melhor resultado para as duas enzimas.

Ainda nesta linha, evidências revelam o potencial do ácido oleanólico para restaurar desordens vasculares associadas a fatores de risco cardiovasculares, ou seja, hipertensão, obesidade, diabetes e aterosclerose (RODRIGUEZ, 2015b). Estudos já demonstraram que uma série de triterpenoides isolados de plantas como jujuba (*Zizyphus jujuba*) e amora silvestre (*Rubus allegheniensis*), dentre eles o ácido betulínico, possuem efeito inibitório na formação de células espumosas a partir de macrófagos humanos, demonstrando possível efeito na prevenção da aterosclerose (FUJIWARA *et al.* 2011, ONO *et al.*, 2014).

A farmacocinética do AO é dose independente, ou seja, obteve resultados bem próximos nas doses de 25 e 50 mg/kg via oral e 0,5 e 2 mg/kg via endovenosa. Nesse mesmo estudo notou-se que a biodisponibilidade oral é extremamente baixa (0,7%), dado a baixa permeabilidade celular e extenso metabolismo microsossal hepático (JEONG *et al.*, 2007).

Em um estudo de anti-obesidade em camundongos, o ácido oleanólico modulou a percepção orossensorial de lipídeos em camundongos obesos, exibindo uma diminuição no peso corporal, fígado e tecido adiposo. Houve também alteração no metabolismo da glicose, com melhora no teste de tolerância à glicose e nos níveis de insulina. Todos esses fenômenos foram associados à influência na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6), e de alguns genes lipogênicos (PPAR $\alpha$ , SREBP1, FAS, CREBP e G6Pase) (DJEZIRI *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Ácido Ursólico

A diferença entre o grupo oleanano e ursano é baseada na migração de um grupo metil (C-30) da posição C-20 a C-19. Os derivados comuns desses dois compostos são baseados na hidroxilação em C-3, carboxilação em C-28 e uma ligação dupla na posição C12 para formar ácido ursólico e ácido oleanólico, enquanto a hidroxilação adicional na posição C-2 produz ácido corosólico e ácido maslínico. Esses dois grupos de estruturas pentacíclicas, tanto em suas formas aglicona quanto glicosídica, são conhecidos para uma gama de atividades biológicas (HABTEMARIAM, 2019).

Dessa forma, os isômeros têm propriedades farmacológicas semelhantes, embora possam diferir na intensidade de atividade devido à diferença na posição dos grupos metil, que influencia a bioatividade (SENTIL *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstraram inúmeras atividades biológicas dos triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico, como atividade analgésica, antiinflamatória, antioxidante, anticâncer e antiobesidade (VASCONCELOS *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2008; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; RAO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2009).

Na literatura, as causas dos efeitos do ácido ursólico na obesidade, no gasto de energia, na esteatose hepática, na perda esquelética de massa muscular e na aptidão física se dão por vários mecanismos fisiológicos e moleculares, como aumento da termogênese por fatores moduladores de transcrição de adipócitos, ativação de AMPK e superexpressão da UCP1; aumento da massa muscular esquelética por ativação em concentrações de hormônio de crescimento na corrente sanguínea e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), bem como na ativação do mTOR.

Já existem relatos demonstrando também a atividade do ácido ursólico no metabolismo de camundongos. Nguyen e colaboradores (2018) demonstraram que este triterpeno reduz o tamanho da lesão aterosclerótica, e melhora a atividade renal em animais diabéticos. Realizaram um tratamento de 20 semanas com um análogo do ácido ursólico, 23-OHUA, e notou-se uma redução de 40% na placa aterosclerótica, e 11% do ganho de peso.

Nas últimas décadas, extensas investigações foram realizadas para determinar o processo de AU no corpo, sugerindo que a exposição ao AU no sistema circulatório é relativamente baixa, já que o AU é distribuído principalmente no fígado.

Alguns estudos foram realizados para identificar como o AU se distribui no organismo de camundongos após ingestão oral. As análises indicaram que os níveis de AU no fígado, cólon, rim, coração, bexiga e cérebro aumentaram da semana 4 à semana 8, com a

maior abundância no fígado. Porém, o AU no plasma não era apreciável até a semana 8 (YIN *et al.*, 2012). O tropismo de órgão do AU também foi validado em um relatório semelhante em que o AU foi principalmente distribuído no pulmão, baço, fígado, cérebro e rim de ratos, submetidos à administração oral de AU na dose de 10 mg / kg, com vestígios de AU no plasma (CHEN *et al.*, 2011).

### 1.5.3 $\alpha$ , $\beta$ -amirina

Outra espécie do nordeste do Brasil rica em triterpenos é *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, conhecida popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira-vermelha ou almecegueiro bravo, sendo uma árvore de grande porte e com ocorrência em todo o Brasil (CORREIA, 1984). Uma lesão no tronco da *P. heptaphyllum* faz exsudar uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas que é utilizada na medicina popular como antiinflamatório, gastroprotetor, analgésico, cicatrizante e expectorante (MAIA *et al.*, 2000; SIANI *et al.*, 1999). A Figura 8 ilustra a resina desta planta.

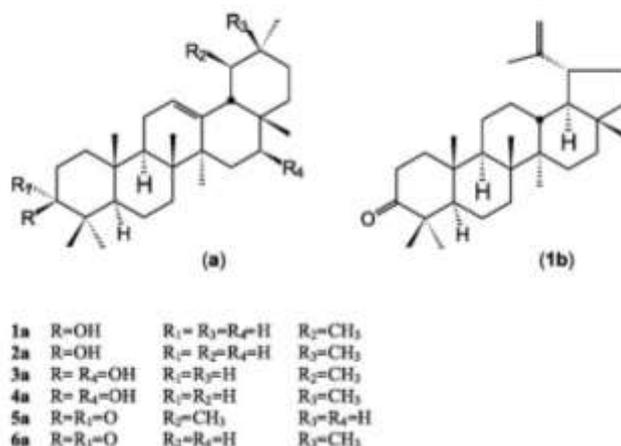
Foram identificadas na resina sete constituintes triterpênicos, distribuídos em três misturas,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (45,25%), breina e maniladiol (9,5%),  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirinona e lupenona (1,25%), sendo a mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina o principal constituinte, sendo a fração  $\alpha$  pertencente ao grupo ursano, e a fração  $\beta$  ao grupo oleano. A proporção entre  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina é de 63:37, fração trabalhada no presente estudo (Figura 9) (VIEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

Figura 8. Resina extraída da *Protium heptaphyllum* (Aubl.)



Fonte: <http://amazonforestrading.com.br/produto/extratos-e-oleos/resina-natural-da-amazonia-de-breubranco/>

Figura 9. Estrutura química dos constituintes triterpênicos da resina de *P. heptaphyllum*.



Legenda:  $\alpha$ -amirina (1a),  $\beta$ -amirina (2a), breína (3a), maniladiol (4a),  $\alpha$ -amirinona (5a),  $\beta$ -amirinona (6a) e lupenona (1b).

Fonte: VIEIRA-JÚNIOR *et al.* 2005

A mistura de triterpenos alfa, beta-amirina ou  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina apresenta atividade antinociceptiva (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008a), anti-inflamatória (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008b; MELO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010), gastroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2004), antihiperlipidêmica e hipolipidêmica (SANTOS *et al.*, 2012) e hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A resina de *P. heptaphyllum* e a mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina apresentaram atividade preventiva da obesidade em animais submetidos a uma dieta rica em gordura por 15 semanas, reduzindo o peso corporal, peso do fígado, da gordura abdominal, dos níveis séricos de glicose, amilase, lipase, colesterol total, triglicerídeos, grelina, leptina, TNF- $\alpha$  e IL-6, melhora da histologia hepática, assim como reduzindo a expressão de PPAR- $\gamma$  e de lipoproteína lipase no tecido adiposo em relação aos animais que receberam apenas a dieta hiperlipídica. Além disso, a resina de *P. heptaphyllum* foi capaz de reduzir a adipogênese em células 3T3-L1, reduzindo o acúmulo de lipídeos e a expressão de PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e C/EBP $\beta$  (CARVALHO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016).

Em relação à farmacocinética, um estudo realizado na Universidade de São Paulo descreveu pela primeira vez que a biotransformação da mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (4:6) é mediada pelo citocromo P450, utilizando uma preparação microsossomal de fígado de ratos, em método cinético validado, obedecendo à cinética de Hill (MOREIRA *et al.*, 2013).

Nosso laboratório desenvolveu um modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos *Swiss* que geram, não só o aumento do peso corporal, mas

também afetam a homeostase do metabolismo, com alterações bioquímicas e hormonais. Dessa forma, conseguimos mimetizar as alterações metabólicas causadas pela má alimentação e excesso de peso corporal, a fim de identificar quais vias de sinalização estão envolvidas neste processo.

Neste mesmo modelo, nosso laboratório vem estudando o efeito antiobesidade de triterpenos em camundongos, tendo identificado a atividade antiobesidade do ácido betulínico (MELO *et al.*, 2009), ácido oleanólico (MELO *et al.*, 2010), ácido ursólico (RAO *et al.*, 2011) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (CARVALHO *et al.*, 2016). Estes triterpenos reduziram de forma significativa o peso corporal, a adiposidade visceral, os níveis séricos de glicemia, lípase, amilase, lipídeos e grelina e elevaram os níveis séricos de leptina e insulina (MELO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

A olanzapina mesmo não sendo a primeira escolha de tratamento para pacientes com esquizofrenia, devido ao risco conhecido de efeitos colaterais metabólicos, permanece amplamente utilizada, já que ela é bem tolerada e bastante eficaz (KIM; NA, 2017).

Estudos relatam que este medicamento tem menores taxas de descontinuação de tratamento do que placebo e diversos outros antipsicóticos (KAHN *et al.*, 2008; CITROME, 2008; LEUCHT *et al.*, 2013), provavelmente devido a uma eficácia maior em relação aos demais tratamentos (CITROME *et al.*, 2019). Mesmo assim, dentre as principais causas de descontinuação do tratamento da olanzapina temos o ganho de peso, as alterações no perfil lipídico sérico e o desenvolvimento de resistência a insulina (KAHN *et al.*, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de intervenções que ofereçam a eficácia da olanzapina, mas reduzam o ganho de peso e as possíveis complicações a longo prazo associadas ao seu uso, seria um grande avanço no tratamento da esquizofrenia. Essas intervenções podem incluir agentes com novos mecanismos de ação ou produtos em combinação com a olanzapina, que tenham por resultado atuar diretamente na via que causa o efeito colateral sobre o metabolismo.

Alguns triterpenos dos grupos oleanano e ursano, como os isômeros ácido ursólico e ácido oleanólico, além da mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina possuem atividades farmacológicas amplamente descritas, demonstrando efeitos no metabolismo como redução de peso, diminuição de níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total, glicemia em jejum e insulina sérica (WANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017). Apesar disso, não existe na literatura científica informações sobre a ação destes triterpenos sobre os efeitos colaterais sobre o metabolismo causados diretamente pelo uso da olanzapina. Também não existe na literatura de que forma o grupo ao qual o triterpeno pertence influencia na resposta metabólica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação preventiva do ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (AMI) sobre as alterações metabólicas induzidas pela OLZ *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do AO, AU e AMI sobre a ação da OLZ no testes comportamentais de Campo Aberto em camundongos;
- Avaliar o efeito preventivo do tratamento com AO, AU e AMI por 6 semanas nas alterações metabólicas induzidas por OLZ em camundongos, através das mensurações de(a):
  - Medidas murinométricas de peso, comprimento, índice de massa corporal (IMC), do consumo de água e ração, da gordura corporal e do peso do fígado;
  - Resistência à insulina, através do índice de HOMA-IR, teste de tolerância à glicose intraperitoneal e níveis de glicogênio hepático e muscular;
  - Níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), glicose e insulina;
  - Alterações histológicas no tecido hepático e tecido adiposo;
  - Expressão proteica de proteínas envolvidas na sinalização insulínica hepática:PI3K, pIRS-1 e pAKT;
  - Expressão proteica de GLUT-4 muscular.
- Avaliar o efeito do AO, AU e AMI em células 3T3-L1:
  - Sobre a viabilidade celular;
  - Sobre a diferenciação mediada por OLZ por meio da coloração de *Oil Red O*;
  - Sobre o acúmulo de colesterol e triglicerídeos intracelulares induzido por OLZ;
  - Sobre a expressão proteica de proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico, PPAR $\gamma$ , SREBP-1, AMPK $\alpha$ , pAMPK e FAS em células 3T3-L1 diferenciadas com OLZ.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Drogas e Reagentes

<b>Substância</b>	<b>Fabricante</b>
Ácido Acético	Vetec Química, Brasil
Ácido Oleanólico	Sigma Aldrich, EUA
Ácido Ursólico	Sigma Aldrich, EUA
Ácido Sulfúrico	Synti, Brasil
Ácido Tiobarbitúrico	Sigma Aldrich, EUA
Albumina bovina sérica (BSA)	Sigma Aldrich, EUA
Álcool isopropílico	Dinâmica, Brasil
Amersham ECL™ Prime	GE Healthcare, Reino Unido
Antrona	Alphatec, Brasil
Coquetel inibidor de protease	Sigma Aldrich, EUA
DC <i>Protein Assay</i> (kit)	BioRad Laboratories, EUA
Dexametasona	Sigma Aldrich, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Dinâmica, Brasil
Dodecil Sulfato de Sódio	Sigma Aldrich, EUA
<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i> (DMEM)	Gibco by Life Technologies, EUA
Etanol	Itajá, Brasil
Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)	Sigma Aldrich, EUA
Formaldeído	Alphatec, Brasil
Soro bovino fetal	Gibco by Life Technologies, EUA
Formaldeído	Dinâmica, Brasil
<i>Full-Range Rainbow Marker</i>	GE Healthcare, Reino Unido
Glicose	Dinâmica, Brasil
Hidróxido de Potássio	Dinâmica, Brasil
Insulina	Sigma Aldrich, EUA
Membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF)	Invitrogen, EUA
Soro de bezerro recém-nascido (NBCS)	Gibco by Life Technologies, EUA
Olanzapina	Eli Lilly do Brasil
<i>Oil Red O</i>	Sigma Aldrich, EUA
Ortovanadato de sódio	Sigma Aldrich, EUA

Penicilina/estreptomicina	Gibco by Life Technologies, EUA
Soro Fetal Bovino	Gibco by Life Technologies, EUA
Sulfato de Sódio Anidro	Vetec Química, Brasil
Ripa	Sigma Aldrich, EUA
Trizma	Sigma Aldrich, EUA
Tween 80	Cromoline, Brasil
1,1,3,3-tetrametoxipropano	Sigma Aldrich, EUA
3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)	Sigma Aldrich, EUA
3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio	Sigma Aldrich, EUA

---

## 4.2. Obtenção da Olanzapina

A extração da olanzapina foi realizada pela Profa. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. A olanzapina foi extraída a partir da dissolução dos comprimidos de Zyprexa<sup>®</sup> (olanzapina 10 mg) em 10 ml de 2% de amônia, e o dissoluto foi sonificado por 30 minutos. A mistura foi filtrada através do papel de filtro, então transferida para um funil de separação e extraída com 5 ml de acetato de etila por quatro vezes. Sulfato de magnésio foi adicionado a camada orgânica e coletada para remover a água restante. O acetato de etila foi então evaporado, usando evaporador rotativo em 40 °C, sob baixa pressão. Os cristais amarelos foram verificados por HPLC e espectrometria de NMR (Anexo I) (YANG *et al.*, 2007).

## 4.3. Animais

Para a realização dos experimentos com animais foram utilizados camundongos *Mus musculus*, da linhagem C57BL/6, fêmeas, com peso variando de 15-17 g, fornecidos pelo Biotério Central, da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, com temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C) e ciclo de 12 horas claro/escuro, tendo livre acesso à água e ração, no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Os ensaios experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob N° 4575280219 e 8407290120 (Anexo 2).

#### 4.4. Composição das Dietas

A dieta padrão (DP) constituiu a ração para camundongos, obtida a partir de uma fonte comercial (Nuvilab<sup>®</sup>, Brasil).

A dieta associada à olanzapina (DO, 0,005%) foi produzida a partir de 1 kg de ração comercial (Nuvilab<sup>®</sup>, Brasil) triturada, aos quais foram adicionados 50 mg de olanzapina, com posterior formação de *pellets*, dessa forma, a concentração final de consumo em nosso experimento foi de 1,5 mg/kg/dia (LORD *et al.*, 2017).

A DO foi preparada sob a supervisão do Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca, no Laboratório de Farmacotécnica do Curso de Farmácia da UFC.

#### 4.5. Protocolo Experimental Animal

Os animais foram inicialmente ambientados por uma semana, tendo livre acesso a ração padrão e à água. Após esse período, os animais foram divididos em cinco grupos de 10 animais cada, de acordo com o peso corporal, e foram tratados com as respectivas dietas por 9 semanas:

Grupo 1: animais que receberam apenas a dieta padrão (DP);

Grupo 2: animais que receberam apenas a dieta associada à olanzapina (DO);

Grupo 3: animais que receberam a DO e administrado o Ácido Oleanólico (20 mg/kg/dia), entre a 3<sup>a</sup>.– 9<sup>a</sup>. semana;

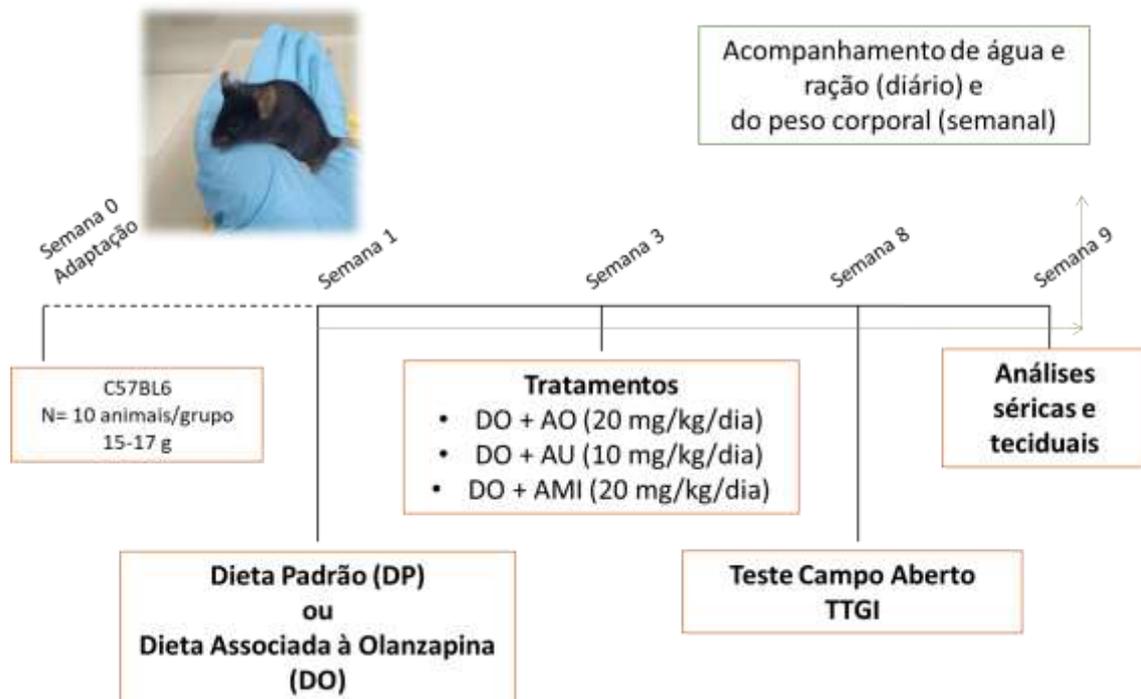
Grupo 4: animais que receberam a DO e administrado o Ácido Ursólico (10 mg/kg/dia), entre a 3<sup>a</sup>.– 9<sup>a</sup>. semana;

Grupo 5: animais que receberam a DO e administrado a  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (20 mg/kg/dia), entre a 3<sup>a</sup>.– 9<sup>a</sup>. semana.

Ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina foram inicialmente solubilizados em 2% Tween 80 e adicionados a água de beber conforme descrito por Rao e colaboradores (2010).

O grupo DO recebeu o mesmo volume de veículo (2% Tween 80 na água de beber). As doses escolhidas dos triterpenos foram aquelas que se mostraram seguras e eficazes em modelos animais de obesidade com camundongos. Devido a maior toxicidade, a dose do AU foi mais baixa que a dos demais triterpenos (LUO *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2010). Os mesmos animais por grupo foram utilizados para todos os experimentos realizados.

Figura 10. Representação esquemática do delineamento experimental *in vivo*.



Fonte: o autor.

#### 4.5.1. Testes comportamentais

##### 4.5.1.1. Teste do campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (ARCHER, 1973).

Todos os animais de cada grupo, no início da semana 8 de tratamento, foram submetidos ao teste. Este teste foi realizado em um campo aberto (30 cm × 30 cm x 15 cm), confeccionado em acrílico, dividido em nove partes iguais. A iluminação durante o teste consistia em penumbra e houve exposição única de cada animal ao aparelho. Assim, os animais foram colocados no centro do campo e, após 1 minuto de adaptação, foi permitido

que eles explorassem livremente o cenário por 5 minutos (período do teste). Os parâmetros observados foram: o número de zonas cruzadas (quadrante completo) com as quatro patas (movimentação espontânea) e o número de comportamentos de autolimpeza. A coleta de dados foi manual, realizada por um avaliador sem conhecimento prévio dos tratamentos.

#### **4.5.2. Consumo de água e ração e acompanhamento do peso corporal**

A água e a ração foram disponibilizadas *ad libitum* e o consumo foi registrado diariamente e totalizando ao final de cada semana em mL/semana e g/semana, respectivamente. O peso corporal absoluto (g) dos animais foi registrado uma vez por semana. O experimento teve a duração de 9 semanas.

#### **4.5.3. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal**

O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI) foi realizado na 8<sup>a</sup>. semana a fim de avaliar os níveis de glicose no sangue em tempos determinados, após aplicação de sobrecarga de glicose.

Para o TTGI os animais, em jejum de 6h, receberam glicose (1g/kg, i.p.) e a glicemia foi determinada nos tempos 0 (antes da administração), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração da glicose. O sangue foi coletado da veia caudal e a glicemia foi quantificada em glicosímetro (Accu-Chek<sup>®</sup>, Bayer). Foi determinada a área sob a curva de cada grupo (LORD *et al.*, 2017).

#### **4.5.4. Coleta de sangue, tecidos e órgão**

Ao final da 9<sup>a</sup>. semana de tratamento, os animais foram colocados em jejum de 8h para posterior anestesia (100 mg/kg de cetamina + 10 mg/kg de xilazina, via intraperitoneal). Os animais foram medidos da região nasal até a região anal a fim de realizar a medida nasoanal para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC). Com os animais já anestesiados se deu prosseguimento à coleta de sangue (plexo retro orbital) para obtenção de soro. Após isto, foram eutanasiados com sobredose de anestésico (300 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina, i.p.) para coleta do fígado, tecido adiposo visceral, subescapular e subcutâneo e músculos vasto lateral, sóleo e gastrocnêmico. Todos os tecidos e órgão foram pesados, devidamente separados e estocados a -80°C (MELO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2011).

#### 4.5.5. Análises séricas

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 g, durante 15 min, para se obter o soro, que foi armazenado a -80°C para posteriores dosagens bioquímicas. Foram dosados os níveis séricos de colesterol total, triglicérides, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e glicose, utilizando kits bioquímicos, de acordo com as instruções do fabricante (LabTest®).

A insulina sérica foi quantificada por Elisa, utilizando kit específico (Millipore®, Billerica, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A resistência à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR, calculado como a glicose sérica em jejum (mmol/L) × insulina sérica em jejum (mU/L) /22.5 (MATTHEWS *et al.*, 1985).

#### 4.5.6. Análises teciduais

##### 4.5.6.1. Determinação do glicogênio hepático e muscular

Inicialmente o tecido hepático e um *pool* dos músculos vasto lateral, sóleo e gastrocnêmico foram pesados e homogeneizados (20% p/v) em KOH 30%. O homogenato de cada tecido foi mantido em banho-maria por 1 h, a 100 °C e em seguida, foi resfriado em banho de gelo. Os tubos contendo o tecido hepático ou muscular foram submetidos à fase de digestão, sendo, para tal, acrescidos Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado, 4mL de etanol 95%, agitado em vórtex e deixado em banho-maria a 80°C, por 15 min. Após esse período, foi centrifugado a 3000 g, durante 15 min, separado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada ao precipitado. Foi realizado mais uma lavagem com etanol 95% e água destilada e descartado o sobrenadante. O precipitado foi diluído com água destilada. Para a reação colorimétrica, foi adicionado 1mL de homogenato em 2 mL do reagente Antrona (0,2 g de Antrona em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95%) e homogeneizado em agitador vórtex. Em seguida foi colocado em banho-maria por 10 min e resfriado em banho de gelo. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm. O resultado foi expresso em mg de glicogênio/100mg de tecido (CARROLL, LONGLEY, ROE, 1956).

#### 4.5.6.2. *Análise Histológica*

##### 4.5.6.2.1. *Tecido Hepático*

Os fígados removidos foram embebidos em solução tampão de formaldeído a 10% para fixação por 24 horas. Após o período de fixação, os tecidos foram desidratados em etanol e embebidos em parafina, e então foram seccionados (4 mm) e corados com hematoxilina e eosina. A esteatose foi avaliada usando o escore estabelecido pela NASH Clinical Research Network (CRN), que é uma soma não ponderada de pontuação da porcentagem de esteatose (grau 0: ausente; grau 1: até 30%; grau 2: até 60% e grau 3: até 90%). A atividade inflamatória lobular avaliada com base no número de focos inflamatórios (considerado células neutrofílicas e mononucleares) por campo (0: ausente; 1: discreto infiltrado inflamatório; 2: moderado infiltrado inflamatório e 3: intenso infiltrado inflamatório) e balonização (0: ausente; 1: discreta e 2: moderada) (KLEINER *et al.*, 2005). Todas as análises foram realizadas por patologista habilitado, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, sem conhecimento prévio dos grupos, para evitar interferência nos resultados.

##### 4.5.6.2.2. *Tecido Adiposo*

Após coleta e pesagem do tecido adiposo visceral, este foi imerso em solução tampão de formaldeído a 10% para fixação por 24 horas. Fragmentos de cada tecido foram submetidos ao processamento histológico de rotina, embebidos em parafina, seccionados a 3µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

No tecido adiposo branco, imagens digitais foram obtidas de campos aleatórios para a mensuração do diâmetro do adipócito. Pelo menos 50 campos tiveram o seu maior e menor diâmetro de adipócito mensurados por animal. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (modelo Axio Scope. A1, Zeiss, Alemanha) e 20 imagens de cada lâmina foram capturadas com aumento de 200x. A gotícula de gordura foi medida usando o sistema de deconvolução do software ImageJ software 1 (LACERDA; SANTOS; AGUILA, 2010).

##### 4.5.6.3. *Determinação de proteínas de sinalização insulínica no fígado e músculo*

O tecido hepático e um *pool* do tecido muscular foram pesados e homogeneizados em solução tampão RIPA gelado, na proporção de 10% (p/v). Foram adicionados ao tampão

RIPA o coquetel inibidor de protease a 1:100 (v/v), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o ortovanadato de sódio a 1mM. O homogenato foi centrifugado a 13.000 g, por 15 min, a 4°C, e o sobrenadante foi estocado a -80°C.

Para a fração membranar do GLUT4, o sobrenadante foi centrifugado mais uma vez a 9.000 g por 20 min, seguido de uma ultracentrifugação a 180.000 g por 90 min. O pellet obtido foi ressuspenso em tampão e usado como a fração de membrana (KANDROR; PILCH, 2011).

A quantificação de proteínas foi realizada por meio do método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951).

As amostras foram preparadas com 50 µg de proteínas adicionadas ao tampão de Laemmli 5x (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 25 mg/kg azul de bromofenol e β-mecaptoetanol) (1:5 v/v). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) com concentração final de 8% de poliacrilamida (BioRad Laboratories). Ao término da corrida foi realizada a eletrotransferência das proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad Immu-Blot PVDF, BioRad Laboratories).

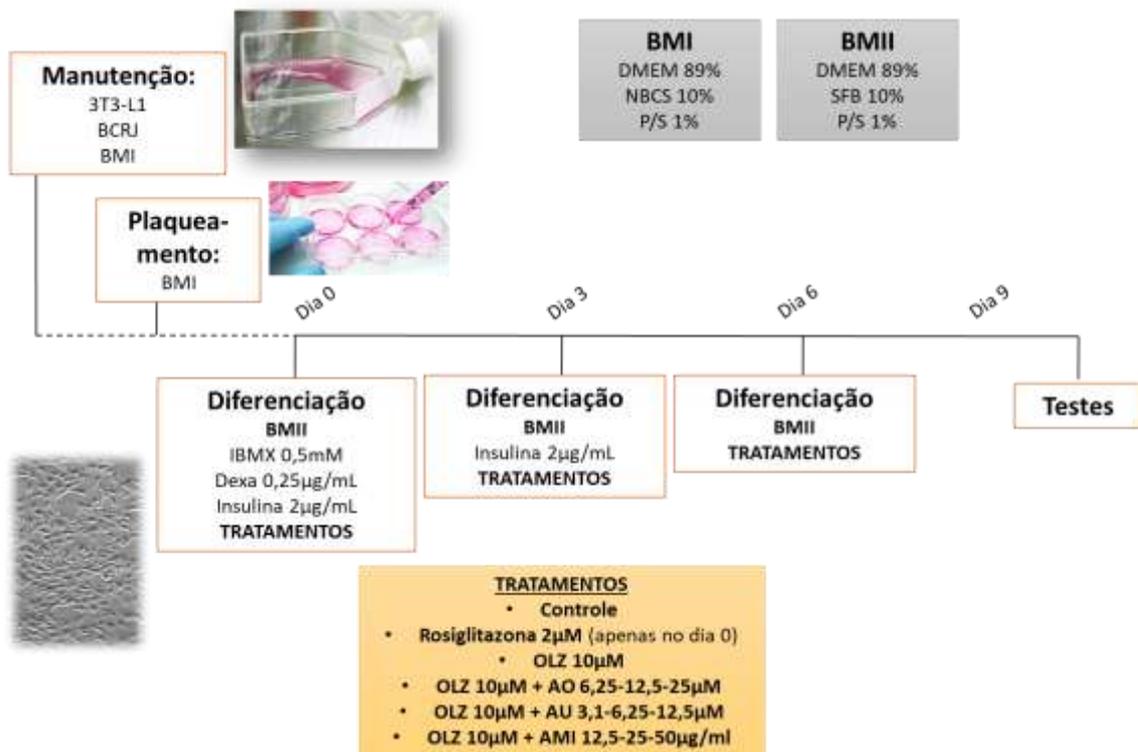
As membranas foram então incubadas com solução de leite desnatado 5% em tampão salina Tris-HCl, suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mMNaCl; 0,1% Tween 20), durante 2 h. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, por 16 h, a 4°C, com os anticorpos primários PI3K (4272, CellSignaling Technology®), p-AKT (9271, CellSignaling Technology®), p-IRS1 (2381, CellSignaling Technology®) e GLUT-4 (7938, Santa Cruz Biotechnology®). O anticorpo primário anti β-actina (CellSignaling Technology®) foi utilizado como padrão endógeno. Todos os anticorpos primários foram preparados em BSA 5% em TBST na proporção de 1:1000. As membranas foram novamente submetidas a cinco lavagens de 10 minutos com TBST, sob agitação moderada, e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com enzima peroxidase (7074, CellSignaling Technology®), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST, por 2 h, a temperatura ambiente. As membranas foram então fotografadas por um captador de imagens ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD). Para aquisição e edição das mesmas foi utilizado o programa ImageLab™ Software (versão 5.1). Após a normalização com β-actina, a média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 1 (um) e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias.

## 4.6. Protocolo experimental em células 3T3-L1

### 4.6.1. 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<sub>2</sub>. 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 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e suplementado com 10% de soro de bezerro recém-nascido (NBCS) (SUNG *et al.*, 2010). 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 foram acompanhados em microscópio óptico de inversão (NIKON, modelo Eclipse TS100).

Figura 11. Representação esquemática do delineamento experimental *in vitro*.



Fonte: o autor.

#### 4.6.2. *Indução da adipogênese em células 3T3-L1*

Para induzir a diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros foi utilizado o protocolo sugerido por Li e colaboradores (2016). As células 3T3-L1 foram mantidas em placas de 6 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, em meio basal I (DMEM *high glucose* 89%, NBCS 10% e antibióticos 1%). Nessa condição, as células atingem a confluência após 48h, quando o meio foi trocado pela primeira vez e inicia-se o dia 0. Na indução da diferenciação (dia 0) as células são incubadas com meio basal II (DMEM *high glucose* 89%, soro fetal bovino 10% e antibióticos 1%), contendo os fatores de indução da diferenciação, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,25  $\mu$ M de dexametasona e 2  $\mu$ g/mL de insulina (meio de indução). No dia 3, o meio foi trocado por meio basal II adicionado de 2 $\mu$ g/mL de insulina por 72 h. Após esse período, as células foram mantidas em meio basal II até o dia 9. A rosiglitazona, controle positivo, foi adicionada na troca do dia 0, na concentração de 2 $\mu$ M. Para avaliar o efeito da olanzapina na concentração de 10  $\mu$ M 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.

#### 4.6.3. *Ensaio de viabilidade celular*

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com o método descrito por Mosmann (1983). As células 3T3-L1 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL em meio basal I (descrição sucinta dos meios no item 3.7.2). Após 48 h, o meio basal I foi removido e adicionado meio basal II, mais os fatores de indução da diferenciação e os tratamentos, que consistiam em: controle (DMSO 0,001%), ácido oleanólico (AO) (1,56 – 100  $\mu$ M), ácido ursólico (AU) (1,56 – 100  $\mu$ M) ou  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (AMI) (6,25 – 400  $\mu$ g/mL). As células ficaram incubadas com esse tratamento durante 9 dias, com trocas a cada 3 dias, a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período foi adicionado 20  $\mu$ L em cada poço de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) na concentração de 5mg/mL. A placa permaneceu na estufa por 3 h. Em seguida a solução de cada poço foi aspirada e 150 $\mu$ L de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. A placa foi agitada por alguns minutos em *shaker*, e a leitura realizada em espectrofotômetro de placa (Biochrom® Asys, UVM 340) em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade, considerando o controle como 100% (HE *et al.*, 2013).

#### ***4.6.4 Avaliação do efeito dos triterpenos na adipogênese induzida por olanzapina em células 3T3-L1***

Para avaliar o efeito dos triterpenos sobre a diferenciação das células 3T3-L1 induzida por olanzapina, estas substâncias foram incubadas com as células nas concentrações de AO (6,25; 12,5 e 25 $\mu$ M), AU (3,125; 6,25 e 12,5  $\mu$ M) e AMI (12,5; 25 e 50  $\mu$ g/mL), desde o dia 0 até o dia 9 do processo de diferenciação, conforme detalhado no item 4.6.2.

As células foram observadas diariamente ao microscópio óptico e fotografadas no dia 9, onde foram submetidas à coloração com *Oil Red O* com o objetivo de avaliar e mensurar a inibição do processo de diferenciação. A solução de *Oil Red O* foi preparada na concentração de 0,5% (p/v) em álcool isopropílico (solução estoque). A solução estoque foi, então, misturada com água destilada, na proporção de 6:4 (solução de trabalho). Após os nove dias de diferenciação e tratamento com os triterpenos, os adipócitos foram lavados duas vezes com solução de PBS (tampão fosfato salina) e fixados com formaldeído 4% em PBS por 1h, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, seguido de 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% e a leitura realizada em espectrofotômetro de placa (Biochrom® Asys, UVM 340) em comprimento de onda de 510. O percentual de corante foi calculado relativo ao controle (KASTURI; JOSHI, 1982; SUNG *et al.*, 2010).

#### ***4.6.5. Quantificação de colesterol e triglicerídeos intracelulares***

Para quantificar o colesterol total (CT) e os triglicerídeos (TG) intracelulares, no dia 9, as células 3T3-L1 diferenciadas foram lavadas com PBS, e foram coletadas em tampão tris-HCl (25 mM, 1mM EDTA, pH 7,4). As células foram clivadas por sonicação. O sobrenadante foi coletado após centrifugação em 12000 g, por 15 min. As concentrações de CT e TG no sobrenadante foram analisadas por enzimologia utilizando os kits Labtest<sup>®</sup>, com leituras a 500 e 505 nm, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (NOH *et al.*, 2013).

#### **4.6.6. Determinação de proteínas de sinalização do metabolismo lipídico**

Após os nove dias de diferenciação e tratamento com os triterpenos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, adicionaram-se 300 µL 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 a 1 mM. Em seguida, foi feita a desaderência mecânica das células e transferiu-se o conteúdo para tubos tipo *ependorf*. As amostras ficaram em gelo por 2 h, e a cada 20 min eram agitadas no vórtex, e sonicadas por 5 min. Ao final, as células foram centrifugadas a 8000 g, por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante foi separado e conservado a -20°C para posterior quantificação das proteínas totais. A quantificação de proteínas foi realizada por meio do método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). As amostras foram preparadas com 25 µg de proteínas adicionadas ao tampão de Laemmli 5x. Todo o procedimento a partir daqui seguiu como descrito no item 4.5.6.3.

As membranas foram incubadas, por 16 h, a 4°C, com os anticorpos primários PPAR $\gamma$  (191407, Abcam<sup>®</sup>), SREBP-1 (8984, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>), FAS (55580, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>), AMPK $\alpha$  (2532, CellSignaling Technology<sup>®</sup>) e pAMPK (2531, CellSignaling Technology<sup>®</sup>). O anticorpo primário anti  $\beta$ -actina (CellSignaling Technology<sup>®</sup>) foi utilizado como padrão endógeno. Todos os anticorpos primários foram preparados em BSA 5% em TBST na proporção de 1:1000. As membranas foram submetidas aos mesmos processos descritos no item 4.5.6.3.

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados pela Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguida do teste de Student Newman Keuls. Para o acompanhamento semanal do peso, os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) *two way* seguida do teste de Bonferroni. 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  $p < 0,05$ .

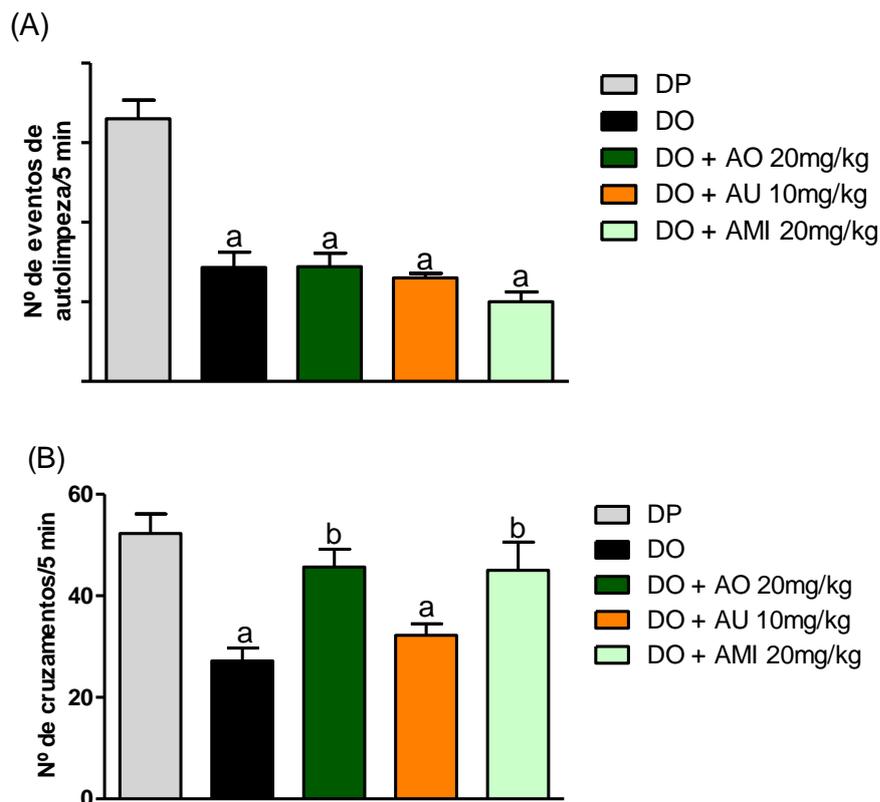
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Alterações comportamentais

No teste de campo aberto, utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, observamos que aqueles tratados com a dieta com olanzapina (DO) mostraram redução significativa no número de eventos de autolimpeza e no número de em comparação aos animais que receberam a dieta padrão (DP) (Figura 12).

O tratamento com o ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (AMI) não alteraram o número de eventos de autolimpeza em relação ao grupo DO (Figura 12A). Contudo, o tratamento com AO e AMI foram capazes de reverter de forma significativa o efeito da DO sobre a redução no número de cruzamentos (Figura 12B).

Figura 12. Efeito da olanzapina e de ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina no teste de campo aberto em camundongos C57BL6.



(A) Número de eventos de autolimpeza, (B) número total de cruzamentos realizados pelos animais durante 5 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo). DP=dieta padrão, DO=dieta associada a olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI= $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup>, \* p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (one way ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

## **5.2. Peso corporal, medidas murinométricas e consumo de água e ração durante dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6**

Ao início do experimento, todos os grupos experimentais apresentavam a mesma média de peso corporal (Tabela 2). Ao final da 9ª semana, o grupo DO apresentou um aumento significativo de 12,21% do peso corporal ( $22,33 \pm 0,28\text{g}$ ) em relação ao grupo DP ( $19,90 \pm 0,24\text{g}$ ). O tratamento com AO e com AMI reduziram significativamente o peso corporal dos animais em 8% ( $20,55 \pm 0,51\text{g}$ ) e 6% ( $21,01 \pm 0,37\text{g}$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo DO (Tabela 2 e Figura 13). Já o tratamento com AU não gerou diferença de peso em relação ao grupo DO ao fim do experimento.

Os animais do grupo DO também sofreram alteração no IMC ( $0,332 \pm 0,01$ ) com um aumento significativo em relação ao grupo DP ( $0,296 \pm 0,01$ ), alteração revertida pelos tratamentos com os triterpenos (Tabela 2).

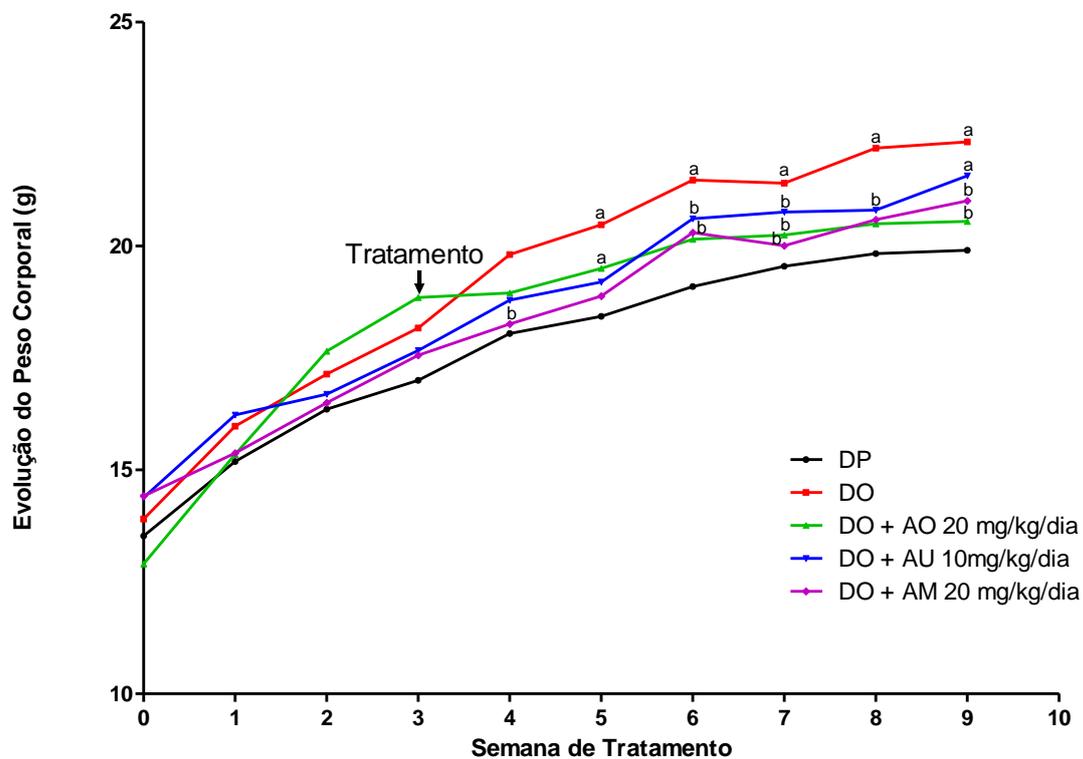
Os animais tratados com a ração associada à OLZ apresentaram uma diminuição significativa do consumo de ração em relação ao grupo DP. Não houve diferença significativa do consumo de água entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina no peso corporal, IMC, consumo de ração, consumo de água durante dieta associada à olanzapina.

	DP	DO	DO + AO 20 mg/kg	DO + AU 10 mg/kg	DO + AMI 20 mg/kg
Peso corporal inicial (g)	14,42 $\pm$ 0,32	14,38 $\pm$ 0,45	13,90 $\pm$ 0,53	14,38 $\pm$ 0,26	14,13 $\pm$ 0,53
Peso corporal final (g)	19,90 $\pm$ 0,24	22,33 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	20,55 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	21,57 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	21,01 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>
IMC	0,296 $\pm$ 0,01	0,332 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,311 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,316 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>	0,306 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Consumo de água (mL/semana)	27,29 $\pm$ 1,29	21,76 $\pm$ 0,93	25,70 $\pm$ 3,91	24,44 $\pm$ 0,93	24,91 $\pm$ 0,94
Consumo de ração (g/semana)	24,10 $\pm$ 0,81	19,42 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	19,26 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	17,85 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	18,31 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo). DP=dieta padrão, DO=dieta associada a olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI=  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (*one way* ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

Figura 13. Evolução do peso corporal de animais C57BL/6 em dieta com olanzapina por 9 semanas.



Os valores são expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo) do peso corporal (g). DP=dieta padrão, DO=dieta associada a olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI=  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (*two way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

### **5.3. Peso do fígado e da gordura corporal após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6**

Os camundongos do grupo DO apresentaram um aumento significativo do peso do fígado ( $406,9 \pm 6,82$  mg/10g) em relação ao grupo DP ( $370,8 \pm 10,62$  mg/10g). Os tratamentos com AO e AMI reduziram significativamente o peso do fígado ( $364,8 \pm 6,0845$  mg/10g e  $375,6 \pm 4,44$  mg/10g, respectivamente) em relação aos animais do grupo DO. Não houve alteração deste parâmetro no tratamento com AU (Tabela 3).

Em relação à deposição de gordura, não houve alteração estatística no peso da gordura visceral e gordura subcutânea entre os grupos, porém notou-se uma diminuição no peso da gordura subescapular do grupo DO ( $73,71 \pm 2,82$  mg/10g) em relação ao grupo DP ( $116,5 \pm 7,25$  mg/10g). Os tratamentos com AO e AU reverteram a quantidade de gordura subescapular alterada pelo tratamento com OLZ ( $115,3 \pm 11,82$  mg/10g) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina no peso do fígado e da gordura visceral, subescapular e subcutânea após dieta associada à olanzapina.

	DP	DO	DO + AO 20 mg/kg	DO + AU 10 mg/kg	DO + AMI 20 mg/kg
Fígado (mg/10g)	370,8±10,62	406,9± 6,82 <sup>a</sup>	364,8± 6,08 <sup>b</sup>	400,5± 5,09 <sup>a</sup>	375,6 ±4,44 <sup>b</sup>
Gordura visceral (mg/10g)	171,2±19,14	136,0±9,43	162,2±18,30	154,9± 8,69	182,1± 9,97
Gordura subcutânea (mg/10g)	133,6± 5,32	121,5± 5,19	135,2± 9,94	121,8± 6,24	113,6± 4,65
Gordura subescapular (mg/10g)	116,5± 7,25	73,71± 2,82 <sup>a</sup>	115,3±11,82 <sup>b</sup>	93,68± 4,22 <sup>a,b</sup>	87,75± 4,35 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo). DP=dieta padrão, DO=dieta associada à olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI=  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (*one way* ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

#### **5.4. Parâmetros plasmáticos após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6**

A glicemia ( $116,1 \pm 4,30$  mg/dL), insulina sérica ( $0,44 \pm 0,03$  ng/mL) e o índice de HOMA-IR ( $4,25 \pm 0,36$ ) foram significativamente elevados no grupo dos animais tratados com a DO, quando comparado com os animais que receberam a DP ( $90,14 \pm 4,20$  mg/dL,  $0,26 \pm 0,04$  ng/mL e  $1,87 \pm 0,27$ , respectivamente). Todos os tratamentos conseguiram normalizar a glicemia, AO 20 mg/kg ( $91,43 \pm 5,81$  mg/dL), AU ( $83,77 \pm 5,08$  mg/dL) e AMI ( $99,17 \pm 3,54$  mg/dL), aos valores do grupo DP. Contudo, apenas o grupo AO teve efeito de redução sobre a insulina sérica ( $0,27 \pm 0,04$  ng/mL) e do índice de HOMA-IR ( $2,02 \pm 0,27$ ) em relação ao grupo DO (Tabela 4).

Em relação ao perfil lipídico, os níveis de colesterol total, LDL, VLDL, HDL e triglicerídeos não demonstraram alterações significativas entre os grupos. Apenas AMI reduziu significativamente os triglicerídeos ( $44,09 \pm 1,67$  mg/dL) em relação ao grupo DO ( $64,09 \pm 6,61$  mg/dL).

Tabela 4. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina nos parâmetros séricos após dieta associada à olanzapina.

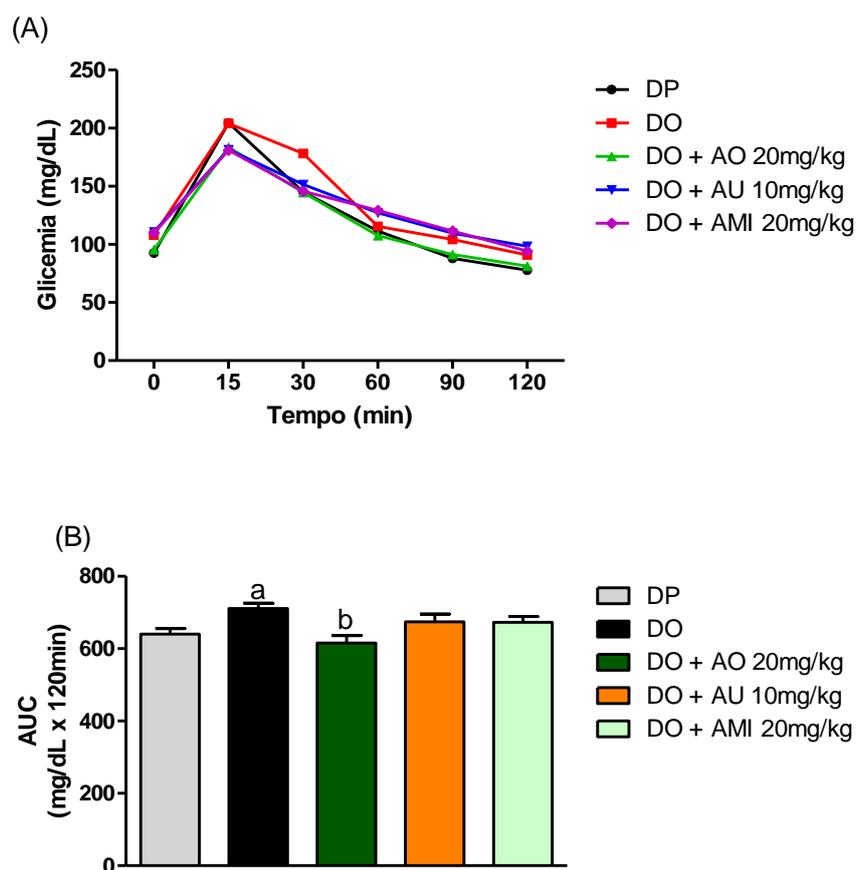
	DP	DO	DO + AO 20 mg/kg	DO + AU 10 mg/kg	DO + AMI 20 mg/kg
Glicose (mg/dL)	90,14±4,20	116,1±4,30 <sup>a</sup>	91,43± 5,81 <sup>b</sup>	83,77± 5,08 <sup>b</sup>	99,17± 3,54 <sup>b</sup>
Insulina (ng/mL)	0,26 ±0,04	0,44 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,38 ±0,05	0,37 ± 0,04
HOMA-RI	1,87 ± 0,27	4,25 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,27 <sup>b</sup>	4,10± 0,63 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,48 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	66,91± 1,98	63,96± 1,96	62,21± 2,16	64,92± 1,98	65,42± 3,49
LDL (mg/dL)	38,08± 2,01	33,43± 2,04	33,25± 1,90	32,77± 2,30	36,43± 3,40
VLDL (mg/dL)	11,00± 0,68	11,15± 0,53	10,84± 0,37	11,56± 0,76	10,12± 0,37
HDL (mg/dL)	17,83± 0,67	18,43± 0,90	18,12± 0,81	17,58± 0,91	17,54± 0,93
Triglicerídeos (mg/dL)	50,59± 4,08	64,09± 6,61	54,19± 1,83	61,42± 4,99	44,09± 1,67 <sup>b</sup>

Os resultados são apresentados como média  $\pm$ e.p.m. (n=10 animais/grupo). DP=dieta padrão, DO=dieta associada à olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI= $\alpha$ , $\beta$ -amirina.<sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (*one way* ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

### 5.5. Teste de tolerância à glicose durante dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6

Os camundongos do grupo DO apresentaram um padrão hiperglicêmico durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI), quando comparado ao grupo DP (Figura 14). Contudo, o tratamento com AO foi capaz de melhorar a tolerância à glicose (Figura 14A e 14B), sendo esse resultado evidenciado pela AUC do TTGI. Os tratamentos com AU e AMI não demonstraram alteração neste parâmetro.

Figura 14. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina sobre a tolerância a glicose durante dieta associada à olanzapina. (A) Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal de 0 a 120 min, (B) Área sobre a curva (AUC).



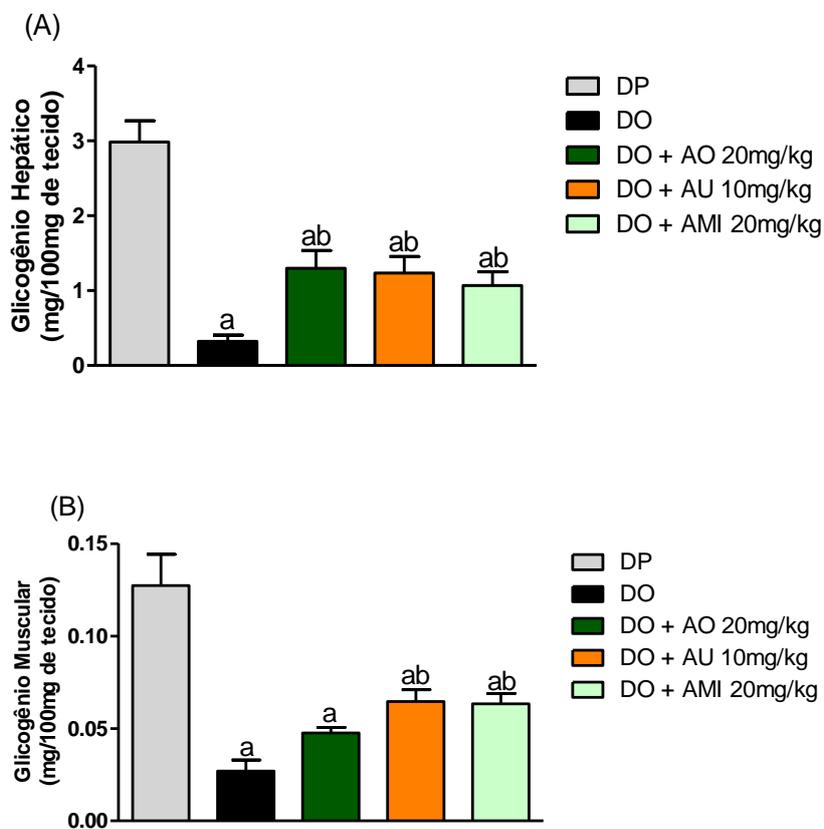
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo) da glicemia (mg/dL). DP=dieta padrão, DO=dieta associada a olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI= $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (Figura A: *two way* ANOVA pós-teste de Bonferroni. Figura B: *one way* ANOVA e pós-teste de Student Newman Keuls).

### **5.6. Níveis de glicogênio hepático e muscular após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6**

Os camundongos do grupo DO apresentaram diminuição significativa nos níveis hepáticos de glicogênio ( $0,77 \pm 0,28$  mg/100mg de tecido) em relação ao grupo DP ( $2,36 \pm 0,36$ mg/100mg de tecido) (Figura 15A). Todos os tratamentos aumentaram os níveis hepáticos de glicogênio: AO ( $1,30 \pm 0,23$  mg/100mg de tecido), AU ( $1,24 \pm 0,22$  mg/100mg de tecido) e AMI ( $1,07 \pm 0,18$  mg/100mg de tecido), tornando-se estatisticamente igual ao grupo DP (Figura 15A).

Em relação ao glicogênio muscular, também houve diminuição dos níveis quantificados no grupo DO ( $0,03 \pm 0,01$  mg/100mg de tecido) em relação ao grupo DP ( $0,13 \pm 0,02$  mg/100mg de tecido), apenas os tratamentos com AU ( $0,065 \pm 0,01$  mg/100mg de tecido) e AMI ( $0,064 \pm 0,01$  mg/100mg de tecido) conseguiram reverter as alterações neste parâmetro (Figura 15B).

Figura 15. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina sobre o glicogênio hepático (A) e muscular (B) após dieta com olanzapina.



Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=10 animais/grupo) do glicogênio (mg/100mg/tecido). DP=dieta padrão, DO=dieta associada à olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI=  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. <sup>a</sup> p<0,05 comparado a DP, <sup>b</sup> p<0,05 comparado a DO (one way ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

Tabela 5. Resumo dos resultados em camundongos C57BL6 em relação ao grupo dieta associada à olanzapina.

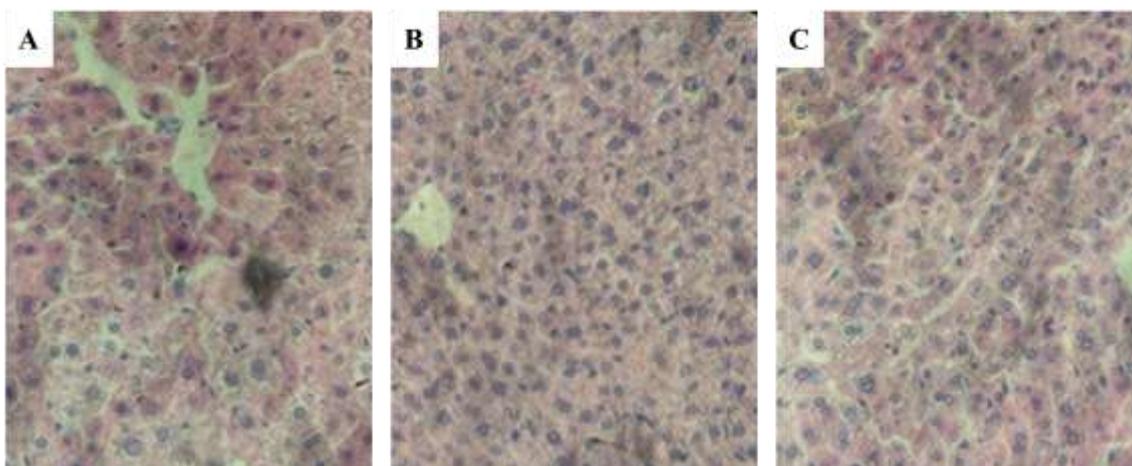
	DP	DO + AO 20 mg/kg	DO + AU 10 mg/kg	DO + AMI 20 mg/kg
<b>Teste de Campo Aberto</b>				
• <i>Nº de eventos de autolimpeza</i>	↑	=	=	=
• <i>Nº de cruzamentos</i>	↑	↑	=	↑
<b>Peso corporal final</b>	↓	↓	=	↓
<b>IMC</b>	↓	↓	↓	↓
<b>Peso do fígado</b>	↓	↓	=	↓
<b>Gordura subescapular</b>	↑	↑	↑	=
<b>Glicose</b>	↓	↓	↓	↓
<b>Insulina</b>	↓	↓	=	=
<b>HOMA-IR</b>	↓	↓	=	=
<b>AUC no TTGI</b>	↓	↓	=	=
<b>Glicogênio hepático</b>	↑	↑	↑	↑
<b>Glicogênio muscular</b>	↑	=	↑	↑

DO=dieta associada à olanzapina, AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI= $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina, IMC= índice de massa corporal, AUC= área sob a curva, TTGI= teste de tolerância à glicose intraperitoneal. ↓parâmetro diminui em relação à DO; ↑parâmetro aumentou em relação à DO; = parâmetro obteve mesmo resultado em relação à DO.

### 5.7. Avaliação das alterações histológicas do tecido hepático e tecido adiposo após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6

Como o AO demonstrou melhores resultado no ganho de peso e resistência insulínica (Tabela 5), seguimos as demais metodologias apenas com este triterpeno. Os fígados dos animais alimentados com a dieta padrão (DP) não apresentavam depósito gorduroso em mais 5% dos hepatócitos e ausência de balonização, no entanto, em alguns dos animais houve presença de discreto infiltrado inflamatório (Figura 16A). Os animais alimentados com a dieta associada à olanzapina (DO) e o tratamento com AO 20 mg/kg não promoveram alteração arquitetural do órgão, demonstrando histologia sem diferença significativa em relação ao grupo DP (Figura 16B e 16C).

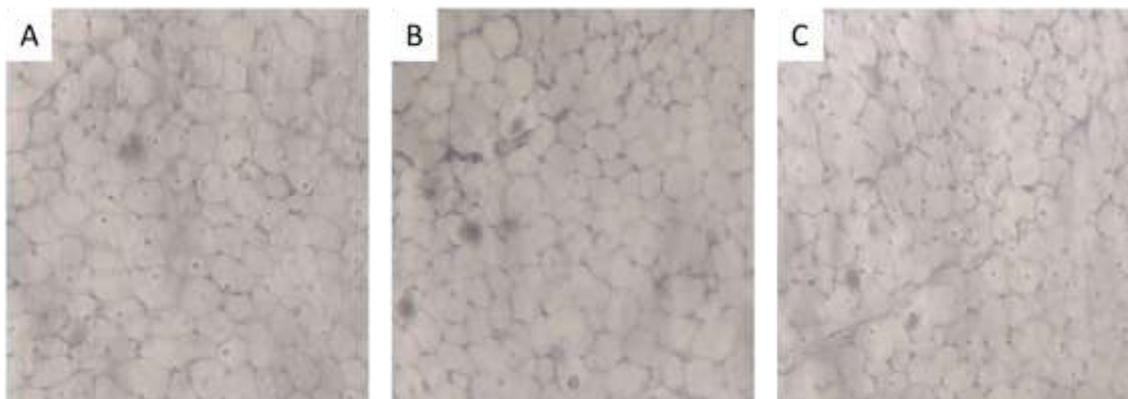
Figura 16. Fotomicrografia representativa do fígado de animais submetidos à dieta associada à olanzapina e tratamento com ácido oleanólico.



Dieta padrão (A), Dieta associada à olanzapina (B), Dieta associada à olanzapina com tratamento com ácido oleanólico 20 mg/kg (C) Aumento de 400 ×.

O tecido adiposo dos animais alimentados com DP se apresentou unilocular, disposto em aglomerados entremeados por pequenos vasos sanguíneos. Em trechos, visualizam-se ocasionais agregados de lipoblastos no interior da massa adiposa (Figura 17A). Os animais alimentados com DO e o tratamento com AO 20 mg/kg não promoveram alteração arquitetural do tecido, demonstrando histologia sem diferença significativa em relação ao grupo DP, apresentando mesma superfície celular média (Figura 17B e 17C).

Figura 17. Fotomicrografia representativa do tecido adiposo de animais submetidos à dieta associada à olanzapina e tratamento com ácido oleanólico.



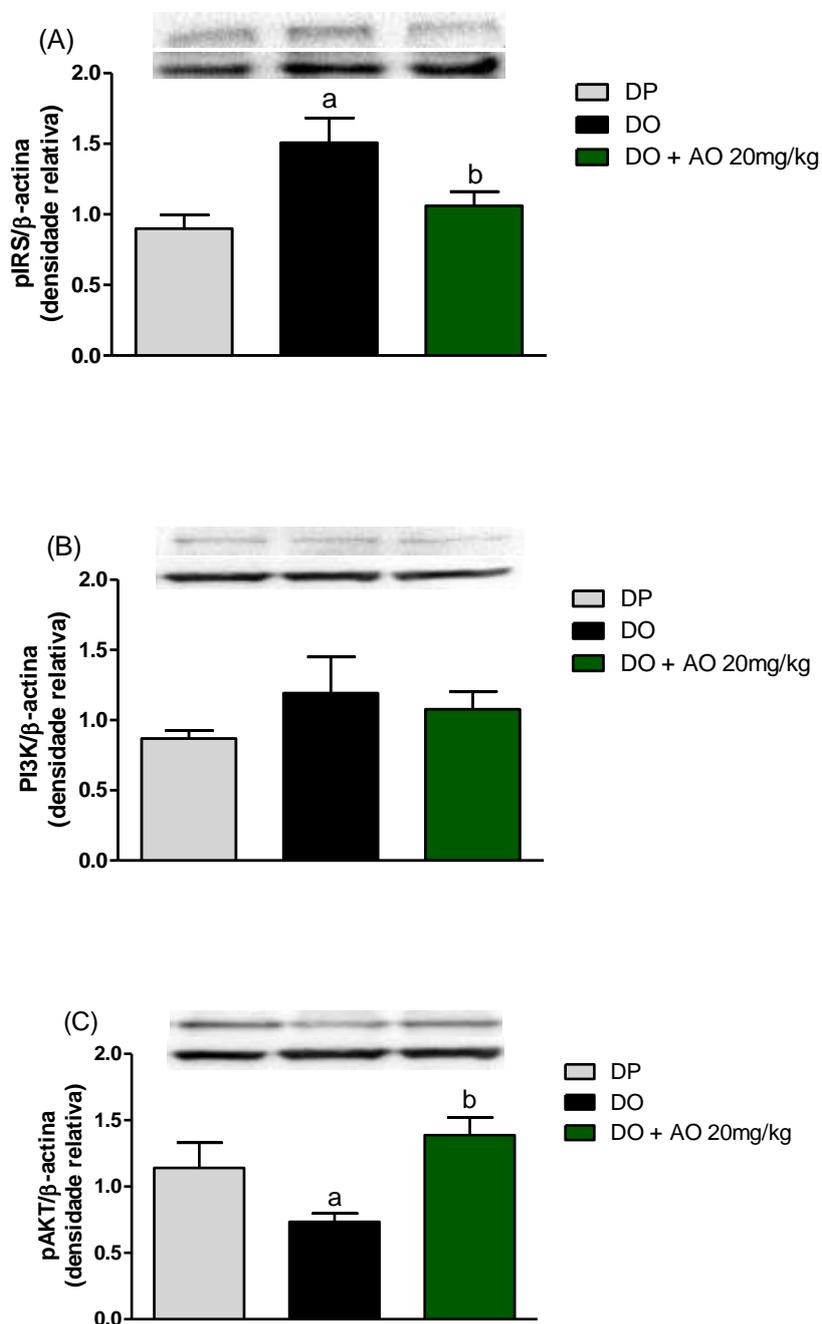
Dieta padrão (A), Dieta associada à olanzapina (B), Dieta associada à olanzapina com tratamento com ácido oleanólico 20 mg/kg (C) Aumento de 400 ×.

### **5.8. Avaliação da expressão proteica hepática de pIRS-1, PI3K e pAKT após dieta com olanzapina em camundongos C57BL/6**

A fim de identificar o mecanismo pelo qual o AO agiu, atenuando estes efeitos induzidos pela DO. Investigamos a expressão de proteínas envolvidas na cascata do transporte da glicose mediada pela insulina.

Como mostrado na Figura 18A evidenciamos que houve alteração da expressão relativa do IRS-1 fosforilado (Ser307) com a DO e que o tratamento com AO conseguiu reverter o aumento da expressão dessa proteína. Não houve alteração da expressão relativa do PI3K em nenhum dos grupos (Figura 18B). Entretanto, na fase final da sinalização, pelo pAKT, houve diminuição da expressão relativa desta proteína no grupo DO, com retorno a valores de normalidade após tratamento com AO (Figura 18C).

Figura 18. Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica hepática de pIRS-1 (A), PI3K (B) e pAKT (C) após dieta com olanzapina.



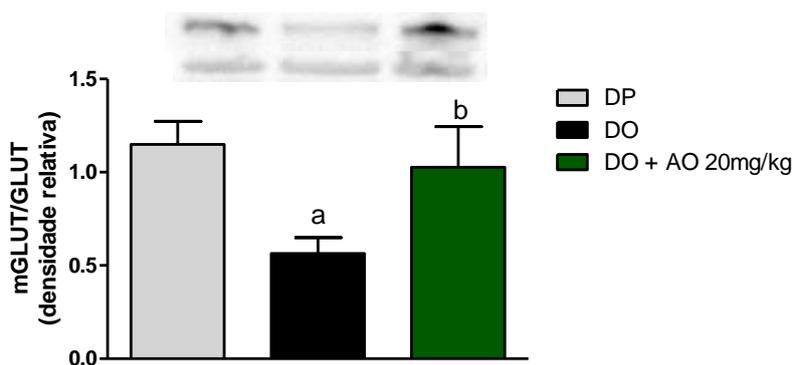
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. da expressão proteica em unidades arbitrárias. As bandas de proteínas de pIRS, PI3K e pAKT foram quantificadas em relação à  $\beta$ -actina. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado a DP, <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado a DO (*one way ANOVA*, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

### 5.9. Avaliação da expressão proteica muscular de GLUT-4 após dieta com olanzapina em C57BL/6

O principal responsável pela captação de glicose pela célula a partir do estímulo da insulina é o GLUT-4, sendo o resultado final da cascata IRS/PI3K/AKT.

Como mostrado na Figura 19 evidenciamos que houve uma redução significativa da expressão proteica relativo GLUT-4 de membrana com a DO em comparação com a DP. O tratamento com AO conseguiu reverter este achado com níveis de expressão proteica de GLUT-4 de membrana semelhantes ao grupo DP.

Figura 19. Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica muscular de GLUT-4 após dieta com olanzapina.

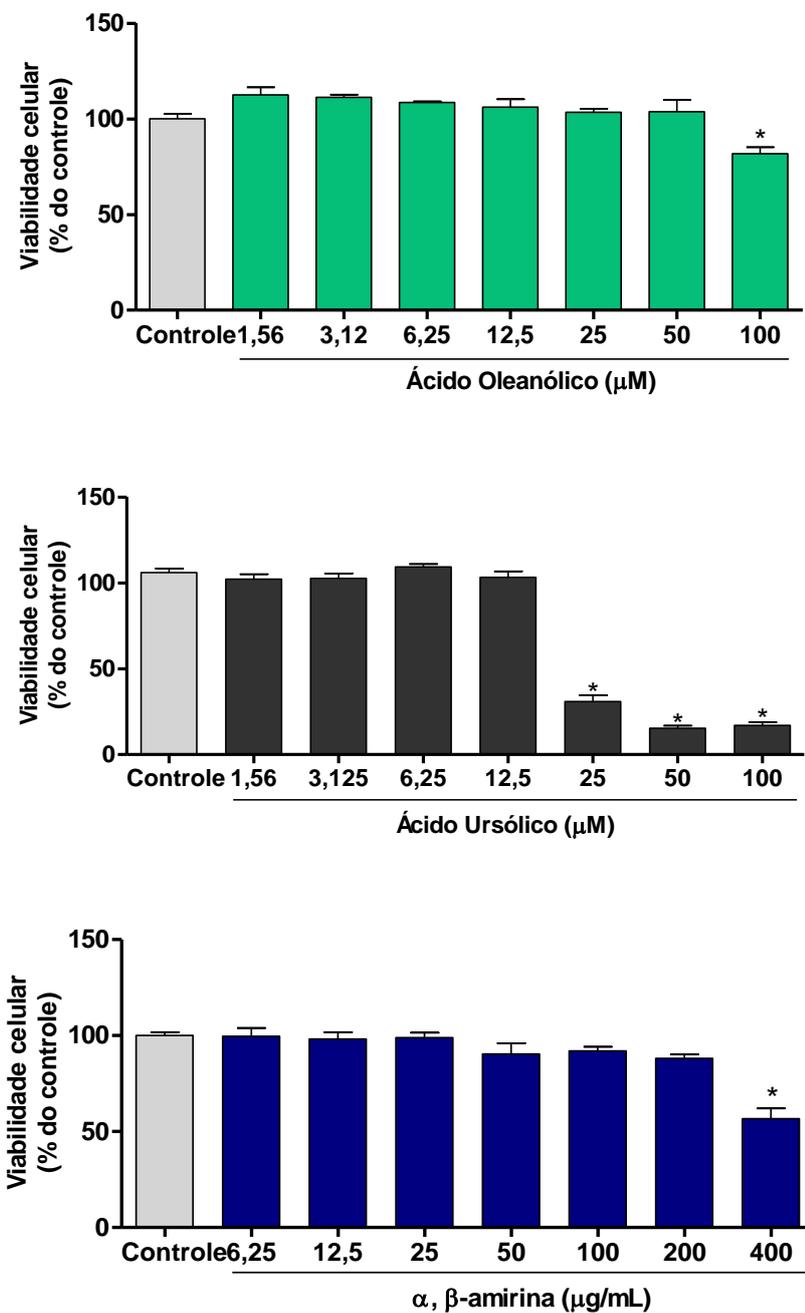


Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. da expressão proteica em unidades arbitrárias. As bandas de proteínas de mGLUT foi quantificado em relação à GLUT total. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado a DP, <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado a DO (*one way ANOVA*, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

### 5.10 Viabilidade celular em células 3T3-L1

O efeito dos triterpenos sobre a viabilidade das células 3T3-L1 foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT. As células foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações, AO e AU (1,56 – 100  $\mu$ M) e AMI (6,25 – 400  $\mu$ g/mL) durante todo o processo de diferenciação celular. O teste do MTT mostrou que apenas a concentração mais alta de AO (100  $\mu$ M) causou redução na viabilidade das células (18,3%). Já o AU teve uma citotoxicidade mais elevada, a partir da concentração de 25  $\mu$ M (70%). A AMI causou redução na viabilidade celular (43,2%) apenas na concentração mais alta testada (400  $\mu$ g/mL) (Figura 20).

Figura 20. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina sobre a viabilidade de células 3T3-L1.



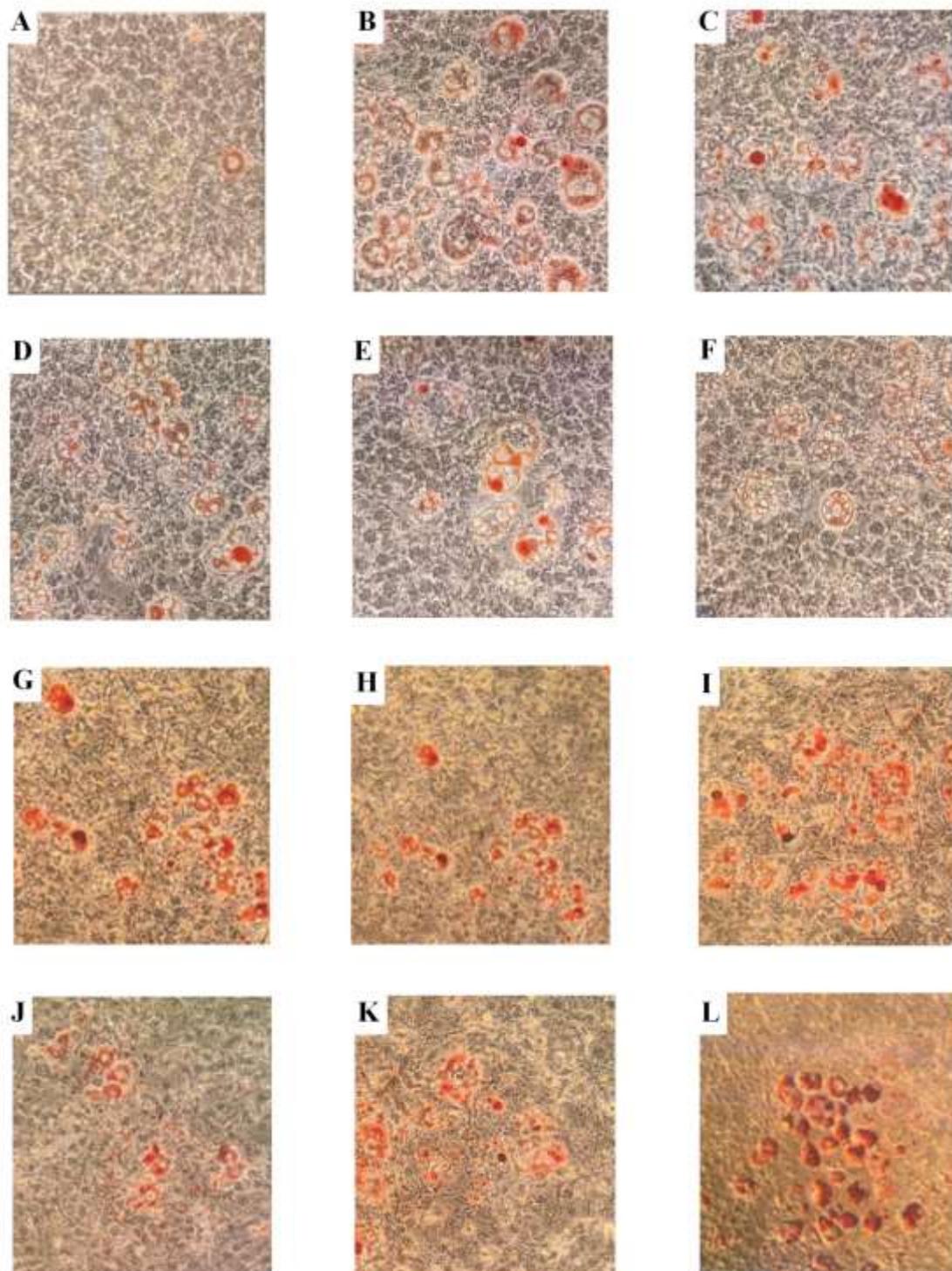
Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle. \* $p < 0,05$  vs controle (one way ANOVA com pós-teste de Student Newman-Keuls).

### 5.11. Efeito dos triterpenos sobre a diferenciação de 3T3-L1 induzida por olanzapina

As células 3T3-L1 foram submetidas ao processo de diferenciação por OLZ e tratadas com AO, AU e AMI durante 9 dias. As células foram submetidas à coloração com *Oil Red O*, fotografadas ao microscópio no dia 9, seguidas de quantificação (Figura 21).

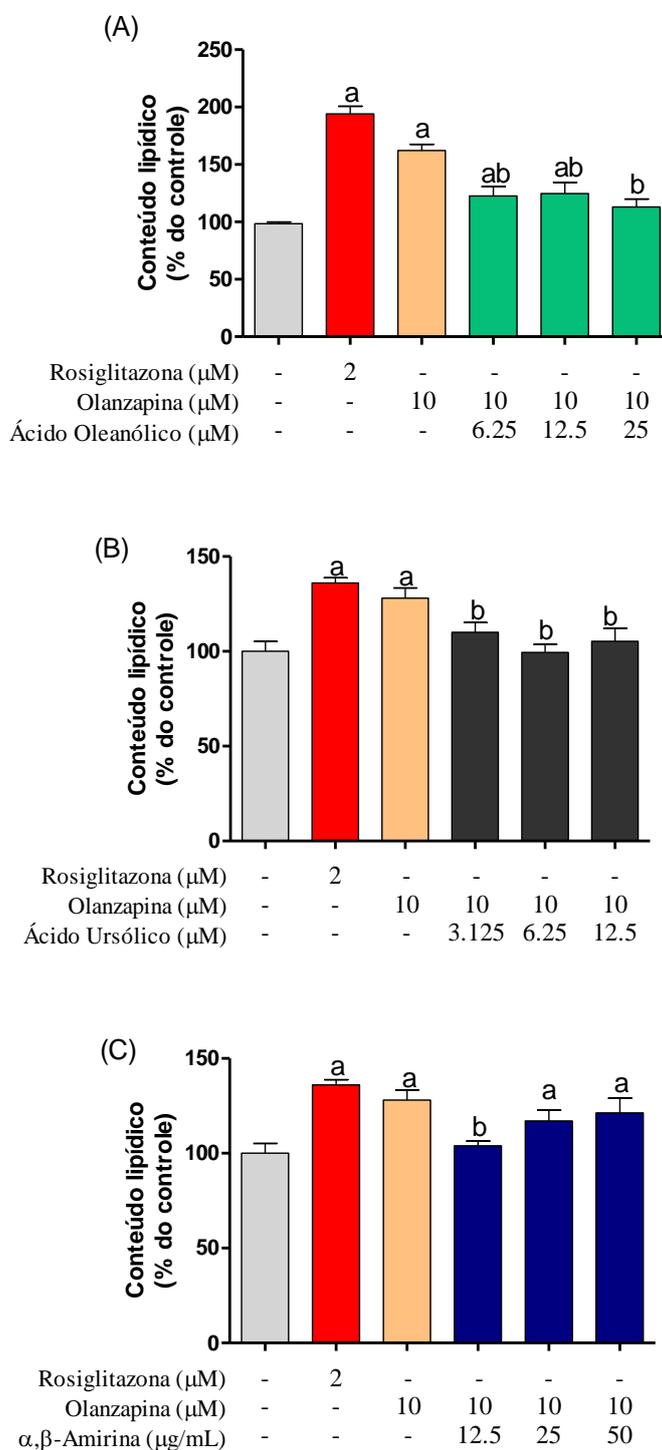
A análise pela coloração com *Oil Red O* nos adipócitos diferenciados mostra que a OLZ consegue aumentar o processo de diferenciação nas células 3T3-L1 ( $62,24 \pm 5,26$  %) de forma semelhante ao controle positivo, rosiglitazona ( $94,05 \pm 6,61$  %). O tratamento com AO nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  reduziu o acúmulo de lipídeo nas células quando comparadas ao grupo OLZ em aproximadamente 25, 23 e 40%, respectivamente (Figura 22A). O tratamento com AU nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  reduziu o acúmulo lipídico em 18, 28 e 23%, respectivamente (Figura 22B). E por fim, o tratamento com AMI conseguiu reduzir o acúmulo lipídico apenas na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (15%) (Figura 22C). Assim, estes resultados mostram que os três triterpenos testados influenciam no processo de diferenciação induzido por OLZ dos adipócitos.

Figura 21. Fotomicrografias de células 3T3-L1 diferenciadas com olanzapina e submetidas à coloração com *Oil Red O* após tratamento com ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina.



Controle (A), Rosiglitazona 2  $\mu$ M (B), OLZ 10  $\mu$ M (C), OLZ 10 $\mu$ M + AO 6,25 $\mu$ M (D), OLZ 10 $\mu$ M + AO 12,5 $\mu$ M (E), OLZ 10 $\mu$ M + AO 25 $\mu$ M (F), OLZ 10 $\mu$ M + AU 3,125 $\mu$ M (G), OLZ 10 $\mu$ M + AU 6,25 $\mu$ M (H), OLZ 10 $\mu$ M + AU 12,5 $\mu$ M (I), OLZ 10 $\mu$ M + AM 12,5 $\mu$ g/mL (J), OLZ 10 $\mu$ M + AM 25 $\mu$ g/mL (K), OLZ 10 $\mu$ M + AM 50 $\mu$ g/mL (L). Aumento de 400  $\times$ .

Figura 22. Quantificação dos níveis lipídicos de células 3T3-L1 diferenciadas por olanzapina, tratadas com ácido oleanólico (A), ácido ursólico (B) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (C) e coradas com *Oil Red O*.



Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem do conteúdo lipídico. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado a OLZ (one way ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

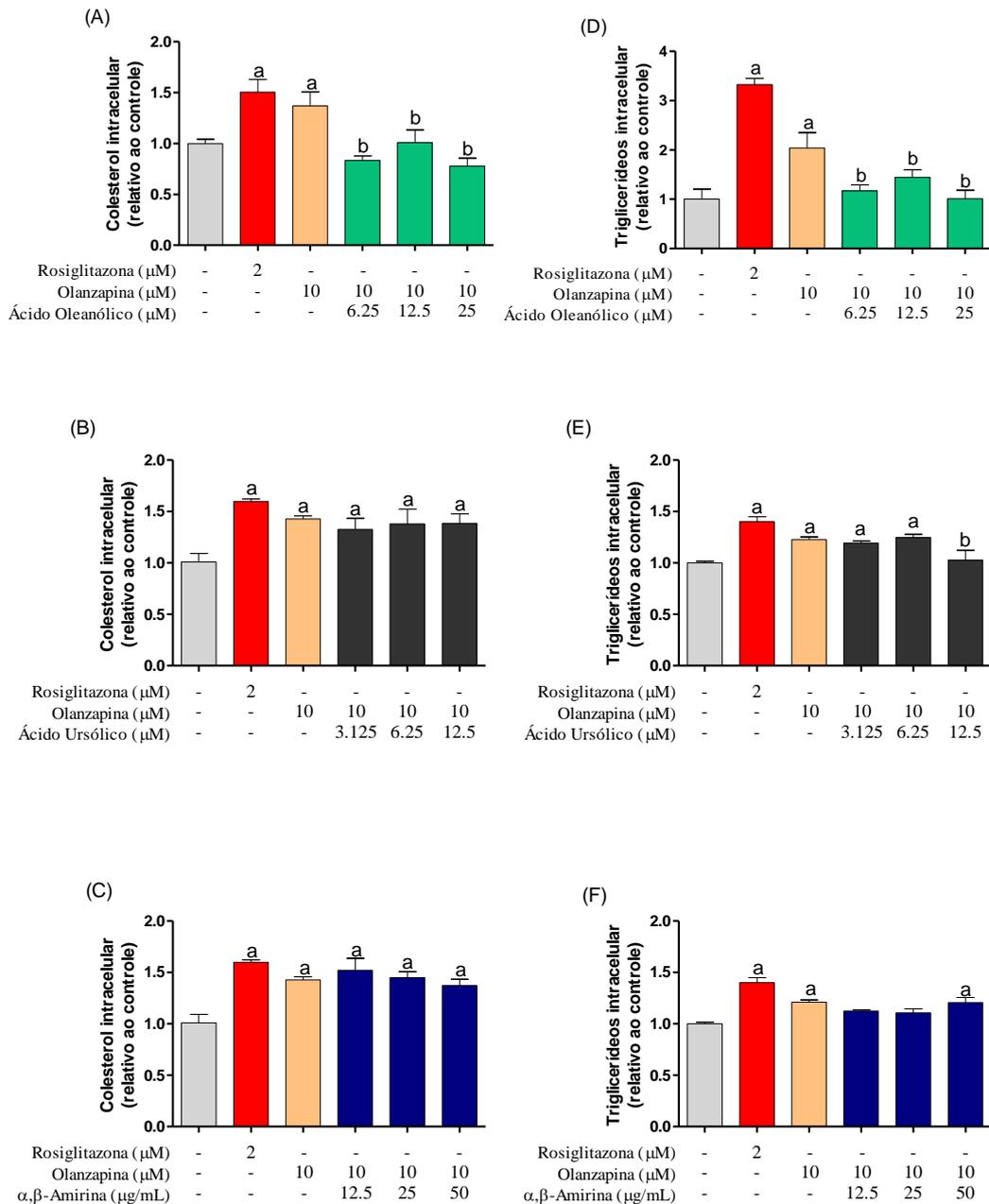
### **5.12. Quantificação de colesterol total e triglicerídeos intracelulares em células 3T3-L1**

O conteúdo de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) intracelulares foi quantificado 9 dias após a diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1.

Em relação ao CT intracelular, houve aumento dos níveis de CT intracelular nos grupos rosiglitazona e olanzapina, com posterior remissão dos níveis após tratamento com AO em todas as concentrações testadas. As concentrações de 6,25, 12,5 e 50  $\mu\text{M}$  apresentaram redução de aproximadamente 40, 26 e 43%, respectivamente (Figura 23A). Em relação aos tratamentos com AU e AMI, neste parâmetro não houve efeito nas concentrações testadas (Figura 23B e 23C)

O conteúdo de TG aumentou significativamente nas células cultivadas apenas com rosiglitazona em relação ao grupo controle. O tratamento apenas com olanzapina também revelou aumento de TG intracelulares, enquanto o tratamento com AO nas concentrações de 6,25, 12,5 e 50  $\mu\text{M}$  diminuíram 42, 28 e 50% os níveis de TG intracelulares, respectivamente (Figura 23D). Já o tratamento com AU causou redução no nível de TG intracelulares na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  (20%) (Figura 23E). Por fim, o tratamento com AMI não revelou alteração também neste parâmetro (Figura 23F).

Figura 23. Efeito do ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina sobre o acúmulo intracelular de (A) triglicerídeos e (B) colesterol total durante diferenciação de células 3T3-L1 com olanzapina.



Os resultados são apresentados como média  $\pm$ E.P.M. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado a OLZ (one way ANOVA, seguida de pós teste Student Newman-Keuls).

Tabela 6. Resumo dos resultados em células 3T3-L1 em relação ao grupo olanzapina.

	Olanzapina 10 $\mu$ M + AO ( $\mu$ M)			Olanzapina 10 $\mu$ M + AU ( $\mu$ M)			Olanzapina 10 $\mu$ M + AMI ( $\mu$ g/mL)		
	6,25	12,5	25	3,125	6,25	12,5	12,5	25	50
<b>Conteúdo lipídico</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	=
<b>Colesterol intracelular</b>	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=
<b>Triglicerídeo intracelular</b>	↓	↓	↓	=	=	↓	=	=	=

AO=ácido oleanólico, AU=ácido ursólico, AMI= $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. ↓parâmetro diminui em relação à olanzapina; ↑parâmetro aumentou em relação à olanzapina; = parâmetro obteve mesmo resultado em relação à olanzapina.

### 5.13. Avaliação da expressão proteica de fatores de transcrição da adipogênese em células 3T3-L1

Como o AO demonstrou melhores resultado nos parâmetros bioquímicos (Tabela 6), buscamos identificar o mecanismo pelo qual o AO agiu na alteração da adipogênese.

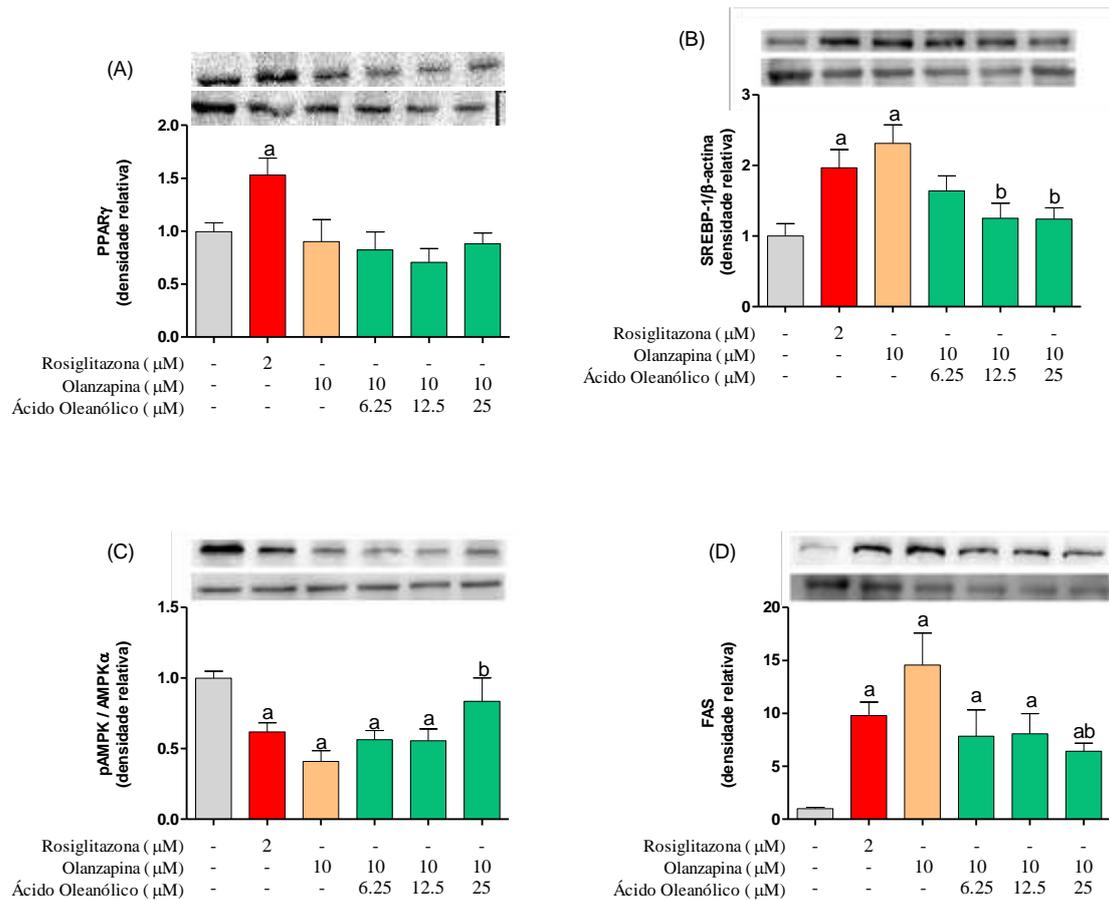
Foi analisada a expressão do regulador da adipogênese PPAR $\gamma$  no 9º. dia da diferenciação celular. A expressão de PPAR $\gamma$  foi 53% maior nas células diferenciadas tratadas com rosiglitazona quando comparadas com o grupo controle. Por sua vez, o tratamento das células com olanzapina não gerou diferença nesse parâmetro (Figura 24A).

A expressão de SREBP-1, fator de transcrição relacionado com a lipogênese, também foi analisada após nove dias de diferenciação com e sem olanzapina e tratamento com AO. A expressão deste fator de transcrição foi 96% maior nas células diferenciadas tratadas com rosiglitazona quando comparadas ao grupo controle. Em relação ao tratamento com olanzapina, houve um aumento de 130% na expressão do SREBP-1, e, por sua vez, as concentrações de 12,5 e 25 $\mu$ M do AO reduziram em 45% e 46% a sua expressão (Figura 24B).

Em relação à expressão de AMPK $\alpha$  total e sua fosforilação, tanto a rosiglitazona quanto a olanzapina reduziram a fosforilação desta proteína. O AO na concentração de 25  $\mu$ M conseguiu reverter este efeito (Figura 24C).

Em decorrência da expressão aumentada de SREBP-1 observada no estudo, investigamos a expressão da sintase de ácidos graxos (FAS) que regula genes necessários para a lipogênese. Como mostrado na Figura 24D, foi observado que a expressão da FAS no grupo rosiglitazona e olanzapina foi significativamente aumentada em relação ao grupo controle, e que os tratamentos com AO foram capazes de reverter parcialmente a sua expressão.

Figura 24. Efeito do ácido oleanólico sobre a expressão proteica de PPAR $\gamma$  (A), SREBP-1 (B), pAMPK/AMPK (C) e FAS (D) em células 3T3-L1 diferenciadas.



Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. da expressão proteica em unidades arbitrárias. As bandas de proteínas de PPAR $\gamma$ , SREBP-1 e FAS foram quantificadas em relação à  $\beta$ -actina e pAMPK foi quantificado em relação à AMPK total. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado a OLZ (*one way* ANOVA, seguida de pós teste de Student Newman-Keuls).

## 6. DISCUSSÃO

Os antipsicóticos atípicos são amplamente utilizados no tratamento de doenças psiquiátricas e apresentam, em diferentes graus, um risco de ganho de peso. Este risco está diretamente associado a um aumento na síndrome metabólica ou eventos cardiovasculares, tornando o estudo de medidas que evitam o avanço desses efeitos de suma importância para o sucesso do tratamento (BARTON *et al.*, 2020). Dentro desse grupo encontra-se a olanzapina (OLZ), droga utilizada no tratamento da esquizofrenia, que tem como principais reações adversas associadas ao seu uso: ganho de peso, hiperglicemia, dislipidemias, resistência à insulina e elevação da prolactina (CITROME *et al.*, 2019).

Neste estudo, foi avaliada a atividade dos triterpenos ácido oleanólico (grupo oleanano), ácido ursólico (grupo ursano) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (63:27, grupo ursano:oleanano) sobre os efeitos adversos metabólicos causados pelo tratamento com OLZ em camundongos C57BL/6.

Primeiramente foram realizados alguns testes comportamentais como *screening* para avaliar os efeitos dos triterpenos sob o efeito comportamental da OLZ. O teste do campo aberto é um método utilizado para estimar índices comportamentais e níveis de emocionalidade em animais (GRABOVSKAYA; SALYHA, 2014).

Os eventos de *grooming*, ou de autolimpeza, estão correlacionados positivamente com os níveis de ansiedade (GRABOVSKAYA; SALYHA, 2014). Todos os animais tratados com OLZ tiveram significativa diminuição no número de eventos de autolimpeza, inclusive os grupos tratados com AO, AU e AMI em relação ao grupo DP.

O próprio mecanismo de ação da OLZ, um modesto antagonista dopaminérgico, com maior ação nos receptores de 5-HT, não gera efeito direto em sintomas de ansiedade, apesar de já existirem relatos de sucesso em terapia de ansiedade resistente (SEPEDE *et al.*, 2006; HOLLIFIELD *et al.*, 2005).

Um estudo demonstrou que apenas as mais altas doses de OLZ testadas (1,0 e 2,0 mg/kg) causaram diminuição dos parâmetros de ansiedade no teste do campo aberto em fêmeas *Sprangle dawley* em relação ao grupo normal, sem indução de esquizofrenia, assim como realizamos no presente trabalho (WESTON-GREEN; HUANG; DENG, 2011).

Um outro parâmetro deste teste é a avaliação da atividade locomotora. Existem animais com alta resposta locomotora, que são mais psicoestimulados e/ou estressados,

e animais com baixa resposta locomotora, que é relacionado ao medo ao espaço aberto, ou oposição aos fatores citados acima. O animal é colocado em uma caixa de acrílico, dividido em nove quadrantes iguais. Dentre os parâmetros avaliados está o número de cruzamentos, que consiste na quantidade de vezes que o animal atravessa completamente de um quadrante ao outro (FILE, 2001). Em nosso protocolo, os animais tratados com OLZ apresentaram menor número de cruzamentos que os animais sem tratamento, demonstrando que a OLZ é capaz de diminuir a atividade locomotora dos animais. Esta alteração é parcialmente responsável pelo ganho de peso, já que há um menor gasto energético por parte desses animais.

A serotonina (5-HT) tem efeito direto na locomoção/exploração e eventual motivação do animal (CORREIA *et al.*, 2017). A OLZ por ser antagonista do receptor da 5-HT, altera diretamente este parâmetro. Vários estudos comportamentais demonstram que a movimentação ou números de cruzamentos de animais tratados com OLZ é significativamente diminuído em fêmeas *Sprague dawley* (WESTON-GREEN; HUANG; DENG, 2011; JAFARI *et al.*, 2013), fêmeas *Wistar* (TALER *et al.*, 2016) e machos *Wistar* (ROGOZ; SKUZA, 2011).

Em relação aos demais receptores, a OLZ é um antagonista D2 modestamente potente. Além disso, o fármaco inibe os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgico, muscarínicos e histamina-1 (SHELTON; PAPAKOSTAS, 2008).

Esse perfil complexo de ligação ao receptor parece afetar os sistemas dopaminérgicos de maneira importante. O bloqueio de ambos os receptores 5HT<sub>2A</sub> e 5HT<sub>6</sub>, em face do bloqueio fraco do receptor D<sub>2</sub>, aumenta a liberação de dopamina em maior extensão do que seria visto pelo bloqueio de ambos os receptores isoladamente. O aumento da liberação de dopamina no córtex frontal e no núcleo *accumbens* melhora a motivação e a atenção (SARIN; PORTO, 2009). Essa alteração no perfil dopaminérgico pode estar associada ao aumento de peso natural de paciente esquizofrênicos. Estudos sugerem que os peptídeos CART, um importante regulador do apetite, modulam o sistema dopaminérgico mesolímbico, sendo o responsável por algumas alterações durante o desequilíbrio da obesidade (ALVAREZ-LEITE; SOARES; TEIXEIRA, 2016).

Apenas o tratamento do AU não gerou alteração no número de cruzamentos no teste de campo aberto. De fato, em estudo do efeito ansiolítico do AU, o teste do campo aberto não causou alteração na locomoção espontânea dos animais, apesar das demais

respostas comportamentais observadas terem sido indicativas de ação ansiolítica (COLLA *et al.*, 2015).

Os tratamentos com AO e AMI reverteram a inibição da atividade locomotora dos animais, aumentando o número de cruzamentos, deixando-os próximos aos valores do grupo DP. A presença do grupo oleanano pode ter sido o responsável por este resultado, já que o AU não alterou este parâmetro.

Na literatura, o AO na dose de 30 mg/kg, frente a animais *naive*, não apresentou diferença no número de cruzamentos. Porém, quando os animais foram induzidos a um comportamento esquizofrênico com MK-801, um antagonista do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), o tratamento na mesma dose de AO conseguiu diminuir a atividade locomotora dos animais, aproximando-os dos resultados dos animais do grupo normal (PARK *et al.*, 2014).

Estudo com derivados químicos do AO, em camundongos *Swiss* machos, revelou que sua forma acrilada tem efeitos antidepressivos mediados pelo receptor 5-HT1A, utilizando testes semelhantes aos utilizados no presente trabalho (FAJEMIROYE *et al.*, 2015).

Em relação ao segundo triterpeno testado, um estudo para avaliar o efeito antidepressivo e ansiolítico do AU revelou que este triterpeno tem possível ação no sistema serotoninérgico. Foi administrado em um grupo o PCPA (inibidor de triptofano hidroxilase, envolvido na síntese de serotonina), e em outro, uma subdose de fluoxetina (inibidor seletivo da recaptção de serotonina), seguido de veículo ou AU. Foram realizados os testes de suspensão da cauda e o de campo aberto. O efeito antidepressivo do AU foi inibido pelo tratamento com PCPA, e potencializado com o tratamento com a fluoxetina, sugerindo a atividade na via serotoninérgica (COLLA *et al.*, 2015). Porém, neste mesmo estudo foi demonstrado que além de agir via serotoninérgica, também o sistema noradrenérgico era necessário para os efeitos antidepressivos. O mesmo grupo de pesquisadores avaliou a via dopaminérgica, demonstrando que o ácido ursólico também pode ter efeito antidepressivo lançando mão desta via (MACHADO *et al.*, 2012). A pluridade de afinidade por receptores na ação no SNC do AU, associado à sua característica não competitiva, não afetou a ação da OLZ em nossos testes, sendo o triterpeno com melhor resultado neste parâmetro.

Em relação à AMI, este triterpeno também já foi testado quanto aos seus efeitos ansiolíticos e antidepressivos. Os experimentos evidenciaram efeitos sedativos e ansiolíticos da AMI que podem envolver uma ação sobre os receptores do tipo

benzodiazepínico, já que sua atividade foi revertida pelo pré-tratamento com flumazenil. Houve também diminuição no número de cruzamentos e de autolimpezas após tratamento com AMI 10 e 25 mg/kg (ARAGÃO *et al.*, 2006).

Dessa forma podemos perceber que pode haver uma competição entre a OLZ e o AO e AMI nos receptores da 5-HT, fazendo com que a OLZ não consiga fazer o bloqueio deste com tanta eficiência, causando assim, a alteração de alguns parâmetros comportamentais relativos a ele, como a atividade locomotora acima descrita. É importante salientar que os valores dos triterpenos do grupo oleanano não ultrapassaram aqueles obtidos com os animais do grupo DP.

Nos testes comportamentais, modelos de indução de esquizofrenia, como aquele induzido por feniclidina, por exemplo, aumentam tanto a locomoção, como os parâmetros de ansiedade. O tratamento com OLZ é o responsável por reverter esses sintomas (JAFARI *et al.*, 2013). Nossos animais não sofreram indução de esquizofrenia, mas nota-se que houve uma diminuição da atividade motora e nos eventos de autolimpeza causada pela OLZ mesmo em detrimento aos animais normais.

Nossos resultados demonstraram que os triterpenos, de uma forma geral, podem alterar os efeitos comportamentais causados pela OLZ em animais normais. Apesar dos triterpenos já terem demonstrado efeito não competitivo nos receptores de 5-HT (PARK *et al.*, 2014), a relação com a reversão do efeito ansiolítico pode estar ligada às respostas destes receptores, visto que a OLZ é antagonista da 5-HT. Este fato foi mais acentuado nos triterpenos do grupo oleanano, provavelmente pela maior afinidade aos receptores.

Dessa forma, percebe-se a necessidade de testes mais específicos, com animais em indução de esquizofrenia, para identificar se as alterações geradas irão modificar o efeito terapêutico da OLZ. Além disso, haja visto um resultado promissor na reversão dos efeitos adversos da OLZ pelos triterpenos, não podemos descartar o melhoramento químico da molécula, como já descrito em estudos anteriores (FAJEMIROYE *et al.*, 2015).

A linhagem C57BL/6 é amplamente utilizada em modelos de distúrbios metabólicos, em modelos de obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, aterosclerose, dentre outros. Em estudos de ganho de peso, essa linhagem chegou a aumentar quatro vezes o peso corporal em indução de dieta hiperlipídica por 16 semanas (BOSE *et al.*, 2008). Também após dieta hiperlipídica por 8 semanas, percebeu-se um aumento de 11,4% no peso corporal desses animais (LIN *et al.*, 2005), valor bem próximo ao encontrado em nosso estudo apenas com dieta associada a OLZ.

Em nosso trabalho, a ingestão crônica de OLZ aumentou significativamente o ganho de peso, resultado consistente com diversos estudos anteriores (ARJONA *et al.*, 2004; LORD *et al.*, 2017; HOU *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2018). Estudos relatam que o ganho de peso em humanos varia de 2,7 a 18,1 kg após tratamento em doses variadas por aproximadamente 1 ano (PEDRERO; RASTROLLO; MARTI, 2019).

Em um estudo retrospectivo de 2005 a 2015 no Reino Unido foi avaliada a mudança de peso pelo tratamento com OLZ a curto e longo prazo. Nas primeiras seis semanas de tratamento houve um ganho de peso em média 3,2 kg em doses altas e 1,9 kg em dose baixa. Após 4 anos de tratamento, houve um ganho médio de peso de 6,1 kg. Outros antipsicóticos foram avaliados (quetiapina e risperidona), porém a OLZ foi associada à maior alteração de peso (ÁLVAREZ *et al.*, 2019).

Graças a este efeito adverso, a discussão atual sobre o uso de antipsicóticos e especificamente OLZ em pacientes com anorexia nervosa é relevante. Estudos mostram que ela é frequentemente usada em tratamento hospitalar para pacientes que não atingem peso suficiente nas primeiras semanas de admissão. Foi relatado um aumento de peso  $4.59 \pm 3.42$  kg entre os pacientes com anorexia nervosa entre os anos de 2014 e 2016 em tratamento com OLZ, melhor resultado dentre os psicóticos utilizados, risperidona, quetiapina e placebo (HIMERISH *et al.*, 2017).

A hiperfagia associada ao uso da olanzapina é amplamente reproduzida em vários modelos animais, e existe a sugestão que esta é a causa do ganho de peso. Porém nosso estudo mostrou que o grupo tratado com OLZ não aumentou o consumo de ração. Conseguimos, desta forma, abrir uma nova vertente para o mecanismo de ganho de peso causado pela OLZ, mesmo com a redução no consumo de ração, os animais tiveram ganho de peso.

Estudos anteriores revelaram que os efeitos da olanzapina nos receptores da histamina H1, nos receptores serotonina 5-HT<sub>2C</sub>, nos receptores muscarínicos (KIRT *et al.*, 2009; WESTON-GREEN *et al.*, 2012) e na proteína quinase ativada por AMP (KIM *et al.*, 2007) poderiam ser os responsáveis pelos efeitos metabólicos adversos deste medicamento. Além disso, foi relatado que o antagonismo do receptor H1 fornece a principal contribuição para a hiperfagia induzida por olanzapina e o ganho de peso (CORRELL, 2008). Porém os receptores de dopamina e serotonina também regulam a alimentação. Um estudo um pouco mais detalhado demonstrou que os receptores mais específicos associados à reversão a anorexia são os receptores D2 e D3 (KLENOTISH *et al.*, 2015).

Um número expressivo de pesquisadores tem demonstrado interesse em estudar os efeitos dos triterpenos em distúrbios metabólicos, como, obesidade e resistência à insulina e dentre eles, o próprio ácido oleanólico (MELO *et al.*, 2010), ácido betulínico (KIM *et al.*, 2019), ácido ursólico (RAO *et al.*, 2011; NGUYEN, 2018), ácido ganodérico (ZHU *et al.*, 2018), ácido asiático (RAMESHREDDY *et al.*, 2018), acteina (CHEN; LIU, 2018), ácido glicirizico (SUN *et al.*, 2017), fração enriquecida com ácido triterpênico de *Cyclocarya paliurus* (ZHAO *et al.*, 2018), bardoxolona metilada (CAMER *et al.*, 2015) e mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (CARVALHO *et al.*, 2016) apresentaram efeitos semelhantes na redução do ganho de peso corporal, do fígado e na melhora da resistência à insulina.

O tratamento com AO conseguiu reverter o aumento de peso causado pela OLZ. Embora o mecanismo não seja bem elucidado, estudos já demonstraram que este triterpeno conseguiu reverter o ganho de peso tanto em ratos (LEE *et al.*, 2016; GAMEDE *et al.*, 2019), quanto em camundongos (MELO *et al.*, 2010; DJEZIRI *et al.*, 2018; NAKAJIMA *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, o AU foi o triterpeno que, em relação ao ganho de peso, obteve resultado menos expressivo, não gerando diferença estatística ao fim das 9 semanas de experimento. Este resultado provavelmente tem relação com a baixa afinidade dos triterpenos do grupo ursano com os receptores 5-HT, já que parte dos efeitos adversos da OLZ ocorre mediante esta via (WESTON-GREEN *et al.*, 2012).

Em relação à AMI, houve uma diminuição no peso corporal dos animais em relação ao grupo OLZ. A mistura contém triterpenos dos dois grupos, ursano e oleanano, e, talvez isto tenha gerado o resultado mediano em praticamente todos os testes realizados. Nosso grupo já tem experiência com este composto em distúrbios metabólicos. Em estudo com camundongos *Swiss*, o tratamento com  $\alpha$ ,  $\beta$ -amina resultou na redução do ganho de peso corporal induzidos por dieta hiperlipídica. Além disso, o teor de gordura visceral e área de superfície de adipócitos também sofreram diminuição (CARVALHO *et al.*, 2016).

Sabe-se que existem três regiões principais de depósitos de gordura anatômicas em humanos: o tecido adiposo branco visceral e subcutâneo, e tecido adiposo marrom subescapular. A região intra-abdominal refere-se ao tecido adiposo branco visceral (TAV), que envolve os órgãos internos, sendo localizado na região omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal e pericárdico. O tecido adiposo branco subcutâneo (TAS) está localizado no abdômen, nádegas e coxas sendo denominadas de depósito

gluteofemoral. O tecido adiposo marrom (TAM) está localizado principalmente na região subescapular, sendo responsável por dissipar energia produzindo calor (termogênese) através do desacoplamento da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial através da expressão específica da proteína desacopladora 1 (UCP1). O tecido adiposo marrom é composto por adipócitos marrons caracterizados por um elevado conteúdo mitocondrial e dotados de uma elevada capacidade de oxidação lipídica (VEGIOPOULOS, ROHM, STEPHAN, 2017; TRIM, TURNER, THOMPSON, 2018).

Com objetivo de utilizar as principais regiões de depósito de gordura nos seres humanos, foi retirado no final do experimento o tecido adiposo dos camundongos as principais regiões do tecido adiposo branco (visceral e subcutâneo) e marrom (subescapular).

A massa desse tecido adiposo marrom (TAM) se correlaciona inversamente a adiposidade, e, por meio da queima de lipídeos, combate hipotermia e obesidade (LUO; LIU, 2016). O resultado da termogênese é que uma fração elevada de nutrientes e oxigênio disponível na circulação sanguínea é requisitada pelo tecido e utilizada, levando a um aumento da produção de calor. Essa requisição se dá quando o corpo é submetido ao frio, jejum prolongado e ativação de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. (YAMAGUSHI *et al.*, 2019)

Foi possível observar que o tratamento com OLZ reduziu o depósito de TAM, representado pelo tecido adiposo subescapular. Um estudo realizado na Austrália correlacionou o envolvimento da termogênese do TAM no ganho de peso induzido pelo uso de antipsicóticos de segunda geração. Como resultado, eles perceberam que o tratamento com OLZ a longo prazo (18 a 34 dias) induziu redução na temperatura do TAM, acompanhado da diminuição nas expressões UCP-1 e PGC-1 $\alpha$  e alterações morfológicas nos adipócitos marrons. Esses resultados associados à diminuição da atividade locomotora foram considerados os principais responsáveis pelo ganho de peso dos animais (ZHANG *et al.*, 2014b).

Tanto o AO quanto o AU conseguiram reverter esta perda de gordura subescapular, retornando o peso aos níveis de normalidade. Estudos mostram que a função do TAM está diretamente relacionada com o metabolismo energético, visto que existe uma correlação positiva entre sua atividade e a taxa metabólica de repouso (LICHTENBELT *et al.*, 2009). Dessa forma, percebe-se uma relação positiva com o

controle do peso corporal em várias espécies animais, além de também melhorar a sensibilidade à insulina (BROETTO; BRITO, 2012).

Nosso estudo demonstrou um aumento no peso do fígado após tratamento com OLZ. Ren e colaboradores (2019a), a fim de testar compostos naturais em doenças hepáticas, induziram o acúmulo de gordura no fígado em ratos machos a partir do uso do antipsicótico OLZ (5 mg/kg por 8 semanas). Apenas com este tratamento os animais desenvolveram esteatose e alteração de diversos parâmetros hepáticos.

Chen e colaboradores (2018) realizaram experimentos em camundongos apoE tratados com olanzapina por 4 semanas. No tecido adiposo percebeu-se a diminuição do TAM com manutenção do peso do TAB, assim como em nossos resultados. Em relação ao fígado, houveram alterações bioquímicas e histológicas nos animais tratados com OLZ.

Em nossos resultados, ocorreu reversão da alteração do peso do fígado pelos tratamentos com AO e com AMI. Em testes com *Sprague dawley* pré-diabéticos, o AO também conseguiu diminuir tanto o peso corporal, quanto o peso do fígado desses animais (GAMEDE *et al.*, 2019). Os achados histológicos demonstraram que não houve alteração a nível celular nos fígados dos animais tratados.

Apesar da marcante característica da OLZ em causar dislipidemias (ABOSI *et al.*, 2018), os índices relacionados ao perfil lipídico não sofreram alterações durante os tratamentos propostos. Este resultado também é divergente na literatura em animais. Enquanto alguns estudos demonstram aumento nos triglicerídeos sérico em camundongos (HOU *et al.*, 2018), outros não relatam alteração nesse metabolismo (NAIMI *et al.*, 2019).

A ingestão de OLZ na dieta resultou em uma hiperglicemia e hiperinsulinemia, causando um desenvolvimento de disfunção de células  $\beta$  (fator evidenciado pelo HOMA-RI). É importante salientar que o AO melhorou o metabolismo da glicose dos animais em dieta associada à OLZ, retornando aos níveis de normalidade os índices de glicemia em jejum, insulina sérica e índice de HOMA-RI.

Um estudo realizado com 1050 pacientes na Noruega revelou que o IMC, a razão leptina/adiponectina e o índice HOMA-RI foram significativamente maiores em pacientes tratados com os medicamentos OLZ ou aripiprazol em monoterapia em relação ao controle saudável (VEDAL *et al.*, 2019).

Em relação à hiperglicemia causada pela OLZ, percebeu-se que reduções na atividade da AMPK potencializam os efeitos do tratamento agudo de OLZ na glicose no

sangue, enquanto o direcionamento específico a complexos contendo AMPK  $\beta$ 1 é suficiente para proteger contra a hiperglicemia induzida por OLZ (SHAMSHOUM *et al.*, 2019). Desta forma, nota-se que é por esta ativação que ocorre os distúrbios relacionados a resistência insulínica.

A regulação da glicemia ocorre através do balanço de produção/ingestão e gasto de glicose. A glicose pode ser captada fisiologicamente por todas as células de acordo com sua demanda metabólica. Porém, no período pós-prandial o principal hormônio responsável por aumentar a captação de glicose pelas células é a insulina. Nesse caso, há um armazenamento da glicose sob a forma de glicogênio no fígado e no músculo (GERISH, 2000). À medida que a quantidade de glicose circulante vai diminuindo, o glicogênio armazenado vai se degradando em glicose, impedimento que ocorra hipoglicemia. O hormônio responsável por esse processo inverso é o glucagon.

Em indivíduos com excesso de peso os efeitos descritos acima não ocorrem. Existe uma preferência de utilização de ácidos graxos derivados dos estoques de triacilglicerol como substrato energético (BAZOTTE, SILVA, SCHIAVON, 2014), o que seria responsável pela diminuição da mobilização de glicose via glicogênio. Isto levaria a um *feedback* negativo do glicogênio muscular e hepático sobre a atividade de glicogênio-sintetase e, conseqüentemente, no estoque de glicose. O resultado seria a intolerância à glicose e a resistência periférica à ação da insulina, com diminuição de glicogênio hepático e muscular. O quadro de diabetes se desenvolve em obesos após período de intolerância à glicose, quando a glicemia se mostra acima dos valores normais, o que conduz, na maioria dos casos, a um estado de hiperinsulinemia (PEREIRA *et al.*, 2003). Este desvio metabólico descrito ocorre nos animais tratados com OLZ neste estudo, os níveis de glicogênio hepático e muscular foram diminuídos.

Em estudo com os mesmos camundongos C57BL/6, notou que, apesar da tendência, o tratamento agudo com OLZ (5 mg/kg i.p.) não causou diminuição nos níveis de glicogênio hepático, mesmo com alteração nos níveis de glicose e insulina, tanto em machos quanto em fêmeas (MEDAK *et al.*, 2019). Provavelmente, por este mecanismo ser a partir de uma complexa cascata de sinalização e, possivelmente a exposição por mais tempo ao agente se fizesse necessária.

Tudhope e colaboradores (2012) testaram a hipótese de que a serotonina (5-HT) exerceria efeitos estimuladores e inibitórios da deposição de glicose hepática. Os agonistas dos receptores 5-HT<sub>1/2A</sub> diminuíram a glicose no sangue e aumentaram o glicogênio hepático após a carga oral de glicose. Também estimularam a síntese de

glicogênio em hepatócitos isolados com maior eficácia que o 5-HT. Esse efeito foi bloqueado pela OLZ, que diminuiu drasticamente a síntese de glicogênio após tratamento. Dessa forma, eles sugerem que a regulação hepática da síntese de glicogênio envolve a sinalização por serotonina.

Os triterpenos AO, AU e AMI conseguiram aumentar os níveis de glicogênio hepático nas doses testadas. De fato, já foi relatado o efeito terapêutico do AO em animais com alterações no glicogênio hepático, tanto causadas por dieta hiperlipídica (LIU *et al.*, 2007) quanto por diabetes induzida por estreptozotocina (PHIKELELANI *et al.*, 2011). Ao aumentar o conteúdo de glicogênio hepático, poder-se sugerido que os triterpenos bloqueiam a glicogenólise e aumentam a oxidação de ácidos graxos dos hepatócitos.

Estudos mostram que a diminuição da sensibilidade a insulina pelo tratamento com OLZ é relacionada ao aumento do IMC e aumento de peso em geral (KEINÄNEN *et al.*, 2015). Todavia, esses efeitos adversos não podem ser somente associados ao ganho de peso. O bloqueio de receptores dopaminérgicos hipotalâmicos talvez esteja envolvido neste processo, visto que se demonstrou que a bromocriptina, um agonista dopaminérgico, reduz os níveis glicêmicos em mulheres obesas não-diabéticas (KAMATH *et al.*, 1997).

De acordo com os dados obtidos até agora, notamos que o triterpeno AO apresentou melhores resultados em relação às demais substâncias testadas, sendo escolhida para dar continuidade aos experimentos relacionados às vias metabólicas.

Um estudo de proteômica em tecido adiposo de ratos revelou seis proteínas com expressão diferenciada em animais tratados com OLZ, em relação ao grupo controle. Dentre estas proteínas encontram-se a apo A-IV e a FABP4, relacionadas à resistência insulínica. Dando continuidade a este estudo, utilizamos células 3T3-L1, e os resultados sugeriram que essas duas proteínas agiram sobre a resistência insulínica induzida por OLZ através da via de sinalização IRS-1 / AKT (YANG *et al.*, 2019).

Esta via está relacionada à sinalização metabólica da insulina: IRS/PI3K/AKT. A insulina inicia sua ação pela interação com seu receptor de membrana, o receptor de insulina (IR). Quando a insulina se liga a este receptor, ocorre a fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRS). A fosforilação no receptor de tirosina gera conseqüente ativação da subunidade regulatória p85 da enzima fosfatidilinositol-3'-cinase (PI3K). Esse recrutamento, por cascata, ativa mais duas proteínas, proteína cinase dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1) e AKT. Essa cascata de sinalização

direciona à translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, principal captador de glicose pelas células musculares. O comprometimento do sinal do IRS está intimamente associado ao desenvolvimento de resistência à insulina. Geralmente, a fosforilação da serina é prejudicial para sinalização do IRS. A fosforilação da serina do IRS-1 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina e, desta forma, a fosforilação na Ser307 aumentada no IRS-1 diminui a sinalização de insulina (DIMITRIADES *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, a expressão proteica hepática do AKT fosforilado foi reduzida após o tratamento com OLZ e houve aumento na expressão do IRS fosforilado (serina 307) indicando que os distúrbios metabólicos deste antipsicótico se dão por esta via.

A alteração da via PI3K/AKT pela OLZ já foi descrita em diversos estudos. Ren e colaboradores (2019a) sugeriram que a via de sinalização IRS/PI3K/Akt medeia a atividade hepática induzida por OLZ de acordo com achados em fígados de ratos machos tratados por 8 semanas. Além disso, a OLZ também elevou os níveis de SREBP-1c, ACC, FAS e SCD-1 nesse mesmo estudo. Estudos *in vitro* com 3T3-L1 relataram significativa alteração na fosforilação do IRS-1, tanto no resíduo de tirosina 896, quanto no de serina 307, corroborando com a hipótese desta via como causa da resistência insulínica causada pela OLZ (YANG *et al.*, 2019).

Os GLUT4 são os transportadores insulina-dependente mais abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. No estado basal, ou seja, sem estímulo de insulina, boa parte do GLUT4 localiza-se intracelularmente. A presença de insulina gera uma cascata sinalizadora, determinando a movimentação do GLUT4 para a membrana plasmática, com consequente aumento de captação de glicose por esta célula (CHAO *et al.*, 2019; PETERSEN; SHULMAN, 2017). Desta forma, a quantificação do GLUT4 de membrana se torna importante para avaliar a resposta final do tecido à presença da insulina.

Como já era esperado em nossos resultados, devido à alteração que a OLZ causou na via IRS/PI3K/AKT no fígado, todo o metabolismo deste organismo sofre modificação. Nossos resultados também demonstraram que houve uma diminuição da expressão do GLUT4 de membrana no músculo, enfatizando mais uma vez a resistência insulínica que o tratamento com OLZ causa.

Adentrando à via inflamatória, um estudo relata que o NF- $\kappa$ B ativado pode induzir fosforilação da serina do IRS-1 para inibir a translocação de GLUT4 para a membrana celular adiposa e inibir a utilização de insulina. Assim, identificaram que a

inibição de NF- $\kappa$ B poderia diminuir significativamente a resistência insulínica e aliviar o efeito inibitório da OLZ na captação de glicose estimulada por insulina no adipócito. Adicionalmente, este mesmo estudo mostrou que a OLZ não induz resposta inflamatória no sistema nervoso central, embora inicie fortes reações inflamatórias de citocinas no tecido adiposo periférico para induzir a resistência insulínica (LI *et al.*, 2019).

O AO, o triterpeno com melhores resultados *in vivo*, foi escolhido para dar continuidade ao experimento de expressão proteica. Este composto conseguiu reverter as alterações nas expressões da via IRS/PI3K/AKT no fígado, demonstrando que provavelmente a ação reguladora do AO em todo o metabolismo da insulina foi a partir desta homeostase.

Este resultado também está de acordo com o descrito na literatura. O AO conseguiu atenuar a resistência à insulina do tecido adiposo em ratos pela via PI3K/AKT. A indução de resistência por frutose gerou uma diminuição na expressão da forma fosforilada do AKT e o tratamento com AO (25mg/kg v.o.) conseguiu aumentar essa expressão, além de também regular os níveis bioquímicos séricos, assim como em nosso estudo (LI *et al.*, 2014). O AO também demonstrou um efeito protetor a partir de administração oral em neonatal contra o desenvolvimento subsequente de disfunção metabólica induzida por frutose em ratos machos e fêmeas (NYAKUDYA; MUKWEVHO; ERLWANGER, 2018).

Outros triterpenos pentacíclicos também já demonstraram atividade nessa via de sinalização. O taraxerol (35 mg/kg i.p), derivado a *Abroma augusta*, conseguiu atenuar sintomas da diabetes mellitus tipo 2 em ratos através de diferentes proteínas, dentre elas, PI3K, IRS e AKT (KHANRA *et al.*, 2017).

Desta forma, conseguimos demonstrar um modelo de disfunção metabólica a partir da ingestão oral na ração de OLZ em animais C57BL/6, além de clarear alguns mecanismos pelos quais este efeito surge. O AO demonstrou ser um bom candidato para tratamento de reversão desses sintomas, conseguindo regularizar os níveis metabólicos tanto séricos quanto proteicos alterados pela OLZ. Porém, alguns pontos importantes também descritos na literatura não foram elucidados nesse modelo, como a alteração do TAB e dislipidemias pelo uso da OLZ. Estes são claramente descritos em diversos estudos. Porém em nosso modelo animal não houve alteração. Provavelmente o tempo e a dose do tratamento não geraram alterações mais profundas nos animais.

Concomitante aos experimentos *in vivo*, com a finalidade de avaliar mais profundamente o que realmente ocorre no tecido adiposo em tratamento com OLZ,

lançamos mão do modelo de cultura celular de pré-adipócitos 3T3-L1. O primeiro ponto a ser observado é a citotoxicidade dos triterpenos *in vitro* nos pré adipócitos. Inicialmente foi observado que não houve alteração da viabilidade celular em células 3T3-L1 diferenciadas pelo AO até a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , pelo AU até a concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ , e AM até a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Dessa forma, as concentrações escolhidas para os testes seguintes foram abaixo das citadas, garantido a margem de segurança quanto à toxicidade, seguindo também o que já foi relatado na literatura para AO em células 3T3-L1 (SUNG *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2018), para AU (LI *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2014) e para AMI (MELO *et al.*, 2019). A mesma margem de concentração também foi utilizada em outras linhagens celulares, como em células HUVEC (PAN *et al.*, 2018) e células RAW 264.7 (BHANDARI *et al.*, 2014).

A exposição dos pré-adipócitos 3T3-L1 aos indutores da diferenciação, soro fetal bovino, dexametasona, insulina e IBMX, levam à ativação dos eventos iniciais do processo de adipogênese nestas células. Além desses indutores, a rosiglitazona, um agonista do PPAR $\gamma$ , estimula a diferenciação adiposa de maneira dose-dependente, com um efeito máximo a 2  $\mu\text{M}$ , apenas no início da diferenciação (ZEBISCH *et al.*, 2012). A ativação via PPAR $\gamma$  nos adipócitos caracteriza o acúmulo de lipídios intracelulares, indução de genes específicos de adipócitos e parada do ciclo celular. No músculo o PPAR $\gamma$  melhora a sensibilidade à insulina, dando a função terapêutica da rosiglitazona, um antidiabético (YE *et al.*, 2001). Dessa forma, a rosiglitazona 2  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo de todos os testes celulares.

Nossos resultados demonstraram que a OLZ na concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi capaz de aumentar significativamente a adipogênese nas células 3T3-L1, evento identificado pela coloração e quantificação com *Oil Red-O*, além da quantificação bioquímica de colesterol e triglicerídeos intracelular. O co-tratamento OLZ + AO inibiu claramente a adipogênese em todas as concentrações testadas, porém a maior concentração de 25 $\mu\text{M}$  foi a que apresentou melhor resultado.

Da mesma forma o AU conseguiu inibir a adipogênese em todas as concentrações testadas, diferentemente da AMI, que apenas na concentração mais baixa (12  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou diminuição do conteúdo lipídico intracelular.

A indução da adipogênese em células 3T3-L1 pela OLZ já foi documentada por outros estudos, demonstrando a capacidade desta substância em ativar fatores indutores da formação de adipócitos nestas células (LI *et al.*, 2016, YANG *et al.*, 2019). O acúmulo de lipídeos intracelulares também foi visto em estudo com doses consideradas

terapêuticas (20  $\mu$ M) em adipócitos isolados (SARSENBAYEVA *et al.*, 2019), além da diminuição da lipólise basal (BÁBA *et al.*, 2019).

A OLZ na concentração testada não afetou a expressão de PPAR- $\gamma$ , um dos principais reguladores da adipogênese. Estudos anteriores mostram que, na maioria das vezes, nenhum efeito é encontrado na expressão dessa proteína pelo tratamento *in vitro* com OLZ (SARSENBAYEVA *et al.*, 2019; BÁBA *et al.*, 2019). Porém, Yang e colaboradores (2007) utilizaram uma concentração mais alta de OLZ, 50 $\mu$ M, causando um aumento moderado da fração PPAR- $\gamma$ 1, mas sem alteração na expressão tanto de PPAR- $\gamma$ 2, quanto de C/EBP- $\alpha$ . O AO manteve os níveis desta proteína iguais ao grupo controle e ao grupo OLZ. A rosiglitazona demonstrou grande aumento na expressão de PPAR- $\gamma$ , já por ele ser um agonista desta proteína, como descrito anteriormente.

Dando continuidade a cascata de diferenciação, seguimos para a via AMPK/SREBP. A AMPK é uma enzima sensibilizador do balanço energético celular, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP deixando essa razão sempre constante. Assim, processos que interfiram tanto na produção quanto no consumo do ATP podem causar a sua ativação. 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 AMPK, que “desliga” vias metabólicas que consomem ATP (por exemplo, as vias anabólicas de síntese de ácidos graxos e de colesterol), ao mesmo tempo que estimula vias metabólicas que produzem ATP (como as vias catabólicas de oxidação de ácidos graxos e de glicose) (LI *et al.*, 2011).

Em relação ao metabolismo de lipídeos, a AMPK, na sua forma ativada, fosforila e inativa a acetil-CoA carboxilase (ACC), favorecendo a beta oxidação de ácidos graxos para gerar energia. A AMPK fosforila e inibe a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coA redutase, enzima da via do colesterol, desta forma reduzindo a síntese de lipídeos e esteróis para poupar energia. Em adição, a AMPK fosforila e ativa enzimas que promovem a lipólise, como a lipase hormônio sensível e triacilglicerol lipase do adipócito na tentativa de degradar lipídeos e gerar energia (SHARMA *et al.*, 2018).

AMPK contém subunidades - $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$ . A subunidade AMPK- $\alpha$  contém um local de fosforilação catalítica (Thr172) em seu terminal NH<sub>2</sub> (SMITH *et al.*, 2016), que é conhecido por ativar o AMPK. Sabe-se que a ativação da AMPK pode suprimir a síntese de ácidos graxos por regulação negativa da expressão gênica lipogênica mediada

por SREBP-1c e aumentar a oxidação de ácidos graxos, estimulando o PPAR- $\alpha$  (HATTING *et al.*, 2018).

Em células 3T3-L1 o tratamento com um ativador da AMPK, o AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) inibiu a diferenciação dessas células, bloqueando a expressão de PPAR $\gamma$  e de C/EBP $\alpha$  (HABINOWSKI; WITTERS, 2001), além de inativar a SREBP-1 no momento da sua translocação (LI *et al.*, 2011).

A SREBP pertence à família de fatores de transcrição que possuem um motivo básico hélice-alça-hélice (bHLH) de ligação ao DNA. Esta família tem dois membros: SREBP-1 e SREBP-2. Existem duas isoformas do SREBP-1 (SREBP-1a e SREBP-1c), derivadas de *splicing* alternativo do primeiro éxon dentro do mesmo transcrito primário. O fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1) é homólogo à isoforma SREBP-1c de humanos. O SREBP-1c/ADD1 é predominantemente expresso em fígado, glândula adrenal, TA e músculo esquelético, enquanto o SREBP-1a, no baço. O SREBP-2 regula a biossíntese de colesterol. *In vitro*, o ADD1/SREBP-1c aumenta a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , elevando a proporção de células em processo de diferenciação.

Na diferenciação dos adipócitos, SREBP-1 é ativado e translocado para o núcleo, onde reconhece os elementos de resposta ao esteroide (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.*, 2015a).

Nossos resultados mostraram uma regulação positiva de OLZ das proteínas SREBP-1 e FAS, com redução da fosforilação de AMPK, dado consistente com boa parte da literatura (YANG *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2019b).

Como já é bem relatado, o antagonismo dos receptores da histamina H1 foi identificado como a principal causa de obesidade induzida pelos antipsicóticos. Evidências revelaram que a AMPK pode ser essencial na regulação da ingestão de alimentos envolvidos no receptor H1. Kim e colaboradores (2007) relataram que a histamina inibiu significativamente a atividade da AMPK em fatias hipotalâmicas. Por outro lado, o antagonista do receptor H1, triprolidina, estimulou a atividade da AMPK nas fatias hipotalâmicas e no hipotálamo do camundongo. Recentemente, um estudo sobre a linha de células hipotalâmicas GT1-1 também encontrou resultados semelhantes, onde o antagonista do receptor H1, a clorfeniramina, aumentou o nível de proteína de fosfo-AMPK (pAMPK:AMPK), que pode ser bloqueado por histamina

(KANG *et al.*, 2012). Desta forma, as evidências demonstram que a ativação da AMPK hipotalâmica aumenta a ingestão de alimentos e o peso corporal, enquanto inibição da AMPK hipotalâmica diminui a alimentação e o peso corporal.

Um estudo com condições semelhantes às nossas revelou que a dose de 10 $\mu$ M de OLZ aumentou os níveis de expressão de mRNA dos genes relacionados ao SREBP e melhorou os níveis de expressão de SREBP1, SREBP2 e LDLR. Simultaneamente, relatou-se também a restrição da fosforilação de p-AMPK $\alpha$  em células 3T3-L1 (LI *et al.*, 2016).

O tratamento com AO na concentração de 25  $\mu$ M aumentou a expressão de AMPK fosforilado, supondo assim, que o triterpeno atua por esta via, regulando o balanço energético, melhorando a sensibilidade à insulina e inibindo a ativação de genes envolvidos na lipogênese como o SREBP-1 e FAS.

A ação dos triterpenos nessa via adipogênica já é vastamente relatada na literatura. O nosso grupo já demonstrou que a própria  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina conseguiu significativamente suprimir a diferenciação de adipócitos, diminuindo os níveis de expressão de fatores-chave de transcrição para adipogênese, como PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ , mas não C/EBP $\beta$  ou C/EBP $\delta$ . Além disso, a expressão proteica do transportador GLUT4 nos adipócitos 3T3-L1 tratados com  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina foi significativamente maior do que em células de controle, indicando que  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina aumenta a captação de glicose. Esses achados sugerem que  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina exerce um efeito anti-adipogênico principalmente através da modulação do metabolismo lipídico e de carboidratos nas células 3T3-L1 (MELO *et al.*, 2019). Triterpenos da *Hibiscus sabdariffa* L., foram testados *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, demonstrando que as frações de  $\alpha$ -amirina e lupeol conseguiram diminuir o acúmulo lipídico em células 3T3-L1 (GIACOMAN-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

O tratamento com ácido ursólico, em estudo de indução de diferenciação de 3T3-L1, em concentrações variando de 2,5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, gerou uma adipogênese atenuada dependente da dose, acompanhada por expressão reduzida da C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e SREBP-1c. O ácido ursólico aumentou a fosforilação da acetil-CoA carboxilase (ACC) e a expressão proteica da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), mas diminuiu a expressão proteica da ácidos graxos sintase (FAS) e da proteína de ligação a ácidos graxos 4 (FABP4). Este triterpeno também aumentou a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (HE *et al.*, 2013).

Um outro estudo demonstrou que em células HCC cancerígenas, o ácido betulínico, um triterpeno com cadeia semelhante ao ácido oleanólico, inibiu fortemente o SREBP-1, suprimindo o metabolismo da glicose nestas células (YIN *et al.*, 2019).

Nossos achados também corroboram com o encontrado em células hepáticas. Nosso estudo mostrou que o AO diminuiu significativamente as atividades promotoras do elemento de resposta LXR e da SREBP-1c. Além disso, o AO estimulou a fosforilação da AMPK nas células hepáticas. Dessa forma, os resultados mostram que a ação do AO é específica do fígado e pode reprimir seletivamente a lipogênese (LIN *et al.*, 2018).

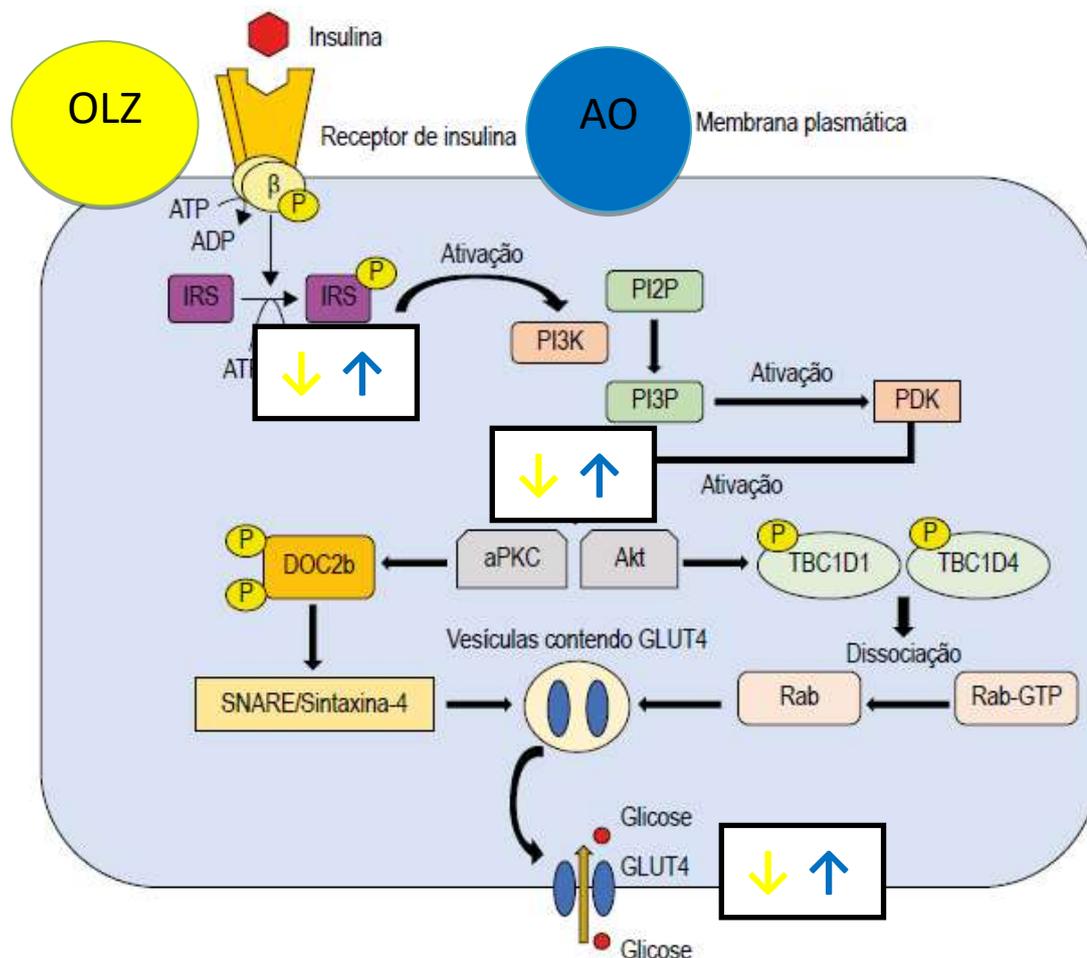
O AO também restaurou a histologia hepática em modelo com dieta hiperlipídica na dose de 25 mg/Kg, melhorando o perfil lipídico, a resistência à insulina e regulando negativamente a expressão dos genes da via lipogênica, como SREBP1, FAS e ACC1 e os genes pró-inflamatórios IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ , além de aumentar a expressão do RNAm de PPAR $\alpha$  responsável assim pelo aumento da  $\beta$ -oxidação. Com consequente redução do acúmulo de triglicerídeos e inflamação no fígado (DJEZIRI *et al.*, 2018).

Por fim, os resultados evidenciados neste estudo mostraram que o tratamento com AO preveniu o desenvolvimento dos distúrbios metabólicos em camundongos submetidos à dieta associada à OLZ durante 9 semanas. Sua atividade se dá através da melhora da resistência à insulina devido à regulação da via PI3K/AKT no fígado. Em testes *in vitro*, os adipócitos sofreram diferenciação pelo tratamento com OLZ, e o AO conseguiu reverter a adipogênese, devido à regulação positiva do pAMPK e concomitante regulação negativa do SREBP1 e FAS.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com olanzapina pode induzir ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos fêmeas de C57BL/6. O número de cruzamentos no teste de campo aberto sugere que os triterpenos do grupo oleanano podem alterar parâmetros comportamentais causados pela olanzapina. Também identificamos que os triterpenos ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina demonstraram um potencial efeito protetor metabólico na prevenção dos distúrbios causados pelo tratamento crônico com olanzapina, sendo o ácido oleanólico o candidato mais promissor. Esta proteção se deu provavelmente pela regulação positiva da via IRS-1/PI3K/AKT. Os resultados *in vitro* demonstraram que o ácido oleanólico também regula negativamente a indução da adipogênese pela olanzapina através da via AMPK/SREBP em células 3T3-L1. Desta forma, esses resultados indicaram que o ácido oleanólico poderia ser usado como um adjuvante potencial para prevenir a disfunção metabólica e obesidade causadas pelo uso da olanzapina, mas estudos futuros precisam ser feitos para indicar se o efeito antipsicótico desta droga não seria afetado com o uso coadjuvante do AO.

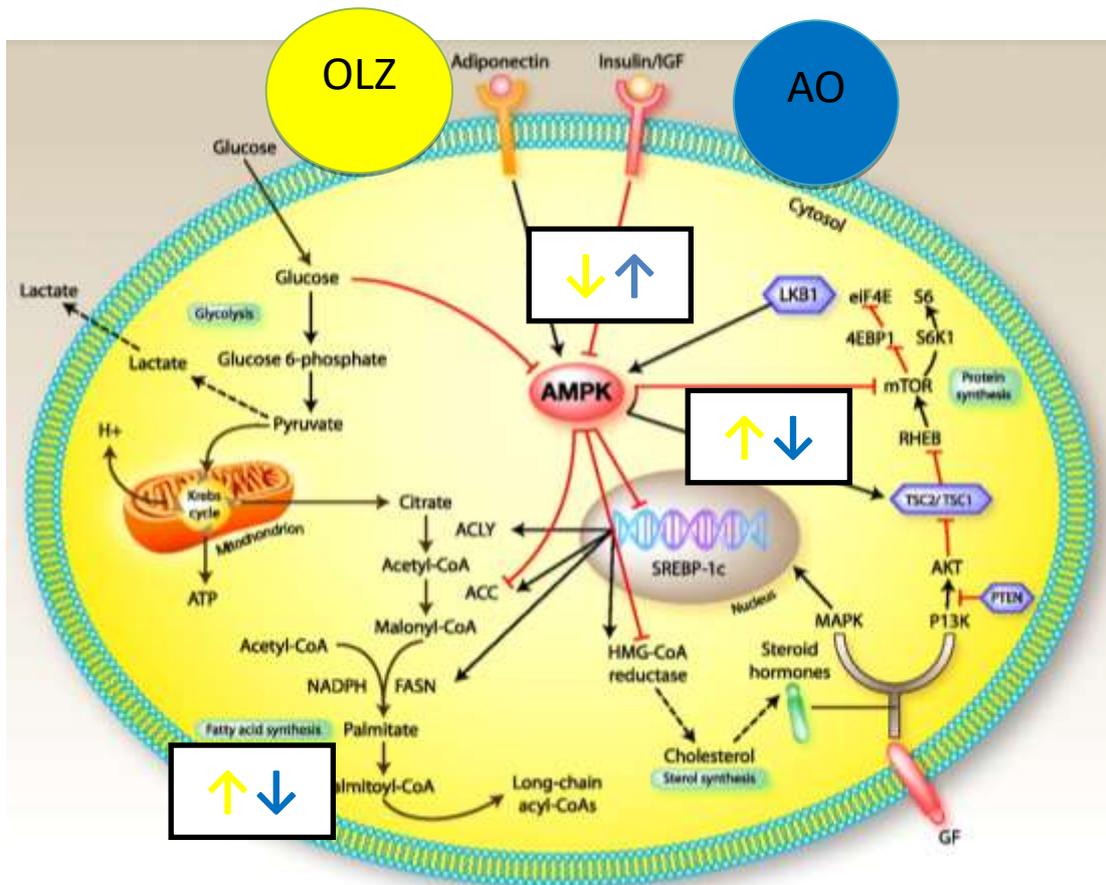
Figura 25. Esquema representativo e resumido dos mecanismos de ação do ácido oleanólico na proteção dos distúrbios metabólicos causados pela olanzapina.



Fonte: FERRARI *et al.*, 2019 adaptado.

Legenda: A olanzapina (OLZ) é responsável por aumentar a fosforilação nos resíduos de serina 307 do substrato receptor de insulina (IRS), diminuindo assim a fosforilação em tirosina 896, que é o resíduo responsável por dar seguimento à cascata de sinalização. Como consequência, há a diminuição da fosforilação de AKT, impedindo que ocorra a translocação do GLUT4 de vesícula para a membrana. O ácido oleanólico (AO) conseguiu reverter todas estas alterações.

Figura 26. Esquema representativo e resumido dos mecanismos de ação do ácido oleanólico na alteração da adipogênese causada pela olanzapina.



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

Legenda: AMPK controla as principais vias metabólicas nas células. Setas vermelhas indicam inibição. A ativação da AMPK pode inibir a lipogênese regulando a transcrição através da proteína-1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c). A olanzapina (OLZ) inibiu AMPK, com conseqüente exarcebação de SREBP e FAS. O ácido oleanólico (AO) conseguiu reverter todas estas alterações.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABOSI, O. *et al.* Cardiometabolic effects of psychotropic medications. **Horm Mol Biol Clin Investig.**, v. 36(1), 2018, doi: 10.1515.
- AGUILAR-VALLES, A. *et al.* Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 124-134, 2015.
- AHMED, N. *et al.* Avocatin B Protects Against Lipotoxicity and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obesity. **Mol Nutr Food Res**, [S.L.], v. 63, n. 24, 2019.
- ALTINIER, G. *et al.* Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **J Agric Food Chem.**, v.55, p. 1718–1723, 2007.
- ALVAREZ, J. C. *et al.* Effects of long-term antipsychotics treatment on body weight: A population-based cohort study. **J Psychopharmacol**, v. 34 (1), p. 1-7, 2019.
- ALVAREZ-LEITE, J. I.; SOARES, F. L. P.; TEIXEIRA, L. G.; "Controle Neuroendócrino da Saciedade", p. 389 -410. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica**. São Paulo: Blucher, 2016.
- ARAGÃO, G. F. *et al.* A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85(4), p. 827-34, 2006.doi: 10.1016
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARJONA, A.A., *et al.* An animal model of antipsychotic-induced weight gain. **Behav Brain Res**, v.152, p. 121–127. 2004.
- AYAD, R.; AKKAL, S. Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. **Bioactive Natural Products**, [S.L.], p. 357-414, 2019.
- BÁBA, L.I. *et al.* Effects of Cariprazine, Aripiprazole, and Olanzapine on Mouse Fibroblast Culture: Changes in Adiponectin Contents in Supernatants, Triglyceride

Accumulation, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Expression. **Medicina**, v. 55, p. 160, 2019.

BALLON, J.S. *et al.* Pathophysiology of drug induced weight and metabolic effects: findings from an RCT in healthy volunteers treated with olanzapine, iloperidone, or placebo. **J Psychopharmacol**, v. 32(5), p. 533–540, 2018.

BARTON, B. B. *et al.* Update on weight-gain caused by antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. **Expert Opin Drug Saf.** v.19(3), p. 295-314, 2020.

BAUTISTA, R.J.H. *et al.* Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and antiobesity medicinal plants. **Biomed Pharmacother**, v. 111, p. 503–516, 2019.

BAZOTTE, R. B.; SILVA, L. G.; SCHIAVON, F. P. M. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? **Cell Cycle**, v. 13, n. 16, p. 2494–2500, 2014.

BEGUM, S. *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Nat Prod Res**, v. 18, p. 135-140, 2004.

BETHESDA, M. D. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2014.

BHANDARI, P. *et al.* Oleanolic acid analogs as NO, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, p. 4114–4119, 2014.

BLAZINA, I.; SELPH, S. Diabetes drugs for nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **Syst Rev**, v. 8, n. 1, p. 2-13, 2019.

BONFANTE, I.L.P. *et al.* Novos achados relacionados ao tecido adiposo: uma revisão de literatura sobre o browning e irisina. **Arq Cienc Saude**, v.22(2), p.9-15, 2015.

BOSE, M. *et al.* The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. **J Nutr**, v. 138, p. 1677–1683, 2008.

BOUGHANEM *et al.* Transcriptional Analysis of FOXO1, C/EBP- and PPAR-2 Genes and Their association with Obesity-Related Insulin Resistance. **Genes**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 706-716, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Especial. COE-COVID19. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe situacional sobre os programas de alimentação e nutrição e de promoção da saúde na atenção básica**. Secretaria de Atenção Básica à Saúde. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da saúde. **Pesquisa Vigitel Brasil 2020: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2020.

BROETTO, F. N.; BRITO, M. N. Tecido Adiposo Marrom e Obesidade em Humanos. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, p. 121-135, 2012.

BU, S. *et al.* Bilobalide Suppresses Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes via the AMPK Signaling Pathway. **Molecule**, v. 24, p. 3503, 2019.

CAMER, D. *et al.* Bardoxolone methyl prevents insulin resistance and the development of hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. **Mol Cell Endocrinol**, v. 412, p. 36–43, 2015.

CARROLL, N.V.; LONGLEY, R.W.; ROE, J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem**, [S.I.], v. 220, n. 2, p.583-593, 1956.

CARVALHO, K. *et al.* Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal and Inflammatory Responses. **Planta Medica**, v. 83, n. 03/04, p. 285–291, 2016.

CARVALHO, K. M. *et al.* The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-13, 2015.

CHAO, H.W. *et al.* Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Internat J Mol Scienc**, v. 20, n. 2, p. 298, 2019.

CHEN, H.; LIU, J. Actein ameliorates hepatic steatosis and fibrosis in high fat diet induced NAFLD by regulation of insulin and leptin resistant. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 1386–1396, 2018.

CHEN, M. *et al.* Feasibility of olanzapine at reduced dose in highly emetogenic chemotherapy: a randomised controlled trial against a pre-pitant in triple therapy (foresight). **J Clinic Oncol**, [S.L.], v. 38, n. 15, p. 12087-12087, 2020.

CHEN, Q. *et al.* Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Anal Bio anal Chem**, v. 399, p. 2877–2884, 2011.

CHEN, S. *et al.* Hypolipidemic effect of oleanolic acid is mediated by the miR-98-5p/PGC-1 $\beta$  axis in high-fat diet–induced hyperlipidemic mice. **FASEBJ**. v. 31, p. 1085–1096, 2017.

CINTI, S. Pink Adipocytes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 29, n. 9, p. 651-666, 2018.

CITROME L. Interpreting and applying the EUFEST results using number needed to treat: antipsychotic effectiveness in first-episode schizophrenia. **Int J Clin Pract**, v. 62(5), p. 837–840, 2008.

CITROME, L. *et al.* A commentary on the efficacy of olanzapine for the treatment of schizophrenia: the past, present, and future. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 15, p. 2559–2569, 2019.

COHEN, P. *et al.* Ablation of PRDM16 and Beige Adipose Causes Metabolic Dysfunction and a Subcutaneous to Visceral Fat Switch. **A cell**, v.156 (1-2), p. 304-316, 2014.

COLLA, A.R.S. *et al.* Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 108–116, 2015.

CORREIA, P.A. *et al.* Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. **E Life**, 2017. DOI: 10.7554.

CORRELL, C.U. Monitoring and management of antipsychotic-related metabolic and endocrine adverse events in pediatric patients. **Int Ver Psychiatry**, v. 20, p. 195-201, 2008.

CÔTÉ, J.A. *et al.* Focus on dedifferentiated adipocytes: characteristics, mechanisms, and possible applications. **CellTissue Res**, [S.L.], v. 378, n. 3, p. 385-398, 2019.

COUTINHO, W. **Etiologia da obesidade: revisão**. São Paulo: ABESO. Available from: <http://www.abeso.org.br/pdf/Etiologia%20e%20Fisiopatologia%20-%20Walmir%20coutinho.pdf>. 2011.

CREWE, C. *et al.* SREBP-regulated adipocyte lipogenesis is dependent on substrate availability and redox modulation of mTORC1. **CI Insight**, v. 4(15): e129397, 2019.

CUI, D. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor mediates metabolic dysfunction induced by atypical antipsychotic therapy. **J Clin Invest**, v. 128(11), p. 4997-5007. 2018.

DENG, C. *et al.* Reducing olanzapine-induced weight gain side effect by using betahistine: a study in the rat model. **J. Psychopharmacol.**, v. 26, p. 1271-1279, 2012.

DIETZ, W.; BURGOA, C.S. Obesity and its Implications for COVID-19 Mortality. **Obesity**. v.28(6), 2020.

DIMITRIADES, G. *et al.* Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 1, p. 52-59, 2011.

DJEZIRI, F.Z. *et al.* Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. **Biochimie**, v. 152, p. 110-120, 2018.

- DOMECQ, J.P. *et al.* Clinical review: Drugs commonly associated with weight change: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100(2), p. 363-70, 2015.
- ELI LILLY Canada INC. Product Monograph. **Zyprexa®**. Ontario. 2018. Disponível em: <<https://www.drugs.com/monograph/zyprexa.html>>. Acesso em: outubro de 2019.
- FAI, Y. M.; TAO, C. C. A review of presence of oleanolic acid in natural products. **Nig J Nat Prod Med**, v. 2, p. 277–290, 2009.
- FAJEMIROYE, J.O. *et al.* Oleanolic acid acrylatee licits antidepressant -like effect mediated by 5-HT1A receptor. **Nature: Sci Rep**, v. 5, p. 11582, 2015.
- FARIAS, M.S. *et al.* Uso de psicotrópicos no Brasil: uma revisão da literatura. **J Biolog Pharm AgricultManag**, v. 12, n. 04, 2016.
- FERRARI, F. *et al.* Mecanismos Bioquímicos e Moleculares da Captação da Glicose Estimulada pelo Exercício Físico no Estado de Resistência à Insulina: Papel da Inflamação. **Arq Bras Cardiol**, v. 113(6), p. 1139-1148, 2019.
- FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 125(1-2), p. 151-7, 2001.
- FINGERET, M. *et al.* Incidence of type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia in metabolically healthy obese and non-obese. **Nutr. Metab. Cardiovasc**, v. 28 (10), p. 1036–1044, 2018.
- FONSECA-ALANIZ, M.H. *et al.* O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **J. Pediatr**, v. 1.83, n.5, 2007.
- FRANK, E. *et al.* Three-year outcomes for maintenance therapies in recurrent depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 47(12), p. 1093-9, 1990.
- FREDERICO, W.A. *et al.* Efeitos extrapiramidais como consequência de tratamento com neurolépticos. **Aleinstein**, v. 6(1), p. 51-5, 2008.
- FUJIWARA, F. *et al.* Triterpenoids Isolated from *Zizyphus jujuba* Inhibit Foam Cell Formation in Macrophages. **J Agric Food Chem**, v.59, p. 4544-52, 2011.

GADDE, K.M. *et al.* Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am CollCardiol*, v. 71, p. 69-84, 2018.

GAMEDE, M. *et al.* Plant-derived oleanolic acid ameliorates markers associated with non-alcoholic fatty liver disease in a diet-induced pre-diabetes rat model. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 1(12), p. 1953-1962, 2019.

GARGIULO, P. *et al.* The metabolic syndrome in heart failure: insights to specific mechanisms. **Heart Fail Rev**, 2019. DOI. s10741-019-09838-6.

GEBHARDT, S. *et al.* Antipsychotic-induced body weight gain: Predictors and a systematic categorization of the long-term weight course. **J Psychiatric Res**, v. 43, p. 620–626, 2009.

GERISH, J. E. Physiology of glucose homeostasis. **Diabetes Obes Metab**, v.2(6), p. 345-50, 2000.

GHABEN, A.L.; SCHERER, P.E. Adipogenesis and metabolic health. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, p. 242–258, 2019.

GIACOMAN-MARTÍNEZ, A. *et al.* Triterpenoids from *Hibiscus sabdariffa* L. with PPAR $\delta/\gamma$  Dual Agonist Action: In Vivo, In Vitro and In Silico Studies. **Planta Medica**, v. 85(5), p. 412-423, 2019.

GONG, P.*et al.* Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. **Gynecolog Endocrinol**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 709-714, 2018.

GRABOVSKAYA, S.V.; SALYHA, Y.T. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? **Neurophysiol**, v. 46, p. 4, 2014.

GRAJALES, D.; FERREIRA, V.; VALVERDE, A.M. Second-Generation Antipsychotics and Dysregulation of Glucose Metabolism: beyond weight gain. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1336-1342, 2019.

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

GROSS, B. *et al.* PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Rev Endocrinol**, Lille, v. 13, p. 36-49, 2017.

GUINDA, A. *et al.* Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 9685–9691, 2010.

HABINOWSKI, S.A.; WITTERS, L.A. The Effects of AICAR on Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells. **Bioc Biophys Res Comunicat**, v. 286, p. 852– 856, 2001.

HABTEMARIAM, S. Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing Brain Injury, Cerebral Ischemia, Cognition Deficit, Anxiety, and Depression. **Oxid Med Cell Longev**, 2019. DOI: 10.1155

HAN, M. *et al.* Short- and long-term effects of antipsychotic drug treatment on weight gain and H1 receptor expression. **Psychoneuroendocrinol**, v. 33, p. 569-580, 2008.

HARREITER, J.; RODEN, M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019). **Wien KlinWochenschr**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 6-15, 12, 2019.

HATTING, M. *et al.* Insulin regulation of gluconeogenesis. **Annals New York Academ Scienc**, [S.L.], v. 1411, n. 1, p. 21-35, 2018.

HE, Y. L. Y. *et al.* Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway. **Plos One**, v.8, p. 1–12, 2013.

HIMMERICH, H. *et al.* Psychopharmacological options for adult patients with anorexia nervosa: the patients' and carers' perspectives. **CNS Spectr** 2017.

HIRSCH, I. B.; GAUDIANI, L. M. Using Insulin to Treat Poorly Controlled Type 2 Diabetes in 2020. **JAMA**, v. 16; 323(23), p. 2419-2420. 2020.

HOLANDA-PINTO, S. A. *et al.* Antinoceptive effect of triterpenoid a,b-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalina and capsaicin. **Phytomed.**, v. 15, p. 630-634, 2008.

- HOLLIFIELD, M. *et al.* Potential effectiveness and safety of olanzapine in refractory panic disorder. **Depress Anxiety**, v. 21(1), p. 33-40, 2005.
- HOU, P.H. *et al.* Long-term administration of olanzapine induces adiposity and increases hepatic fatty acid desaturation protein in female C57BL/6J mice. **Iran J Basic MedSci**, v. 21, n. 5, 2018.
- HWANG, I.; KIM, J.B. Two Faces of White Adipose Tissue with Heterogeneous Adipogenic Progenitors. **Diabetes Metab J**, v.43, p.752-762, 2019.
- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, Germany, v.52, p. 26-42, 2008.
- IMAI, A. *et al.* Visceral abdominal fat accumulation predicts the progression of non calcified coronary plaque. **Atherosclerosis**, v. 222, p. 524-9, 2012.
- JAFARI, S. *et al.* In Vivo Pharmacological Evaluations of Novel Olanzapine Analogues in Rats: A Potential New Avenue for the Treatment of Schizophrenia. **PlosOne**, v. 8. 12, e80979, 2013.
- JÄGER, S. *et al.* Pentacyclitriterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, p. 2016–2031, 2009.
- JEONG, D.W. *et al.* Dose-Linear Pharmacokinetics of Oleanolic Acid after Intravenous and Oral Administration in Rats. **Biopharm Drug Dispos**, v. 28, p. 51–57, 2007.
- JIANG, Q. *et al.* Modulation of oxidized-LDL receptor-1 (LOX1) contributes to the antiatherosclerosis effect of oleanolic acid. **Int J Biochem**, v. 69, p. 142–152, 2015.
- KAHN R.S. *et al.* Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. **Lancet**, v. 371 (9618), p. 1085–1097, 2008.
- KAHN, C.R. *et al.* Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v.129(10), p.3990-4000, 2019.
- KAMATH, V. *et al.* Effects of a quick-release form of bromocriptine (Ergoset) on fasting and postprandial plasma glucose, insulin, lipid, and lipoprotein concentrations in

obese nondiabetic hyperinsulinemic women. **Diabetes Care**, v. 20(11), p. 1697-701, 1997.

KANDROR K. V.; PILCH P. F. The sugar is sIRVed: sorting Glut4 and its fellow travelers. **Traffic** v. 12, p. 665-671, 2011.

KANG, B. W. *et al.* Phosphorylated AMP-activated protein kinase expression associated with prognosis for patients with gastric cancer treated with cisplatin-based adjuvant chemotherapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 70, p. 735–741, 2012.

KANG, S.Y. *et al.* The anti-arthritic effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. **J Pharm Pharmacol**, England, v.60, p. 1347-54, 2008.

KARAKURT, M. *et al.* From the Obesity Tsunami to the Diabetes Avalanche: Primordial Prevention of the Diabesity-Related Cardiovascular Epidemic by Diabeto-Cardiologists. **Angiology**, p. 70(4), v. 371-373, 2019.

KASTURI, R.; JOSHI, V. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **J Biol Chem**, v. 257, p. 12224 - 12230, 1982.

KEINÄNEN, J. *et al.* Early insulin resistance predicts weight gain and waist circumference increase in first-episode psychosis--A one year follow-up study. **Schizophr Res**, v. 169(1-3), p. 458-463, 2015.

KHANRA, R. *et al.* Taraxerol, a pentacyclic triterpenoid, from *Abroma augusta* leaf attenuates diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 726–741, 2017.

KIM, K.D. *et al.* Betulinic acid inhibits high-fat diet-induced obesity and improves energy balance by activating AMPK. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 29(4), p. 409-420, 2019.

KIM, S.F. *et al.* From the Cover: Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 3456-3459, 2007.

KIM, Y.K.; NA, K.S. Neuroprotection in Schizophrenia and Its Therapeutic Implications. **Psychiatry Investig**, v. 14(4), p. 383-391, 2017.

KINJO, J. *et al.* Hepatoprotective and hepatotoxic actions of oleanolic acid-type triterpenoidal glucuronides on rat primary hepatocyte cultures. **Chem. Pharm. Bull.** v. 47, p. 290–292, 1999.

KLEINER, D. E. *et al.* Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatol.** v. 41, n° 6, p. 1313-1321, 2005.

KROGMANN, A. *et al.* Keeping up with the therapeutic advances in schizophrenia: a review of novel and emerging pharmacological entities. **CME Supplement**, v. 24, S1, p. 38-69, 2019.

KUŹBICKA K; RACHOŃ D. Bad eating habits as the main cause of obesity among children. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab**, v. 19(3), p. 106-10, 2013.

LACERDA, C. A.; SANTOS, C. F.; AGUILA, M. B. Image analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA (Editors), **Histology protocols: methods in molecular biology**. New Jersey: Humana Press; 2010. p 211-225.

LEE, E.S. *et al.* Oleanolic acid and N -acetylcysteine ameliorate diabetic nephropathy through reduction of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in a type 2 diabetic rat model. **Nephrol Dial Transplant**, v. 31, p. 391–400, 2016.

LEE, J.E. *et al.* Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 39, n. 11, p. 1-20, 2019.

LEE, W.S. *et al.* Human ACAT-1 and ACAT-2 Inhibitory Activities of Pentacyclic Triterpenes from the Leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. **Biol Pharm Bull**, v.29 (2) p. 382-384, 2006.

LEUCHT S. *et al.* Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple treatments meta-analysis. **Lancet**, v. 382(9896), p. 951–962, 2013.

- LI, H. *et al.* Chronic olanzapine administration causes metabolic syndrome through inflammatory cytokines in rodent models of insulin resistance. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1582, 2019.
- LI, Y. *et al.* AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. **Cell Metab**, v. 13(4), p. 376–388, 2011.
- LI, Y. *et al.* Berberine Alleviates Olanzapine-Induced Adipogenesis via the AMPK $\alpha$ -SREBP Pathway in 3T3-L1 Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, p. 1865, 2016.
- LI, Y. *et al.* Oleanolic acid supplement attenuates liquid fructose-induced adipose tissue insulin resistance through the insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 277, p. 155–163, 2014.
- LI, Y. *et al.* Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 11, p. 1609-1617, 2012.
- LICHTENBELT, W. D. M. *et al.* Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1500-1508, 2009.
- LIGTHER, J. *et al.* Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. **Clin Infect Dis**, v.28, 71(15), p.896-897, 2020.
- LIMA-JUNIOR, R.C. *et al.* Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta amyryn, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.**, v. 72, n.1, p. 34-39, 2006.
- LIN, J. *et al.* Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. **Obes. Res**, v. 13, p. 982–990, 2005.
- LIN, Y.N.; *et al.* Oleanolic Acid Inhibits Liver X Receptor Alpha and Pregnane X Receptor to Attenuate Ligand-Induced Lipogenesis. **J Agric Food Chem**, v. 24:66(42), p. 10964-10976, 2018.
- LIU, J. *et al.* Oleanolic acid alters bile acid metabolism and produces cholestatic liver injury in mice. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 1; p. 272(3), 2013.

- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LIU, Y.; TIE, L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway. **Bmc Cardiovasc Disord**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.
- LOCKE, A.E. *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 12, p. 197–206, 2015.
- LOPEZ-GARCIA, S. *et al.* Macrophage Activation by Ursolic and Oleanolic Acids during Mycobacterial Infection. **Molecules**, v. 6;20(8), p. 14348-64, 2015.
- LORD, C.C. *et al.* The atypical antipsychotic olanzapine causes weight gain by targeting serotonin receptor 2C. **J Clinic Investigat**, v. 127, p. 3402-3406, 2017.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biological Chemistry**, v.193, p. 265-75, 1951.
- LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **J Endocrinol**, v. 231, n. 3, p. 77 – 99, 2016.
- MA, C. *et al.* Pronuciferine and nuciferine inhibit lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by activating the AMPK signaling pathway. **Life Sci**, v. 136, p. 120–125, 2015.
- MABANDLA, M. V.; NYOKA, M.; DANIELS, W. M. U. Early use of oleanolic acid provides protection against 6-hydroxydopamine induced dopamine neurodegeneration. **Brain Res**, v. 5, p. 1622:64-71, 2015.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. **Pharmacol, Biochem Beh**, v. 103, p. 204–211, 2012.
- MAEDA, N. *et al.* Adiponectin, a unique adipocyte-derived factor beyond hormones. **Atherosclerosis**; v.292, p.1-9, 2020.
- MAIA, R. M.*et al.* Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): characterization in binary mixtures. **Quím. Nova** [online], v.23, n.5, p.623- 626, 2000.

- MARCELIN, G. *et al.* Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. **J Clin Invest**, v. 129(10): p.4032-4040, 2019.
- MARS, B. *et al.* Influences on antidepressant prescribing trends in the UK: 1995-2011. **Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol**, v. 52(2), p. 193-200, 2017.
- MATTHEWS, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28(7), p. 412-9, 1985.
- MEDAK, K.D. *et al.* Female mice are protected against acute olanzapine-induced hyperglycemia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 110, p. 104413, 2019.
- MEDEIROS, F.L. *et al.* Síndrome neuroléptica maligna de paciente em uso de olanzapina. **J Bras Psiquiatr**, v. 57(2), p. 145-147, 2008.
- MEHTA, U.J. *et al.* Maternal Obesity, Psychological Factors, and Breastfeeding Initiation. **Breastfeed Med**, v. 6(6), p. 369–376, 2011.
- MELO, C. L. *et al.* Betulinic acid, a natural pentacyclotriterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. **J Agric Food Chem**, v. 57 (19), p. 8776-81, 2009.
- MELO, C.L. *et al.* Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chem Biol Int**, v. 185, n.1, p. 59-65, 2010.
- MELO, K. M. *et al.*  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells. **Biom Pharmacother**, v. 109, p. 1860–1866, 2019.
- MEYER, J.M.; KORO, C.E. The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review. **Schizophrenia Res**, v. 70, p. 1– 17, 2004.
- MILAGRES, L.C. *et al.* Relação cintura/estatura e índice de conicidade estão associados a fatores de risco cardiometabólico em idosos. **Ciênc. Saúde coletiva**, v.24 no.4, 2019.

MIRZA, A.Z.; ALTHAGAFI, I.I.; SHAMSHAD, H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications. **Eur J Med Chem**, [S.L.], v. 166, p. 502-513, 2019.

MOREIRA, F.L. *et al.* A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryns by employing rat liver microsomes. **J Pharmaceut Biom Analys**, v.84, p.14-19, 2013.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65(1-2), p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, P.K. **Chapter 7 - Bioactive Phytochemicals and Their Analysis. Evaluating Natural Products and Traditional Medicine.** Pages 237-328. 2019.

NA, H.N.; NAM, J.H. Adenovirus 36 as an obesity agent maintains the obesity state by increasing MCP-1 and inducing inflammation. **Journ Infect Dis**, v. 205, p.914–922, 2012.

NAIMI, M.S. *et al.* Berberine attenuates olanzapine induced-metabolic syndrome. **J Pak Med Assoc**, v. 8, p. S88-S92, 2019.

NAKAJIMA K. *et al.* Decreased Plasma Octanoylated Ghrelin Levels in Mice by Oleanolic Acid[J]. **J Oleo Scienc**, v. 68(1), p. 103-109, 2019.

NAVARRETE, J. M. N.; REAL, J.M.F. The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. **Rev Endoc Metabol Disord**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 387-397, 2019.

NGUYEN, H.N. *et al.* Dietary 23-hydroxy ursolic acid protects against atherosclerosis and obesity by preventing dyslipidemia-induced monocyte priming and dysfunction. **Atherosclerosis**, v. 275, p. 333-341, 2018.

NOH, J.R. *et al.* Scoparone inhibits adipocyte differentiation through down-regulation of peroxisome proliferators-activated receptor c in 3T3-L1 preadipocytes. **Food Chemi**, v. 141, p. 723–730, 2013.

NYAKUDYA, T.T.; MUKWEVHO, E.; ERLWANGER, K.H. The protective effect of neonatal oral administration of oleanolic acid against the subsequent development of fructose-induced metabolic dysfunction in male and female rats. **Nutr Metab (Lond)**, v. 20, p. 15:82, 2018.

OKASAKI; YAMAMURO; KISHIMOTO. Reversal of olanzapine-induced weight gain in a patient with schizophrenia by switching to asenapine: a case report. **Neuropsych Dis Treat**, v. 13, p. 2837–2840, 2017.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Obesity and overweight**. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em 10 de outubro de 2019. Fev, 2018.

ONO, M. *et al.* Triterpenoids from the fruits and leaves of the blackberry (*Rubus allegheniensis*) and their inhibitory activities on foam cell formation in human monocyte-derived macrophage. **Nat Prod Res**, v. 28(24), p. 2347-50, 2014.

OUCHI, N., WALSH, K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. **Clin. Chim. Acta**v. 380, p. 24-30, 2007.

PAN, Y. *et al.* Oleanolic acid protects against pathogenesis of atherosclerosis, possibly via FXR-mediated angiotensin (Ang)-(1–7) upregulation. **Biom Pharmacot**, v. 97, p. 1694–1700, 2018.

PARK, J. *et al.* Human farnesylpyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. **Nat. Commun**, v. 8, p. 14132, 2017.

PARK, S. J. Oleanolic acid attenuates MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice. **Neuropharmacol**, v, 86, p. 49-56, 2014.

PARK, T. H. *et al.* Brown Adipocyte and Splenocyte Co-Culture Maintains Regulatory T Cell Subset in Intermittent Hypobaric Conditions. **Tissue Eng Regen Med**, v.16, p.539–548, 2019.

PEDRERO, L.A.; RASTROLLO, M.B.; MARTI, A. Effects of antidepressant and antipsychotic use on weight gain: A systematic review. **Obesity Rev**, p. 1-11, 2019.

PEREIRA, L.O. *et al.* Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, n.2, 2003.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 7, p. 649–665, 2017.

PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 572-587, 2017.

POJSKIC, H., ESLAMI, B. Relationship Between Obesity, Physical Activity, and Cardiorespiratory Fitness Levels in Children and Adolescents in Bosnia and Herzegovina: An Analysis of Gender Differences. **Front Physiol** v. 9, p. 1734, 2018.

POLYSOS, S.A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C.S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. **Met Clin Experim**, v. 92, p. 82–97, 2019.

POYUROVSKY, M. *et al.* Reducing antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia: a double-blind placebo-controlled study of reboxetine-betahistine combination. **Psychopharmacolo** (Berl), v. 226, p. 615-622, 2013.

QUEIROZ, J.C.F. *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras End Metabol**, v. 53, p. 582 - 594, 2009.

RAMESHREDDY, P. *et al.* Obesity-alleviating potential of asiatic acid and its effects on ACC1, UCP2, and CPT1 mRNA expression in high fat diet-induced obese Sprague–Dawley rats. **Mol Cell Biochem**, v. 442, n. 1–2, p. 143–154, 2018.

RAO, V.S. *et al.* Ursolic Acid, A Pentacyclic Triterpene from *Sambucus australis*, Prevents Abdominal Adiposity in Mice Fed a High-Fat Diet. **J Medical Food**, v. 14, p. 1375-1382, 2011.

REN, L. *et al.* Chronic treatment with the modified Longdan Xiegan Tang attenuates olanzapine-induced fatty liver in rats by regulating hepatic de novo lipogenesis and fatty

acid beta-oxidation-associated gene expression mediated by SREBP-1c, PPAR-alpha and AMPK-alpha. **J Ethnopharmacol**, v. 232, p. 176-187, 2019a.

REN, L. *et al.* The IRS/PI3K/Akt signaling pathway mediates olanzapine-induced hepatic insulin resistance in male rats. **Life Sciences**, v. 217, p. 229–236, 2019b.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J physiol endocrinol metab**, v. 309, p. 691-714, 2015a.

RODRIGUEZ, R. R. *et al.* Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. **Cur Med Chem**, v. 22(11), p. 1414-1425, 2015b.

ROGOZ, Z.; SKUZA, G. Anxiolytic-like effects of olanzapine, risperidone and fluoxetine in the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacol Reports**, v. 63, p. 1547-1552, 2011.

ROSEN, E.D. *et al.* Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes dev**, 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.

ROTONDO, F. *et al.* Glycerol is synthesized and secreted by adipocytes to dispose of excess glucose, via glycerogenesis and increased acyl-glycerol turnover. **Sci. Rep**, v. 7 (1), p. 8983, 2017.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Cur Hypert Rep**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 2-8, 2018.

SALVI, V. *et al.* H1-histamine receptor affinity predicts weight gain with antidepressants. **Eur Neuropsycharmacol**, v. 26, p. 1673–1677, 2016.

SANTOS, F. *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids Health Dis**, v. 11, n. 1, p.1-8, 2012.

SARGSYAN, A.; HERMAN, M.A. Regulation of Glucose Production in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **CurDiab Rep**, v. 19, p. 77, 2019.

SARIN, L.M.; PORTO, J. Antipsicóticos atípicos na depressão refratária. **J. bras. psiquiatr**, v. 58, n.2, 2009.

SARSENBAYEVA, A. *et al.* Effects of second-generation antipsychotics on human subcutaneous adipose tissue metabolism. **Psychoneuroendocrinol**, v. 110, p. 104445, 2019.

SATO, H. *et al.* Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 362, p. 793–798, 2007.

SCWARTZ, M.W. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661–671, 2000.

SELVIN, E. *et al.*: Trends in prevalence and control of diabetes in the United States, 1988–1994 and 1999–2010. **Ann Int Med**, v. 160, p. 517–525, 2014.

SEPEDE, G. *et al.* Olanzapine augmentation in treatment-resistant panic disorder: a 12-week, fixed-dose, open-label trial. **J Clin Psychopharmacol**, v. 26(1), p. 45-9, 2006.

SHAMSHAUM, H. *et al.* AMPK  $\beta$ 1 activation suppresses antipsychotic-induced hyperglycemia in mice. **FASEB J**, v. 33 (12), p. 14010-14021, 2019.

SHARMA, A. X. *et al.* Glucagon Receptor Antagonism Improves Glucose Metabolism and Cardiac Function by Promoting AMP-Mediated Protein Kinase in Diabetic Mice. **Cell Reports**, v. 22, p. 1760–1773, 2018.

SHELTON, R.C.; PAPAKOSTAS, G.I. Augmentation of antidepressants with atypical antipsychotics for treatment-resistant major depressive disorder. **Acta Psychiatr Scand**, v. 117, p. 253–259, 2008.

SHENG, H.; SUNG, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Nat Prod Rep**, v. 3, 2011, doi.org/10.1039/C0NP00059K.

SIANI, A. C. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J Ethnopharmacol**, v. 66, n. 1, p.57-69, 1999.

SMITH, B. K., *et al.* Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Role of AMPK. **Am. J. Physiology-Endocrinology Metab.** v. 311, p.730–740, 2016.

STEINBERG, G. R.; CARLING, D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. **Nat Rev Drug Disc**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 527-551, 2019.

SU, S. *et al.* Oleanolic acid attenuates PCBs-induced adiposity and insulin resistance via HNF1b-mediated regulation of redox and PPAR $\gamma$  signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 124, p. 122-134, 2018.

SULSTON, R. J.; CAWTHORN, W. P. Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone? **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 28, n. 1, p. 21– 38, 2016.

SUMIDA, Y. *et al.* Current and new pharmacotherapy options for non-alcoholic steatohepatitis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 21(8), p. 953-967, 2020.

SUN, L. *et al.* A Phase I Open-Label Study to Evaluate the Effects of Rifampin on the Pharmacokinetics of Olanzapine and Samidorphan Administered in Combination in Healthy Human Subjects. **Clin Drug Investig**, v. 39(5), p. 477-484, 2019.

SUN, X. *et al.* Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Eur J Pharm**, v. 806, p. 75– 82, 2017.

SUNG, H. *et al.* Role of (–)-epigallocatechin-3-gallate in cell viability, lipogenesis, and retinol-binding protein 4 expression in adipocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 382, p. 303 – 310, 2010.

TALER, M. *et al.* Attenuated Weight Gain with the Novel Analog of Olanzapine Linked to Sarcosinyl Moiety (PGW5) Compared to Olanzapine. **J Mol Neurosci**, v. 58, p. 66–73, 2016.

TRIM, W.; TURNER, J. E.; THOMPSON, D. Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. **Front Immunol**, v. 9, p. 9, 2018.

TRITES, M. J.; CLUGSTON, R. D. The role of adipose triglyceride lipase in lipid and glucose homeostasis: lessons from transgenic mice. **Lipid Health Dis**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 2-9, 2019.

TUDHOPE, S.J.*et al.* A Novel Mechanism for Regulating Hepatic Glycogen Synthesis Involving Serotonin and Cyclin-Dependent Kinase-5. **Diabetes**, v. 61, 2012.

URBAN, A. E.; CUBALA, W. J. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics. **Psychiatr Pol**, v. 30, p. 1059-1077, 2017.

VASCONCELOS, M.A.L. *et al.* Analgesic effects os crude extrats of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v.142, p. 333-335, 2003.

VECCHIÉ, A. *et al.* Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **Eur J Int Med**, v.48, p. 6–17, 2018.

VEDAL, T.S.J. *et al.* Adipokine levels are associated with insulin resistance in antipsychotics users independently of BMI. **Psychoneuroendocrinol**, v. 103, p. 87–95. 2019.

VEGIOPOULOS, A.; ROHM, M.; HERZIG, S. Adipose tissue: between the extremes. **EMBO J**, v. 36, n. 14, p. 1999–2017, 2017.

VELLOSO, L. A.; ARAÚJO, E. P. "Regulação Central do Balanço Energético", p. 63-67. In: **Tratado de Obesidade**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Quím Nova**, v. 28, n. 2, p.183-187, 2005.

WAGNER, K.J.P. *et al.* Socioeconomic status in childhood and obesity in adults: a population-based study. **Rev Saude Publica**, v. 52, p. 15, 2018.

WANG, G. Body Mass Dynamics Is Determined by the Metabolic Ohm's Law and Adipocyte-Autonomous Fat Mass Homeostasis. **iScience**, v. 23, 2020.

WANG, X. *et al.* Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. **Mol. Cell. Endocrinol**, v. 376, p. 70–80, 2013.

WATANABE, T. *et al.* Suppression of murine preadipocyte differentiation and reduction of visceral fat accumulation by a *Petasites japonicus* ethanol extract in mice fed a high-fat diet. **Biosc Biotech Biochem**, v.74, p. 499 - 503, 2010.

WEISSTAUB, N.V. *et al.* Cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. **Science**, v. 28, p. 536-40, 2006.

WESTON-GREEN, K. *et al.* Effects of olanzapine on muscarinic M<sub>3</sub> receptor binding density in the brain relates to weight gain, plasma insulin and metabolic hormone levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22, p. 364-373, 2012.

WESTON-GREEN, K.; HUANGXF.; DENG, C. Olanzapine treatment and metabolic dysfunction: a dose response study in female Sprague Dawley rats. **Behavioural Brain Research**, v. 217, p. 337–346, 2011.

WILLIAMS, I. H.; POLAKIS, S.E. Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. The effect of indomethacin, prostaglandin E<sub>1</sub> and cyclic AMP on the process of differentiation. **Bioch Biophys Res Commun**, v. 77, p. 175–18, 1977.

YAMAGUSHI, S. *et al.* Adipose tissue NAD<sup>+</sup> biosynthesis is required for regulating adaptive thermogenesis and whole-body energy homeostasis in mice. **Proc Natl Acad Sci**, [S.L.], v. 116, n. 47, p. 23822-23828, 2019.

YANG, L.H. *et al.* Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Pharmacological Res**, v. 56, p. 202–208, 2007.

YANG, N. *et al.* Identification and characterization of proteins that are differentially expressed in adipose tissue of olanzapine-induced insulin resistance rat by iTRAQ quantitative proteomics. **J Prot**, v. (19), p. 30342-2, 2019.

YE, J.M. *et al.* Peroxisome Proliferator—Activated Receptor (PPAR)- $\alpha$  Activation Lowers Muscle Lipids and Improves Insulin Sensitivity in High Fat—Fed Rats. **Diabetes**; v. 50(2), p. 411-417, 2001.

YIN, F. *et al.* SREBP-1 inhibitor Betulin enhances the antitumor effect of Sorafenib on hepatocellular carcinoma via restricting cellular glycolytic activity. **Cell Death Dis**, v. 10, p. 672, 2019.

YIN, M.C. *et al.* Bioavailability, Distribution, and Antioxidative Effects of Selected Triterpenes in Mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 31, p. 7697–7701, 2012.

YOON, C.K. Weight Gain and First-Generation Antipsychotics. **Experience from a Developing Country**, v. 28, 2008.

ZEBISCH, K. *et al.* Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analyt Biochem.**, v. 425, n. 1, p. 88-90, 2012.

ZHANG, Q. *et al.* Olanzapine reduced brown adipose tissue thermogenesis and locomotor activity in female rats. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 51, p. 172-180, ISSN 0278-5846, 2014b.

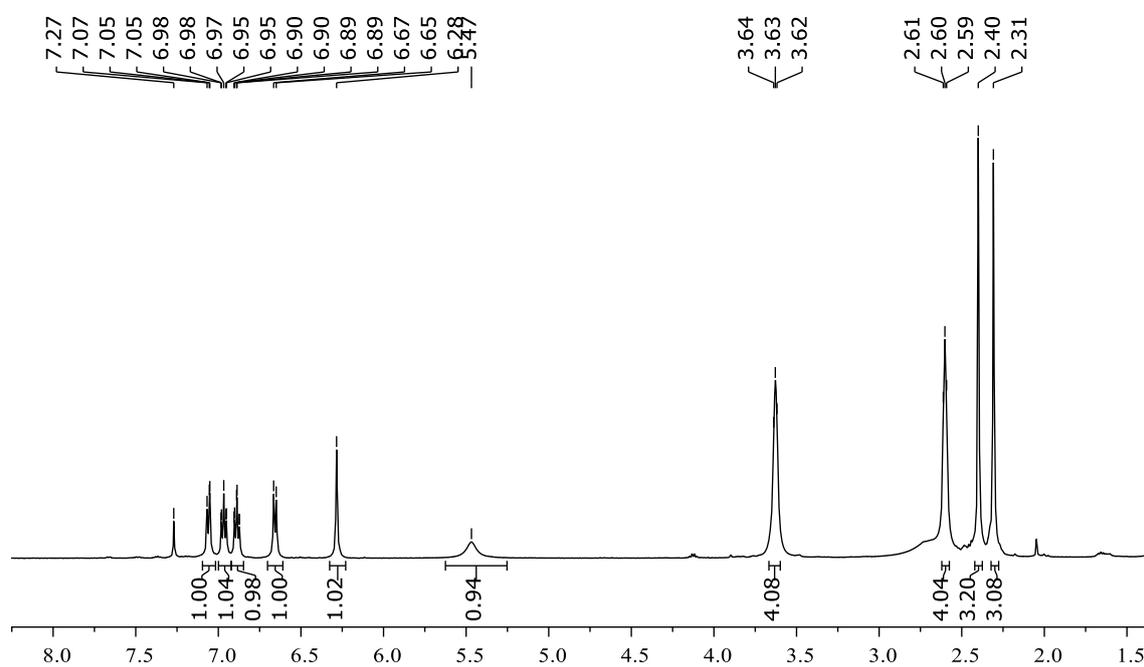
ZHANG, S. *et al.* Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity. **Food Chem.**, v. 146, p. 264–269, 2014a.

ZHANG, W.; POPOVICH, D. G. Chemical and biological characterization of oleanane triterpenoids from soy. **Molecules**. v. 14, p. 2959–2975, 2009.

ZHAO, M. *et al.* Triterpenic acids-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* attenuates non-alcoholic fatty liver disease via improving oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Biom Pharmacot.**, v. 104, p. 229–239, 2018.

ZHU, J. *et al.* Chemico-Biological Interactions Ganoderic Acid A improves high fat diet-induced obesity, lipid accumulation and insulin sensitivity through regulating SREBP pathway. **Chem Biol Interact.**, v. 290, n. May, p. 77–87, 2018.

## ANEXO I - ESPECTRO DE RMN DA OLANZAPINA

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ).

## ANEXO II – FOLHAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de modelo de obesidade induzida por olanzapina em camundongos de linhagem C57BL/6 e tratamento com ácido oleanólico", protocolada sob o CEUA nº 4575280219 (ID 000943), sob a responsabilidade de **Flávia Almeida Santos e equipe; Rose Anny Costa Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/04/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the olanzapine-induced obesity model in C57BL/6 mice and treatment with oleanolic acid", utilizing 50 Isogenics mice (50 females), protocol number CEUA 4575280219 (ID 000943), under the responsibility of **Flávia Almeida Santos and team; Rose Anny Costa Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/16/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [08/2019](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 5 semanas](#)

N: [50](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [15 a 17 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, nº 1315, - Prédio do Instituto de Biomedicina, 1º andar.

Fortaleza, 03 de agosto de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará



**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de modelo de obesidade induzida por olanzapina em camundongos de linhagem C57BL/6 e tratamento com ácido ursólico", protocolada sob o CEUA nº 8407290120 (ID 001499), sob a responsabilidade de **Flávia Almeida Santos e equipe; Rose Anny Costa Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 13/02/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the olanzapine-induced obesity model in C57BL/6 mice and treatment with ursolic acid", utilizing 50 Isogenics mice (50 females), protocol number CEUA 8407290120 (ID 001499), under the responsibility of **Flávia Almeida Santos and team; Rose Anny Costa Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 02/13/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2020** a **08/2020**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 5 semanas**

N: **50**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **14 a 16 g**

Local do experimento: Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, nº 1315, - Prédio da Biomedicina, 1º andar.

Fortaleza, 01 de março de 2021

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará