

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Jorge Felipe Argenta Model

**Efeitos do Tratamento com Liraglutida na Prevenção das Alterações  
Metabólicas Induzidas pela Castração em Ratos Machos e Fêmeas**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Efeitos do Tratamento com Liraglutida na Prevenção das Alterações Metabólicas  
Induzidas pela Castração em Ratos Machos e Fêmeas

Autor: Jorge Felipe Argenta Model

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Dra. Anapaula Sommer Vinagre

Porto Alegre

2019

## RESUMO

Os hormônios esteroides sexuais são muito importantes para a manutenção da homeostasia nos mamíferos, regulando várias funções além da reprodução. Nos machos o principal hormônio sexual é a testosterona (T), enquanto nas fêmeas é o 17- $\beta$ -estradiol (E2). A redução ou mesmo perda completa da produção de esteroides sexuais é uma condição fisiológica que ocorre após determinada idade. Nas mulheres ocorre a menopausa, definida como a interrupção espontânea nas menstruações, enquanto nos homens ocorre a andropausa, uma situação semelhante, porém mais gradual, caracterizada pela redução nos níveis de T a partir dos 40 anos. Muitas das ações do E2 e da T envolvem a regulação do metabolismo, conseqüentemente várias das disfunções que ocorrem com a perda destes hormônios envolvem distúrbios metabólicos, como a obesidade e a diabetes mellitus tipo 2. Os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento da DM2 também apresentam riscos ao paciente, em alguns casos causando hipoglicemia por exemplo. Entre as novas opções terapêuticas, está o uso de análogos do GLP1 (*glucagon-like peptide 1*). O GLP1 é um hormônio peptídico liberado principalmente pelas células L intestinais, ele estimula a secreção de insulina pelas células  $\beta$  e inibe a secreção de glucagon pelas células  $\alpha$ , mantendo a homeostase da glicose. Também age no sistema nervoso central, e em diferentes depósitos de tecido adiposo. Tanto os esteroides sexuais (E2 e T) quanto o GLP1 e seus análogos atuam regulando os diferentes depósitos de tecido adiposo e recentemente, foi demonstrado que estes hormônios podem regular a liberação uns dos outros. Com base no que já está descrito na literatura, propomos que a terapia com liraglutida (um análogo do GLP1) possa impedir/reverter as alterações no metabolismo do tecido adiposo induzidas pela castração. Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com 60 dias de idade. Os animais foram submetidos a gonadectomia ou passaram pelo processo cirúrgico, exceto a remoção dos ovários/testículos (animais *sham*). Uma semana após a cirurgia, iniciou-se o tratamento com a administração de liraglutida por 60 dias. Foram avaliados o ganho de massa dos animais ao longo do tratamento; os níveis de glicose, triglicérides e colesterol total; a relação entre o peso corporal total e o peso de diferentes depósitos de tecido adiposo branco (TAB) e do tecido adiposo marrom (TAM); a atividade

lipolítica, síntese de lipídeos a partir de C<sup>14</sup>-glicose e oxidação de C<sup>14</sup>-glicose no em diferentes depósito de TAB e no TAM. O tratamento estimulou a redução da massa total dos animais, a redução dos depósitos de TAB, o aumento da oxidação de glicose, a lipogênese, a lipólise basal e estimulada pela epinefrina, sendo que, de forma geral o tratamento parece ser mais efetivo nas fêmeas do que nos machos. Embora ainda existam questões em aberto, os resultados encontrados até agora indicam a administração de análogos do GLP1 como um promissor tratamento para indivíduos com alterações metabólicas decorrentes de baixas concentrações de esteroides sexuais.

## ABSTRACT

Sexual steroid hormones are very important for the maintenance of mammals' homeostasis, regulating various functions besides reproduction. In males, the main sex hormone is testosterone (T), whereas in females it is 17- $\beta$ -estradiol (E2). The reduction or even complete loss of sex steroids production is a physiological condition that occurs after a certain age. In women, menopause is defined as the spontaneous interruption of menstruation, while men experience andropause, a similar but more gradual situation characterized by a reduction in T levels from the age of 40 years. Many actions of E2 and T involve the regulation of metabolism, consequently several of the dysfunctions that occur with the loss of these hormones involve metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes mellitus. The most commonly used drugs for the treatment of T2D present risks to the patient, in some cases causing hypoglycemia. Among the new therapeutic options, there is the use of GLP1 analogues (glucagon-like peptide 1). GLP1 is a peptidic hormone released mainly by intestinal L cells; it stimulates insulin secretion by  $\beta$  cells and inhibits glucagon secretion by  $\alpha$  cells, maintaining glucose homeostasis. It also acts on the central nervous system, and on different adipose tissue deposits. Both sex steroids (E2 and T), GLP1 and their analogues act by regulating different adipose tissue deposits, and recently it has been shown that these hormones can regulate the release of each other. Based on what has already been described in the literature, our hypothesis is that liraglutide therapy (a GLP1 analog) may prevent / reverse castration-induced alterations in adipose tissue metabolism. Male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 60 days old, were used. The animals were submitted to gonadectomy or underwent the surgical procedure, except the removal of the ovaries/testicles (sham animals). One week after surgery, treatment with liraglutide was started. There were evaluated throughout the treatment: animals' mass gain; levels of glucose, triglycerides and total cholesterol; the relationship between total body mass and different deposits of white adipose tissue (TAB) and brown adipose tissue (TAM) mass; lipolytic activity, synthesis of lipids from C<sup>14</sup>-glucose and oxidation of C<sup>14</sup>-glucose in the different TAB and TAM. The treatment reduced animals total mass and white adipose tissue deposits, increased glucose oxidation, lipogenesis, basal lipolysis and epinephrine, stimulated lipolysis and, in general, it

seems to be more effective in females than in males. Although there are still open questions, the results found so far indicate that the administration of GLP1 analogues are promising treatment for individuals with metabolic abnormalities due to low concentrations of sexual steroids.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AKT** : proteína quinase B

**AMPc**: monofosfato cíclico de adenosina

**AMPK**: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

**ATP**: trifosfato de adenosina

**BSA**: albumina sérica bovina

**DHT**: dihidrotestosterona

**DM2**: diabetes tipo 2

**DPP4**: dipeptidil peptidase 4

**E2**: 17- $\beta$ -estradiol

**FGF21**: fator de crescimento de fibroblastos 21

**FSH**: hormônio folículo estimulante

**GH**: hormônio do crescimento

**GIP**: peptídeo inibitório gástrico

**GLP1**: peptídeo semelhante ao glucagon 1

**GLP1Rs**: receptores de peptídeo semelhante ao glucagon 1

**GLUT4**: transportador de glicose 4

**GPER**: receptor de estrogênios acoplado a proteína G

**GnRH**: hormônio liberador de gonadotrofinas

**IL6**: interleucina 6

**iNKT**: células "*invariant natural killer*" T residents no tecido adiposo

**K<sub>ATP</sub>**: canal de K<sup>+</sup> dependente de ATP

**KRB**: Ringer Krebs Bicarbonato

**LH**: hormônio luteinizante

**LPL**: lipase lipoproteica

**mTOR**: alvo de rapamicina em mamíferos

**NE:** noraepinefrina

**ORQ:** orquiectomizado

**OVR:** ovariectomizada

**PKA:** proteína cinase A

**Ppar- $\gamma$ :** receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$

**AR:** receptor de andrógenos

**ER:** receptor de estrogênios

**ER $\alpha$ :** receptor de estrogênios  $\alpha$

**ER $\beta$ :** receptor de estrogênios  $\beta$

**SNC:** sistema nervoso central

**T:** testosterona

**TAB:** tecido adiposo branco

**TABe:** tecido adiposo bege

**TABg:** tecido adiposo branco perigonadal

**TABpr:** tecido adiposo branco perirrenal

**TABrt:** tecido adiposo branco retroperitoneal

**TAG:** triacilgliceróis

**TAM:** tecido adiposo marrom

**TNF $\alpha$ :** fator de necrose tumoral  $\alpha$

**UCP-1:** proteína desacopladora-1



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esteroidogênese. ....	12
<b>Figura 2:</b> Mecanismos celulares de ação estrogênica.....	13
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de ação do GLP1 na célula $\beta$ pancreática. ....	17
<b>Figura 4:</b> Ações clássicas do GLP1.....	19
<b>Figura 5:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida na massa do útero de ratas. ....	29
<b>Figura 6:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida em fêmeas. ....	30
<b>Figura 7:</b> Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida em machos. ....	32
<b>Figura 8:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABrt).....	34
<b>Figura 9:</b> Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABrt).....	36
<b>Figura 10:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco perirrenal (TABpr).....	40
<b>Figura 11:</b> Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco perirrenal (TABpr).....	42
<b>Figura 12:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco gonadal (TABg).. ....	44
<b>Figura 13:</b> Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco gonadal (TABg). ....	46
<b>Figura 14:</b> Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM). ....	48
<b>Figura 15:</b> Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM). ....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida na lipólise basal e estimulada por adrenalina em diferentes depósitos de tecido adiposo branco.. .....37
- Tabela 2:** Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida na lipólise basal e estimulada por adrenalina em diferentes depósitos de tecido adiposo branco.. .....38

## SUMÁRIO

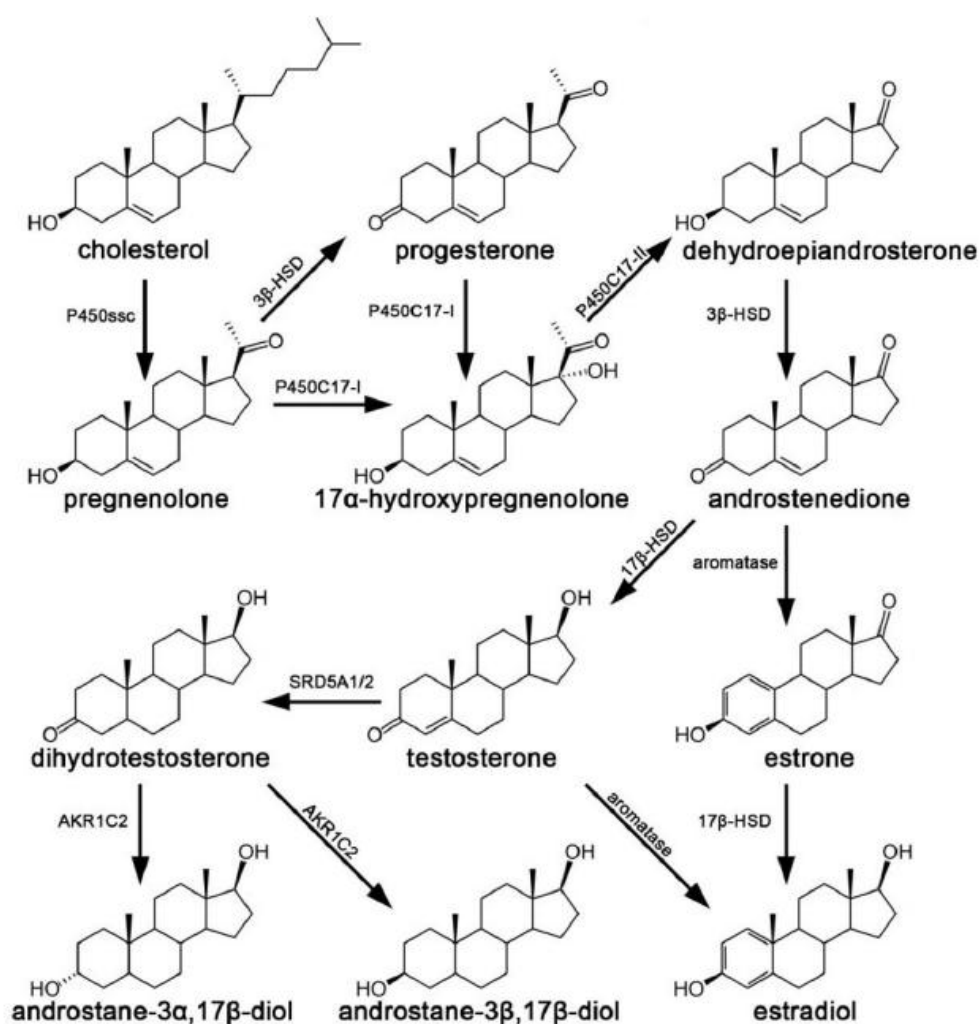
1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	HIPÓTESE .....	23
1.2	OBJETIVOS .....	24
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1	ANIMAIS .....	24
2.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	25
2.3	MANUTENÇÃO E EUTANÁSIA .....	26
2.4	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO .....	27
2.5	LIPÓLISE BASAL E ESTIMULADA.....	27
2.6	CONVERSÃO DE GLICOSE EM CO <sub>2</sub> .....	27
2.7	CONVERSÃO DE GLICOSE EM LIPÍDIOS .....	28
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
3	RESULTADOS .....	29
3.1	ÚTERO.....	29
3.2	GANHO DE MASSA.....	29
3.3	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO .....	32
3.4	TECIDO ADIPOSEO MARROM – FEMÊAS.....	46
3.5	TECIDO ADIPOSEO MARROM – MACHOS.....	49
3.6	TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL – FEMÊAS .....	33
3.7	TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL – MACHOS .....	34
3.8	TECIDO ADIPOSEO BRANCO PERIRRENAL – FEMÊAS.....	39
3.9	TECIDO ADIPOSEO BRANCO PERIRRENAL – MACHOS.....	40
3.10	TECIDO ADIPOSEO BRANCO GONADAL – FÊMEAS .....	42
3.11	TECIDO ADIPOSEO BRANCO GONADAL – MACHOS.....	44
4	DISCUSSÃO.....	51
5	CONCLUSÃO .....	57
6	REFERENCIAS .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Os hormônios esteroides sexuais são muito importantes para a manutenção da homeostasia nos mamíferos, regulando várias funções além da reprodução. Nos machos o principal hormônio sexual é a testosterona (T) (LO et al., 2018; MOORADIAN; MORLEY; KORENMAN, 1987). A maior parte da T circulante é produzida nos testículos pelas células de Leydig, tendo como precursor o colesterol. A rota de síntese da T está representada na figura 1. O principal estímulo para a produção da T é o hormônio luteinizante (LH), liberado pela adeno-hipófise em resposta ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido no hipotálamo e liberado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário (CLAVIJO; WAYLAND HSIAO, 2018). Por ser uma molécula lipofílica, a T tem facilidade em atravessar a membrana das células, porém a maior parte da T plasmática está associada a proteínas, como a globulina ligadora de hormônios sexuais e a albumina (LAMM; CHIDAKEL; BANSAL, 2016). A T age em diversos tecidos ao ligar-se a receptores de andrógenos (AR), que podem estar no citoplasma (regulam a expressão gênica, clássicos) ou na membrana plasmática (acoplados a proteína G, menos comuns). Em diferentes células alvo, a T pode, além de ligar-se a um AR, ser convertida em outro hormônio como a dihidrotestosterona (DHT) ou a estrogênio, pelas enzimas 5- $\alpha$ -redutase e aromatase, respectivamente (MOLINA- VEGA et al., 2017; SESSA et al., 2018). O principal local de conversão da T em estrógeno é o tecido adiposo branco (TAB). Além das células de Leydig os andrógenos também são produzidos no córtex adrenal, embora em quantidades muito menores. Nas fêmeas o córtex adrenal é o principal local de síntese de T (MCHENRY et al., 2014).

Os andrógenos (T e DHT) agem em diversos tecidos, promovendo o desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias e a espermatogênese (MOORADIAN; MORLEY; KORENMAN, 1987). Estes hormônios também participam da regulação do metabolismo intermediário, agindo no músculo esquelético aumentando a sensibilidade à insulina, no fígado inibindo a lipogênese e estimulando a oxidação de lipídios e a sensibilidade à insulina, no hipotálamo aumentando o gasto energético e à sensibilidade tanto à leptina quanto a insulina e nas células  $\beta$  pancreáticas aumentando a liberação de insulina (NAVARRO et al., 2015).

**Figura 1: Esteroidogênese.** Rotas de síntese do principais hormônios esteroides sexuais.

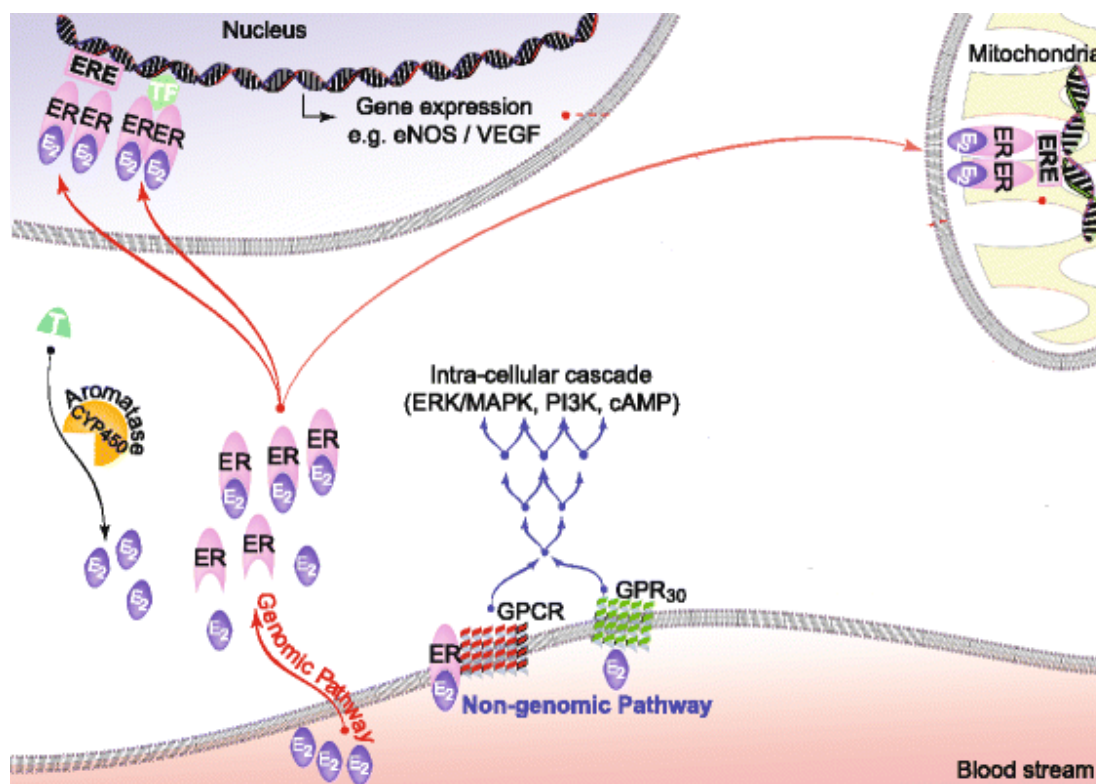


Fonte: MCHENRY et al. 2014

Nas fêmeas os esteroides sexuais mais abundantes são os estrogênios, e o 17-β-estradiol (E2) é o mais importante deles. O E2 é produzido nos folículos ovarianos em desenvolvimento (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). A rota de síntese está representada na figura 1. Para a produção de E2 ocorrer são necessários tanto o LH como o hormônio folículo estimulante (FSH), ambos produzidos na adeno-hipófise, em resposta ao GnRH (SIMPSON, 2003). Nas células alvo o E2 se liga a receptores de estrogênios (ERs) que podem estar tanto na membrana acoplados a proteína G (GPER) como no citosol (ERα e ERβ) (Figura 2). Diversos tecidos possuem ERs, e ao entrar na célula o E2 liga-se a seu receptor,

que forma dímeros e no núcleo, liga-se a elementos responsivos a estrógenos, promovendo ou inibindo a expressão de determinados genes (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

**Figura 2: Mecanismos celulares de ação estrogênica.** Vias genômicas são mostradas em setas vermelhas, enquanto vias não genômicas são mostradas em setas azuis. Abreviaturas: estrogênio E2, receptor estrogênico ER, elemento de resposta estrogênica ERE, testosterona T, receptor acoplado a proteína G GPCR, fosfoinositídeo 3-quinase PI3K, proteína quinase ativada por mitógeno MAPK, proteína quinase B de AKT.



Fonte: adaptado de IORGA et al., 2017

Além destas ações, os estrógenos são muito importantes na regulação do metabolismo intermediário. Eles agem em diferentes tecidos, como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, no sistema nervoso central e em células  $\beta$  pancreáticas (KIM; CHO; KIM, 2014; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). No fígado o E2 participa da regulação de genes envolvidos na lipogênese inibindo-os, além de

reduzir a resistência à insulina neste tecido (BRYZGALOVA et al., 2008). No músculo esquelético o E2 também melhora o quadro de resistência à insulina, agindo pelas vias da proteína quinase B (PKB ou AKT) e da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), além de estimular a oxidação de lipídios (MAHER et al., 2010; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Estes efeitos estão claramente relacionados à ativação do ER $\alpha$ , enquanto a ligação ao ER $\beta$  (muito menos expresso) aumenta a resistência à insulina (BARROS et al., 2006). O tecido adiposo é um dos principais locais de ação dos estrógenos, onde estes hormônios promovem o aumento da lipólise e da oxidação de lipídios, e inibe a captação de ácidos graxos e a síntese de triglicerídeos (D'EON et al., 2005; LUNDHOLM et al., 2008; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Além de aumentar a sensibilidade a insulina de forma sistêmica (BRYZGALOVA et al., 2008; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013), o E2 também age diretamente nas células  $\beta$  melhorando a secreção de insulina estimulada pela glicose (WONG et al., 2010).

A redução ou mesmo perda quase completa da produção de esteroides sexuais é uma condição fisiológica que ocorre após certa idade. A menopausa é definida como a interrupção espontânea nas menstruações por um período de 12 meses. A maioria das mulheres entra na menopausa entre os 49 e 51 anos (TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Em homens ocorre uma situação semelhante, porém mais gradual, a andropausa, caracterizada pela redução nos níveis de testosterona em homens a partir dos 40 anos que pode levar ao desenvolvimento de hipogonadismo funcional (ABDELHAMED et al., 2015; HARRISON, 2011; JENSTERLE et al., 2019). Embora os esteroides sexuais sejam muito importantes para o desenvolvimento e para a regulação de diversas funções, em determinadas situações a remoção das gônadas é um procedimento desejável, que melhora a condição clínica e a expectativa de vida do indivíduo, sendo utilizada em homens e mulheres com diferentes tipos de tumores (HALDAR et al., 2011; LO et al., 2018; YEGNASUBRAMANIAN et al., 2018).

Muitas das ações do E2 e da T envolvem a regulação do metabolismo, conseqüentemente várias das disfunções que ocorrem com a perda destes hormônios envolvem distúrbios metabólicos. A redução na concentração plasmática destes hormônios, especialmente de E2, está claramente relacionada à maior incidência de obesidade e de resistência à insulina (LIZCANO; GUZMÁN, 2014).

Nos Estados Unidos (EUA), por exemplo, estima-se que 65% das mulheres entre 40 a 59 anos são obesas, aumentando para 73,8% em mulheres acima de 60 anos (WHO, 2016).

Atualmente a obesidade é considerada uma epidemia global e um dos problemas de saúde mais sérios em diversos países. Conforme a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), existem cerca de 600 milhões de pessoas obesas ao redor do globo, incluindo 41 milhões de crianças com menos de 5 anos. A obesidade é definida como um estado onde o acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo causa sérios problemas de saúde (LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2015). A epidemia de obesidade também se estende aos animais domésticos, nos EUA estima-se que 53,8% dos cães e 58,2% dos gatos são obesos ou com sobrepeso (KIM; CHO; KIM, 2014). Devido à longa história coevolutiva com os humanos, cães e gatos apresentam predisposição genética similar aos humanos para cerca de 200 patologias, incluindo a obesidade (DE GODOY; SWANSON, 2013). Assim como em humanos, a obesidade diminui a expectativa de vida nos animais domésticos (DE GODOY; SWANSON, 2013). Devido a expansão da população de animais de companhia, a castração se tornou um procedimento comum. Nos EUA, 75% destes animais são castrados (DE GODOY; SWANSON, 2013), e similar ao que ocorre em humanos, a castração aumenta a tendência à obesidade (DE GODOY; SWANSON, 2013; FRIED; LEE; KARASTERGIU, 2015; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2015).

A etiologia da obesidade é heterogênea, dependendo de interações entre fatores genéticos, ambientais (dieta hipercalórica e sedentarismo) e psicossociais (DE GODOY; SWANSON, 2013; FAN et al., 2005). As comorbidades associadas à obesidade incluem hipertensão, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, distúrbios musculoesqueléticos, hiperlipidemia, apneia do sono, alguns tipos de câncer e principalmente resistência à insulina, que pode evoluir para diabetes tipo 2 (DM2) (DE GODOY; SWANSON, 2013; HUANG et al., 2016; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2015). A DM2 é uma complexa patologia endócrino-metabólica caracterizada pelo desenvolvimento de resistência periférica à insulina e disfunção na secreção de insulina pelas células  $\beta$ , levando a um quadro de hiperglicemia. Além destas alterações a DM2 pode levar a outras complicações, como nefropatia, hipertensão, dislipidemia, esteatose hepática e inflamação sistêmica (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

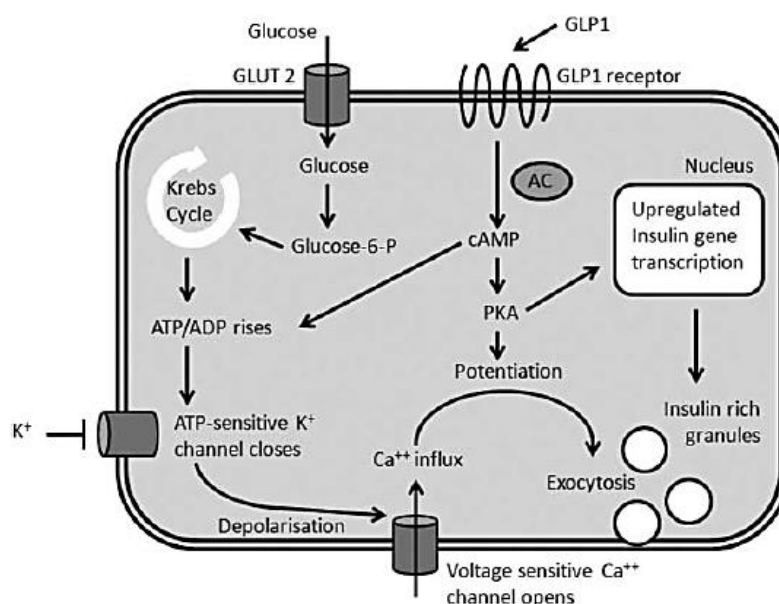


A principal forma de tratamento para a obesidade e para a DM2 consiste na mudança de hábitos, que envolve alterações na dieta e prática regular de exercício físico. Todavia a intervenção farmacológica é necessária em diversos casos. Devido aos efeitos colaterais, muitos medicamentos usados para o tratamento da obesidade foram retirados do mercado (LIN et al., 2005). Os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento da DM2 também apresentam riscos ao paciente, em alguns casos causando hipoglicemia por exemplo (BODMER et al., 2008). Quando estas patologias estão associadas à menopausa, a terapia de reposição estrogênica contribui para a diminuição da obesidade, porém aumenta a tendência ao câncer de mama, sendo contra indicada em mulheres com tendência genética para o câncer de mama (ARORA et al., 2016; LIN et al., 2005; LIZCANO; GUZMÁN, 2014). Dessa forma, a busca por novas terapias para o tratamento da obesidade é uma questão científica urgente (LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2015). Entre as novas opções terapêuticas, o uso de moduladores seletivos de receptores estrogênicos tais como o tamoxifeno, análogos do GLP1 (*glucagon-like peptide 1*), o uso de GLP1 associado a E2 (17- $\beta$ -estradiol) e GLP1 associado a agonistas  $\beta$ 3-adrenérgicos estão em estudo (CAO et al., 2014; DECARA et al., 2018; FINAN et al., 2012; LIZCANO; GUZMÁN, 2014; LOCKIE et al., 2012; LÓPEZ; TENA-SEMPERE, 2015; VANGOITSENHOVEN; MATHIEU; VAN DER SCHUEREN, 2012; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013). Outra proposta terapêutica em estudo consiste na ativação do tecido adiposo marrom (TAM) (FRIED; LEE; KARASTERGIU, 2015; VANGOITSENHOVEN; MATHIEU; VAN DER SCHUEREN, 2012).

Após as refeições, a chegada de nutrientes ao intestino, estimula a liberação de hormônios conhecidos como incretinas, tais como o GLP1 e o GIP (peptídeo inibitório gástrico). O GLP1 é liberado principalmente pelas células L intestinais, mas também pode ser secretado pelas células  $\alpha$  pancreáticas, sendo sintetizado a partir do mesmo pró-hormônio que o glucagon (HANDGRAAF et al., 2018). Receptores de GLP1 (GLP1Rs) são expressos no sistema nervoso central (SNC) e periféricamente no pâncreas, estômago, intestino, coração, rins, musculatura esquelética e no tecido adiposo (ROWLANDS et al., 2018; SECHER et al., 2014) (Figura 3). Esses hormônios possuem efeitos tróficos sobre as células  $\beta$ , estimulam a secreção de insulina e inibem a secreção de glucagon pelas células  $\alpha$ , mantendo a homeostase da glicose (BAGGIO; DRUCKER, 2007; NAUCK; MEIER, 2017). Também inibem o

esvaziamento gástrico, prolongando a sensação de saciedade e reduzindo a ingestão alimentar (NAUCK; MEIER, 2017). As incretinas diminuem os níveis pós-prandiais de lipídeos, reduzem marcadores de inflamação, diminuem o estresse oxidativo e apresentam vários efeitos cardiovasculares benéficos (RAVASSA; ZUDAIRE; DIEZ, 2012; ZHANG et al., 2018). Em conjunto, essas ações são conhecidas como "efeito incretina". Porém, as incretinas possuem uma meia vida curta, sendo desativadas pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP4). Em pacientes com DM2, o efeito incretina está atenuado (VANGOITSENHOVEN; MATHIEU; VAN DER SCHUEREN, 2012). Assim, inibidores da DPP4 e agonistas dos receptores de GLP1 foram desenvolvidos para o tratamento da DM2. Entre esses, o liraglutida e o exenatide estão sendo amplamente utilizados principalmente porque reduzem a hiperglicemia sem causar risco de hipoglicemia e porque reduzem o peso corporal (AHMADI et al., 2018; VANGOITSENHOVEN; MATHIEU; VAN DER SCHUEREN, 2012).

**Figura 3: Mecanismo de ação do GLP1 na célula  $\beta$  pancreática.**



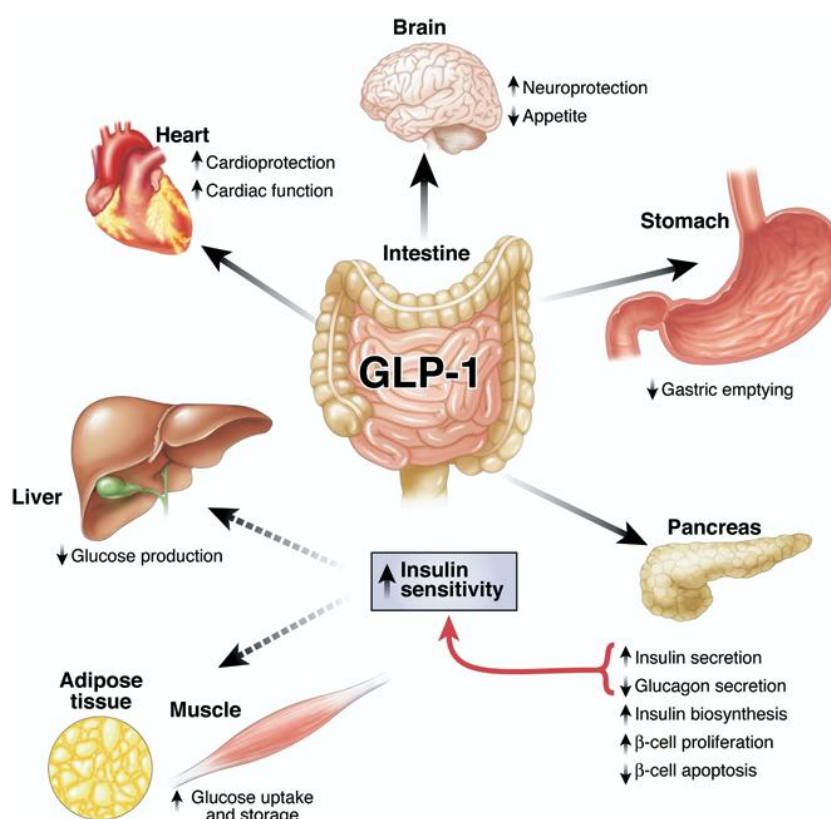
Fonte: VANGOITSENHOVEN et al., 2012.

No SNC GLP1Rs foram encontrados na hipófise e em núcleos hipotalâmicos que participam no controle da saciedade (LOCKIE et al., 2012;

VANGOITSENHOVEN; MATHIEU; VAN DER SCHUEREN, 2012). A administração intra-cerebro-ventricular de GLP1 em dose única ou infusão reduz o consumo alimentar e o peso corporal, aumenta a atividade sináptica nos neurônios hipotalâmicos que controlam as fibras simpáticas para o TAM estimulando a termogênese em camundongos e ratos (BEIROA et al., 2014). Esse efeito é mediado pelo aumento na expressão de genes termogênicos PGC1 $\alpha$ , UCP1, FIO2 e FGF21 (LOCKIE et al., 2012).

Além dos efeitos clássicos no pâncreas e no SNC, o GLP1 age em outros tecidos muito importantes para a regulação da homeostase energética (ROWLANDS et al., 2018). No músculo esquelético foi demonstrado que agonistas do GLP1R estimulam a síntese de glicogênio, a atividade da glicogênio sintase e inibem a glicogênio fosforilase (GREEN et al., 2012; ROWLANDS et al., 2018). Outros trabalhos demonstram ainda que, a ativação do GLP1R estimula a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) e captação de glicose nos miócitos, por uma via de sinalização envolvendo a AMPK e a ativação da TBC1D1 (ANDREOZZI et al., 2016; DECARA et al., 2018). A circulação portal faz com que o fígado seja o órgão que recebe sangue com a maior concentração de GLP1 no organismo, e embora ainda se discuta o efeito direto desta incretina no hepatócitos, diversos efeitos de seus análogos já foram descritos (ROWLANDS et al., 2018). Entre estes efeitos estão o aumento na concentração de glicogênio e atividade da glicogênio sintase  $\alpha$  (REDONDO et al., 2003), inibição da glicogenólise estimulada pelo glucagon (IKEZAWA et al., 2003), redução na expressão de enzimas da via gliconeogênica (YANG et al., 2017) e melhora no quadro de esteatose pela regulação das vias AMPK/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (HE et al., 2016). Já no tecido adiposo agonistas do GLP1 estimulam a diferenciação de adipócitos, a termogênese e inibem a ácido graxo sintase (BEIROA et al., 2014; CHEN et al., 2017). Além dos efeitos causados diretamente nos adipócitos, o GLP1 também age em células do sistema imune residentes no tecido adiposo como os iNKT (*adipose-resident invariant natural killer T*). Após estimuladas estas células liberam o fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), que por sua vez estimula os adipócitos promovendo aumento na termogênese (LYNCH et al., 2016).

**Figura 4: Ações clássicas do GLP1.** Resumo das ações descritas do GLP1 em tecidos periféricos. A maioria dos efeitos do GLP-1 é mediada pela interação direta com GLP-1Rs em tecidos específicos. No entanto, algumas ações do GLP-1 podem ocorrer por meio de mecanismos indiretos (insulina e sistema nervoso autônomo simpático).



Fonte: BAGGIO; DRUCKER, 2007

Existem três tipos conhecidos de tecido adiposo em mamíferos, o tecido adiposo branco (TAB), o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo bege (TABe). Embora os três tipos possuam depósitos de lipídios, suas funções são muito diferentes (WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013). O TAB é considerado o principal reservatório energético do corpo, e possui um importante papel na regulação do metabolismo intermediário (HERTZEL et al., 2008). A principal função do TAM é a geração de calor a partir da atividade da proteína desacopladora-1 (UCP-1) (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007). Já o tecido adiposo bege é uma espécie de intermediário entre os outros dois tipos (WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

O TAB é formado por diversos tipos celulares, como adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais vasculares, fibroblastos, macrófagos e células tronco mesenquimais, sendo bem innervado e vascularizado (LAPID et al., 2014). Os adipócitos brancos possuem uma gotícula de lipídeos ocupando quase todo o citoplasma, enquanto o núcleo e uma fina camada de citosol ficam na periferia da célula (BARNEDA et al., 2013). A função clássica do TAB é de armazenar energia na forma de triacilgliceróis (TAG). Os TAG são formados por uma molécula de glicerol e três ácidos graxos. A regulação dos processos de síntese (lipogênese) e degradação (lipólise) dos TAG depende de diversos estímulos, tanto hormonais como nervosos (BARNEDA et al., 2013; HANSEN, F. M.; FAHMY, N.; NIELSEN, 1980).

Após a descoberta da leptina (ZHANG et al., 1994), o TAB passou a ser considerado como uma importante glândula endócrina, capaz de produzir diversas moléculas (a maioria hormônios) bioativas, tais como as citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$  -TNF $\alpha$  e interleucina 6 -IL6) assim como as adipocinas ou adipocitocinas (resistina, adiponectina), estrógenos entre outros (DE GODOY; SWANSON, 2013; FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015). A leptina atua fisiologicamente como um agente anoréxico, diminuindo a ingestão alimentar em indivíduos saudáveis. Porém, em camundongos e humanos obesos, pode ocorrer resistência à leptina e hiperleptinemia, exacerbando o desenvolvimento do tecido adiposo (DE GODOY; SWANSON, 2013; LIN et al., 2005). Outro hormônio elevado na obesidade é a resistina, a qual aumenta a produção de citocinas inflamatórias, aumentando o quadro inflamatório e, muitas vezes agravando a resistência à insulina (DE GODOY; SWANSON, 2013). Em contraste, a adiponectina diminui em indivíduos obesos e/ou com resistência à insulina e o aumento na relação leptina/adiponectina tem sido utilizada como indicativo de resistência à insulina (DE GODOY; SWANSON, 2013; KIM; CHO; KIM, 2014).

O TAB é anatomicamente dividido em tecido adiposo subcutâneo e visceral. Cada um deles ainda pode ser dividido em diversos depósitos, que possuem características morfológicas e funcionais próprias (FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015). Por exemplo, a distribuição dos subtipos de receptores adrenérgicos varia entre os depósitos viscerais e subcutâneos, determinando a intensidade da ação lipolítica da adrenalina e da noraepinefrina (NE) (FRIED; LEE; KARASTERGIOU,

2015). Mulheres possuem maiores depósitos de gordura corporal do que os homens, dos quais 80 - 90% estão armazenadas em depósitos subcutâneos, principalmente na região gluteofemoral. Em consequência, o corpo adquire um formato que lembra o de uma pera (FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015; KIM; CHO; KIM, 2014). Em contraste, os homens tendem a desenvolver obesidade central (formato de maçã) devido ao acúmulo de gordura em depósitos viscerais na região abdominal.

Enquanto a gordura gluteofemoral em mulheres está associada à proteção da homeostase glicose - insulina, o acúmulo de gordura na região da cintura, em ambos os sexos, está associado a um risco mais elevado para doenças metabólicas incluindo DM2 (FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015; KIM; CHO; KIM, 2014). Em mulheres jovens, os adipócitos intra-abdominais e subcutâneos são mais sensíveis à insulina do que os dos homens (KIM; CHO; KIM, 2014). Porém, após a menopausa, os depósitos de gordura abdominal tendem a aumentar (KIM; CHO; KIM, 2014). Em roedores, além dos depósitos subcutâneo e retroperitoneal, a obesidade aumenta os depósitos de gordura renal e epididimal (machos) e parametrial (fêmeas) (FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015). A comparação entre o transcriptomas da gordura omental humana e a epididimal de camundongo apresentou muitas similaridades, sugerindo que o camundongo é um modelo de estudo adequado (FRIED; LEE; KARASTERGIOU, 2015).

Mamíferos altriciais como os roedores, possuem um pequeno depósito de TAM na região interescapular ao nascer, porém este depósito aumenta ao longo da vida e permanece ativo nos adultos. Nos mamíferos precoces, como os humanos e as ovelhas, os recém-nascidos possuem depósitos de TAM na região supraclavicular (pescoço) e ao redor dos rins (perirrenal) e do coração (pericardial). Porém esses depósitos regredem nos adultos (HARMS; SEALE, 2013; SYMONDS; POPE; BUDGE, 2015). Por muito tempo pensou-se que o TAM não estava presente em humanos adultos, entretanto em um estudo publicado em 2007 por Nedegaard e cols. foi demonstrado que o TAM estava presente e ativo em humanos adultos.

A principal célula do TAM é o adipócito marrom, que difere dos adipócitos brancos quanto à função, morfologia e origem embrionária. Os adipócitos marrons apresentam esta coloração por que possuem um grande número de mitocôndrias no seu citoplasma. Estas organelas são muito numerosas porque elas são as responsáveis pela formação de calor, a principal função desses adipócitos (SAELY;

GEIGER; DREXEL, 2011). A função termogênica das mitocôndrias é atribuída à atividade da UCP-1. Esta proteína atua como um canal permitindo o vazamento dos prótons que são concentrados no espaço intermembranas, durante as reações da cadeia de transporte de elétrons. Desta forma a produção de trifosfato de adenosina (ATP) é reduzida e a energia do gradiente de prótons é transformada em calor (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2011). Outra característica que diferencia os adipócitos marrons dos brancos é o tamanho e a quantidade de gotículas lipídicas. Nos adipócitos marrons existem várias pequenas gotículas que armazenam TAG, ao invés de uma única gota que ocupa a maior parte do volume celular. Esta característica torna mais fácil o acesso de enzimas lipolíticas aos TAG, pois a superfície total onde estas enzimas podem agir é maior (BARNEDA et al., 2013).

Em resposta à exposição ao frio, o hipotálamo ativa o mecanismo reflexo de termorregulação no qual a estimulação do sistema nervoso simpático induz à liberação de NE nos terminais sinápticos que chegam ao TAM. Após a ligação aos receptores  $\beta$ , a NE aumenta os níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), ativando a PKA (proteína cinase A). Por sua vez, a PKA atua sobre as gotículas de gordura, estimulando a lipólise. Os ácidos graxos liberados entram nas mitocôndrias incrementando a atividade do ciclo de Krebs e da UCP1, aumentando a termogênese. A PKA também ativa fatores de transcrição como o Creb, Pgc-1 $\alpha$  e Atf2, aumentando a expressão de genes termogênicos. Em especial o Pgc-1 $\alpha$  é considerado um fator de transcrição chave na ativação adrenérgica da termogênese (HARMS; SEALE, 2013).

O TABe pode ser encontrado por entre as células do TAB na região supraclavicular em humanos e em depósitos subcutâneos (inguinais) e viscerais (perigonadal) em roedores (HARMS; SEALE, 2013). Os adipócitos beges possuem a mesma origem embriológica que os adipócitos brancos, e enquanto não são estimulados, apresentam a mesma morfologia. Porém quando são estimulados pelo frio, pelo sistema nervoso simpático, catecolaminas, ou por alguns outros mediadores como o Ppar- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), as células adiposas beges passam a ter aparência multilocular, expressam UCP-1 e apresentam atividade termogênica de forma semelhante ao TAM (HARMS; SEALE, 2013; KAJIMURA; SPIEGELMAN; SEALE, 2015). A principal diferença fisiológica

entre o TAM e TABe, está no fato do TAM apresentar alta expressão de UCP1 independentemente da exposição ao frio (HARMS; SEALE, 2013).

A descoberta da relação inversa entre ativação do TAM e/ou do TABe e obesidade tem despertado grande interesse científico. Porém uma questão ainda não respondida é se a redução na capacidade termogênica é causa ou consequência da obesidade. Independente da resposta, o aumento na atividade do TAM e/ou do TABe parece ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da obesidade e da DM2 (HARMS; SEALE, 2013). Outra questão em aberto é a caracterização de marcadores moleculares que possam identificar cada tipo de adipócito.

Além de tanto os esteroides sexuais (E2 e T) quanto o GLP1 e seus análogos atuarem regulando os diferentes depósitos de tecido adiposo, recentemente foi demonstrado que estes hormônios podem regular a liberação uns dos outros (HANDGRAAF et al., 2018; MASKE et al., 2017; NAVARRO et al., 2016; OUTEIRIÑO-IGLESIAS et al., 2015; WANG et al., 2017a). A administração de GLP1 em ratas causou aumento na liberação de LH no período pré-ovulatório, influenciando as concentrações posteriores de progesterona e estradiol (OUTEIRIÑO-IGLESIAS et al., 2015). Em um estudo de 2018, Handgraaf e colaboradores demonstraram que camundongas ovariectomizadas apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de glicose e de glucagon, e redução na concentração de insulina. Quando os animais são tratados com reposição de E2 estas alterações são revertidas. Neste mesmo estudo foi verificado que o tratamento com E2 em animais castradas aumenta a liberação de GLP1 tanto das células L (intestinais) quanto das células  $\alpha$  (pancreáticas). Já Navarro et al. (2016) demonstraram que a ativação do AR nas células  $\beta$  estimula a liberação de insulina mediada pelo GLP1.

## 1.1 HIPÓTESE

A recente descoberta do BAT em humanos tem impulsionado uma nova frente de pesquisa com vistas ao controle da obesidade. Estudos recentes demonstraram que a UCP-1 está ativa tanto no TAM quanto em áreas específicas do TAB (bege) de humanos adultos. A décadas já se sabe que os esteróides sexuais possuem papéis importantes na regulação, tanto da atividade do tecido adiposo branco,



quanto do metabolismo intermediário. Estudos com animais castrados demonstram que a diminuição nos esteróides sexuais induz à obesidade. Recentemente foi descrita a grande influência que o E2 exerce na atividade do TAB, assim como a interrelação dos estrógenos sexuais com o GLP1. A retirada das principais fontes desses hormônios (castração) influencia negativamente a atividade termogênica (UCP-1) tanto de adipócitos marrons quanto de adipócitos beiges. Em contrapartida, recentemente foi descrito que o GLP1, além dos efeitos já conhecidos no metabolismo da glicose, também estimula a termogênese no BAT. Assim, propomos que a terapia com liraglutida (Victoza®) possa impedir/reverter as alterações no metabolismo do tecido adiposo induzidas pela castração. Além do uso potencial por mulheres em menopausa, esse tratamento também poderia ser utilizado em animais de companhia após a castração.

## 1.2 OBJETIVOS

Pretende-se estudar se os efeitos metabólicos da castração (ovariectomia e orquiectomia) podem ser aliviados pelo tratamento com liraglutida. Para tal, serão avaliados como objetivos específicos:

- O ganho de massa dos animais ao longo do tratamento.
- A bioquímica plasmática: os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol total
- A relação entre o peso corporal total e o peso de diferentes depósitos de TAB (retroperitoneal, perirrenal e gonadal) e do TAM.
- Bioquímica e metabolismo tecidual: TAB perirrenal, retroperitoneal e gonadal: atividade lipolítica, síntese de lipídeos a partir de C<sup>14</sup>-glicose e oxidação de C<sup>14</sup>-glicose.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com 60 dias de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais

de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram separados em quatro grupos experimentais: machos controle, fêmeas controle, machos castrados e fêmeas castradas. O biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, foi o local de alojamento dos animais. Foram seguidas as condições padrão de biotério, como ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar de 70%, ração e água à vontade. As medidas dos caixas de polipropileno utilizadas eram: 340 mm de largura x 410 mm de comprimento x 200 mm de altura. Foram realizadas três trocas de caixas por semana, com aproximadamente 03 cm de cama de maravalha previamente autoclavada, e a lotação máxima de 3 animais por caixa. Os animais receberam ração comercial para roedores (Nuvilab CR1®) durante todo o período experimental. Todos os pesquisadores envolvidos no manuseio dos animais possuem treinamento para este fim. Também estão treinados para identificar o desconforto/ sofrimento de animais de laboratório pelas características físicas e comportamentais e visam garantir principalmente o bem-estar animal. As instalações utilizadas estão em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O cálculo do tamanho amostral foi efetuado utilizando-se o software G\*Power 3.1.9.2 (Schleswig-Holstein, Alemanha). No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro  $\alpha = 0,05$ , poder do teste estatístico = 0,80. Também foram usados como base para cálculo os resultados de protocolos experimentais de nosso laboratório. O cálculo amostral estimou um “n” total igual a 88 animais, sendo 44 fêmeas (11 animais por grupo x 4 grupos) e 44 machos (11 animais por grupo x 4 grupos). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS sob o número 32558.

## 2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Pesquisadores treinados realizaram as cirurgias, que consistem na remoção cirúrgica dos ovários das fêmeas destinadas aos grupos ovariectomizadas, e na retirada dos testículos dos machos do grupo orquiectomizados. Os animais foram anestesiadas (xilazina 5 mg/kg e cetamina 100 mg/kg) administradas por via intraperitoneal (volume máximo de 3ml) e os procedimentos cirúrgicos foram

realizados segundo as técnicas descritas por IDRIS, (2012). Após a cirurgia os animais foram acompanhados em local aquecido, individualizados, até a total recuperação da anestesia para retorno a biotério setorial. Os animais foram medicados com paracetamol (200mg/kg v.o.). Os animais dos grupos *sham* também passaram pelo processo cirúrgico e acompanhamento, exceto a remoção dos ovários/testículos. Segundo a diretiva europeia 86/609/EEC, que classifica os graus de severidade dos procedimentos laboratoriais com animais, este procedimento é caracterizado como moderado, pois os animais passarão por algum grau de dor, que será amenizado pela medicação anestésica/ analgésica, mas não terão prejuízo no bem-estar.

Uma semana após a cirurgia, iniciou-se o tratamento com administração subcutânea diária de liraglutida (Victoza®) a 4µg/kg ao anoitecer por sessenta (60) dias (CAO et al., 2014). Assim, os animais foram sub-divididos em 4 grupos para cada sexo (8 grupos no total): *Sham* tratado com salina; *sham* tratado com liraglutida; castrado tratado com salina e castrado tratado com liraglutida.

## 2.3 MANUTENÇÃO E EUTANÁSIA

A avaliação semanal da massa corporal dos animais foi realizada durante os dois meses de tratamento. Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz que produz alterações fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos protocolos, pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores, o que, no nosso caso poderia se tornar um viés de estudo (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005). Após a eutanásia, foram coletadas amostras de sangue e dos diferentes depósitos de TAM e de TAB: TABrt (retroperitoneal), TABpr (perirrenal), TABg (perigonadal). Após serem pesadas, as amostras de tecidos foram utilizadas para avaliar a oxidação da glicose (conversão a CO<sub>2</sub>), a lipólise e a lipogênese.

## 2.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO

Após a coleta do sangue, o soro foi separado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os parâmetros glicose, colesterol total, triglicerídeos foram avaliados conforme com a utilização de *kits* comerciais colorimétricos (Labtest®).

## 2.5 LIPÓLISE BASAL E ESTIMULADA

Amostras de tecidos foram incubadas em frascos com solução fisiológica Ringer Krebs Bicarbonato (KRB), pH 7,4, contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), 5mM de glicose e solução de adrenalina ( $2,5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) e ácido ascórbico ( $2,5 \times 10^{-4}\text{M}$ ). Os frascos foram aerados com carbogênio (95%  $\text{O}_2$ :5%  $\text{CO}_2$ ), fechados e incubados por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, o meio de incubação foi coletado e guardado em tubos tipo eppendorf para posterior dosagem de glicerol (STICH et al., 1997). O ensaio de lipólise basal foi realizado da mesma forma, porém a adrenalina não foi adicionada no meio de incubação. A concentração de glicerol liberado no meio de incubação foi determinada enzimaticamente usando um kit comercial (R-Biopharm®). Os resultados foram expressos como mg de glicerol liberado no meio/grama de tecido.

## 2.6 CONVERSÃO DE GLICOSE EM $\text{CO}_2$

Aproximadamente 200 mg de tecido foram colocados em frascos com tampa de borracha contendo 1 mL de KRB 1% BSA pH 7,4, 0,10  $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM glicose. As tampas de borracha foram acopladas a vidros em formato de “J” com um poço onde foi colocado papel 3MM para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose. Os tecidos foram aerados com carbogênio ( $\text{O}_2$ :  $\text{CO}_2$ , 95:5% v/v) por 30 segundos e as tampas, posteriormente, fechadas e vedadas com parafilme. Os tecidos foram incubados durante 120 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante em banho metabólico. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se nos poços 0,25 mL de NaOH 2M e 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  formado. Após este

período, foram retirados os vidros em formato de “J” e colocados em frascos de contagem com 10 mL do líquido de cintilação [Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do  $^{14}\text{CO}_2$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de  $^{14}\text{C}$ -glicose incorporados em  $^{14}\text{CO}_2$  por mg de tecido por hora (COZER et al., 2016; TORRES et al., 2001).

## 2.7 CONVERSÃO DE GLICOSE EM LIPÍDIOS

Os tecidos foram coletados e colocados em KRB gelada. Em seguida, transferidos para tubos com meio de incubação contendo 1 mL de KRB 1% BSA pH 7,4, 0,10 $\mu\text{Ci}$  de [U- $^{14}\text{C}$ ]-glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM glicose. As amostras forem aeradas com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5% v/v), e os tubos fechados. Após incubação a 37°C por uma hora, as amostras foram lavadas com KRB e homogeneizadas em homogeneizador *Potter* com clorofórmio: metanol na proporção de 2:1. O homogeneizado foi então transferido para um tubo contendo solução de clorofórmio- metanol (2:1), e agitado no vórtex para solubilizar o precipitado e em seguida centrifugado por 10 min a 800g. Após a centrifugação, a fração lipídica foi transferida para tubos específicos para contagem de radioatividade e após a completa evaporação acrescentou-se 2 mL de líquido de cintilação [Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. Procedeu-se a contagem da radioatividade incorporada no contador LKB-Wallac com 95%. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de  $^{14}\text{C}$ -glicose incorporados em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos por mg de tecido por hora (BUENO; AZZOLIN; PERRY, 1994; COZER et al., 2016; DOS SANTOS FAGUNDES, 2001).

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos resultados foi analisada utilizando-se o teste de Levene. Os dados que possuíam distribuição normal comparados utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) complementada pelo pós teste de Bonferroni. Aqueles que não apresentavam distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. A comparação entre a lipólise basal e a lipólise estimulada por

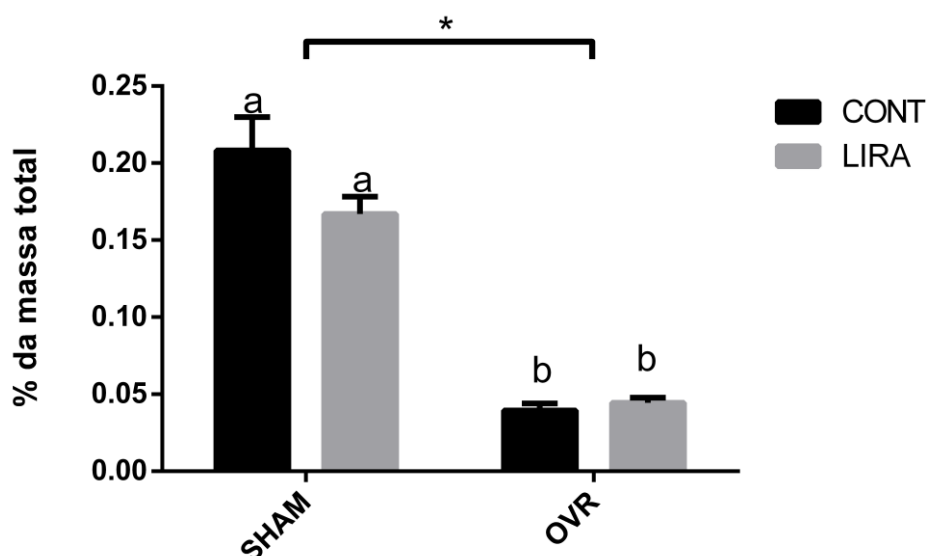
adrenalina foi analisada com teste *t* pareado. As análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 6.01

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ÚTERO

As ratas que foram ovariectomizadas (OVR) apresentaram redução significativa ( $p < 0,0001$ ) na massa percentual do útero quando comparadas às *sham*. O tratamento com liraglutida não interferiu neste parâmetro (Figura 5).

**Figura 5: Efeitos da ovariectomia e do tratamento com liraglutida na massa do útero de ratas.** As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*.

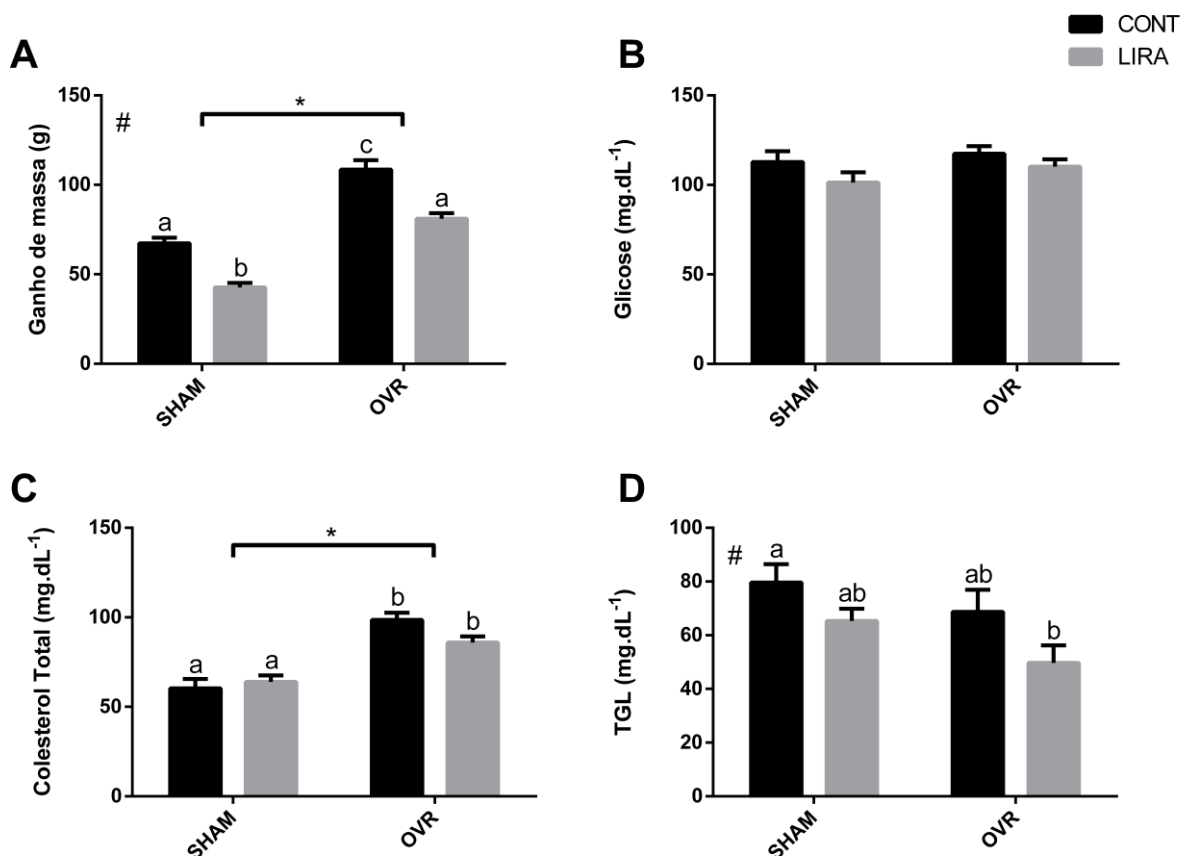


#### 3.2 GANHO DE MASSA

As fêmeas castradas tiveram um ganho de massa durante o tratamento significativamente ( $p < 0,0001$ ) maior do que as *sham*. As ratas que receberam o

tratamento com liraglutida tiveram um aumento de massa menor do que as controle ( $p < 0,0001$ ), sendo que o menor ganho foi observado no grupo *sham* lira, e o maior no grupo OVR controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 6A).

**Figura 6: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida em fêmeas.** (A) ganho de massa dos animais, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (B) na glicemia, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (C) na colesterolemia “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (D) na trigliceridemia, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*; # representa diferença entre tratadas com liraglutida e as controle; as letras representam diferença entre os grupos.



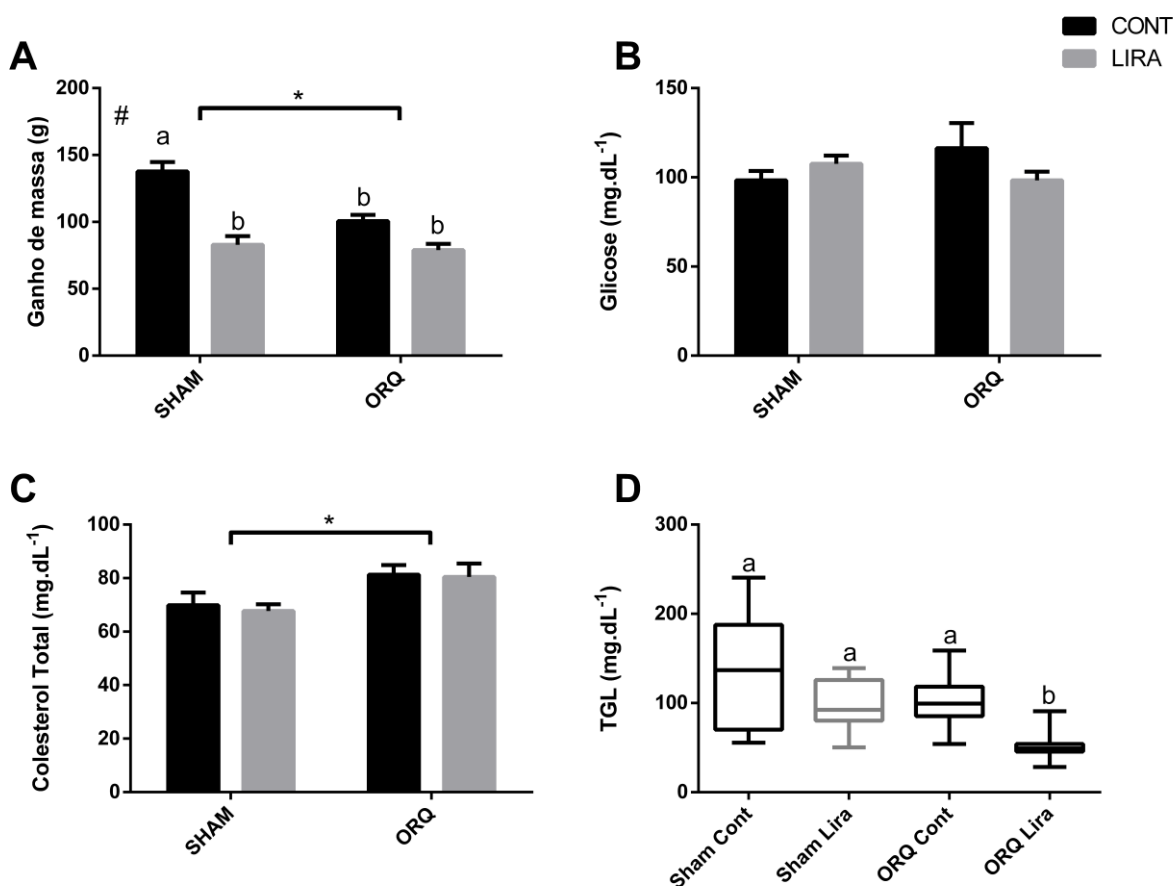
Nos machos o tratamento com liraglutida também reduziu o ganho de massa em comparação com os animais controle ( $p < 0,0001$ ). Porém diferentemente das fêmeas, a castração diminuiu o ganho de massa em relação aos animais *sham* ( $p < 0,01$ ). Os ratos do grupo *sham* controle tiveram um ganho de massa significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os animais dos outros grupos (Figura 7A).



### Figura 7: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida em machos.

(A) ganho de massa dos animais, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (B) na glicemia, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (C) na colesterolemia, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (D) na trigliceridemia, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos).

Em “D” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castrados e *sham*; # representa diferença entre tratados com liraglutida e os controle; as letras representam diferença entre os grupos



### 3.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO

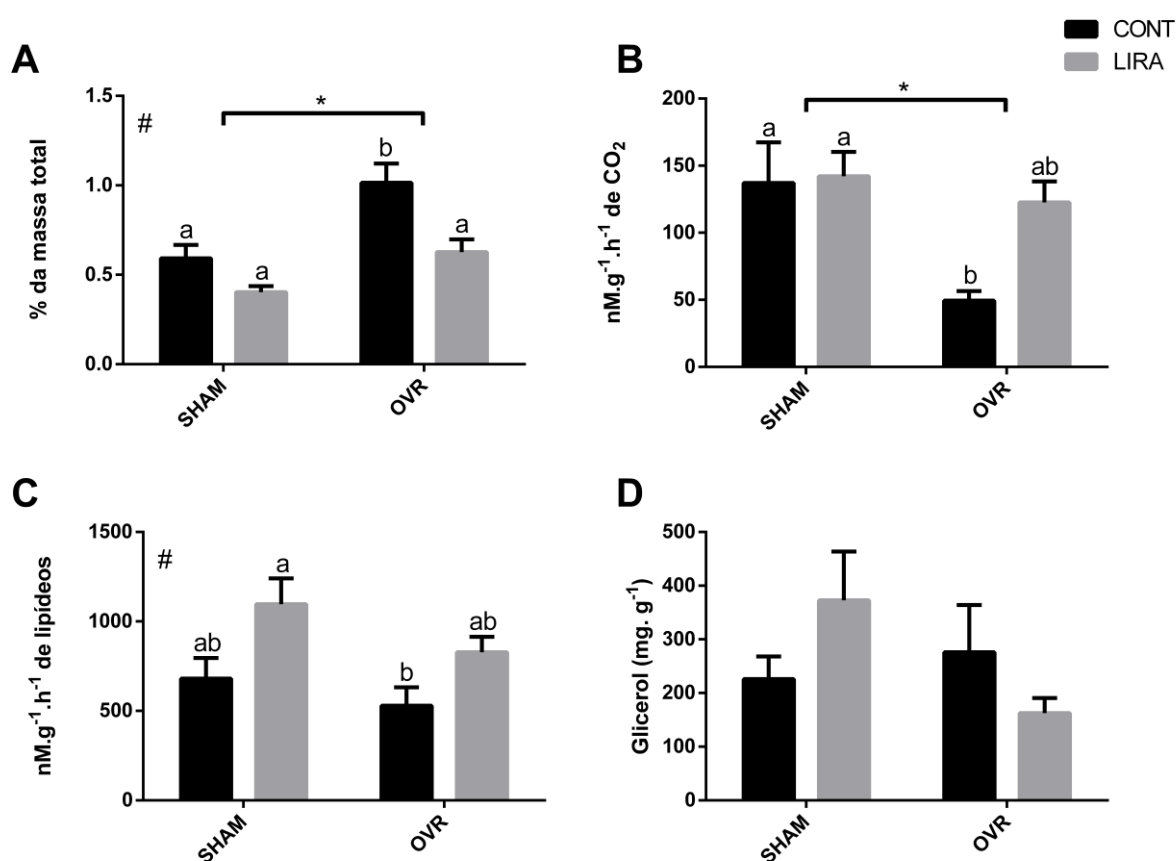
A glicemia dos animais não variou de forma significativa com a castração ou com o tratamento, em nenhum dos sexos (Figuras 6B e 7B). Já a concentração de triglicerídeos plasmáticos foi menor ( $p < 0,01$ ) nos machos orquiectomizados (ORQ)

em relação aos controles (*sham* e ORQ) (Figura 7D). Nas fêmeas ovariectomizadas (OVR) tratadas, a trigliceridemia foi menor ( $p < 0,05$ ) do que nas controle *sham* (Figura 6D). A concentração de colesterol foi maior nos animais castrados (tanto machos quanto fêmeas) ( $p < 0,01$ ) e não houve efeito do tratamento em nenhum dos sexos (Figuras 6C e 7C).

### 3.4 TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL – FEMÊAS

A ovariectomia aumentou de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a massa percentual do TABrt em relação aos *sham*, enquanto os animais tratados tiveram um ganho menor que os controles ( $p < 0,001$ ). O ganho de massa dos animais do grupo OVR controle foi maior ( $p < 0,01$ ) do que dos grupos *sham*, tratados ou não, enquanto o ganho dos animais OVR lira foi igual ao dos *sham*, sendo diferente do OVR controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 8A). A formação de  $^{14}\text{CO}_2$  foi menor ( $p < 0,05$ ) nos animais castrados do que nos *sham*. A oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi menor ( $p < 0,05$ ) no grupo OVR controle em relação aos *sham*, já no grupo OVR lira ela foi igual tanto aos *sham* quanto ao OVR controle (Figura 8B). A formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi maior ( $p < 0,01$ ) nos animais tratados com liraglutida do que nos controles, mas não foi alterada pela castração. Ela foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) no grupo *sham* lira do que no OVR controle (Figura 8C). A atividade lipolítica basal do TABrt não foi alterada pela ovariectomia nem pelo nem tratamento (Figura 8D), assim como a incubação com adrenalina não teve efeito (Tabela 1).

**Figura 8: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABrt).** (A) percentual do TABrt na massa total, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 6 e 7 por grupo; (C) incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, “n” amostral entre 5 e 6 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*; # representa diferença entre tratadas com liraglutida e as controle; as letras representam diferença entre os grupos.

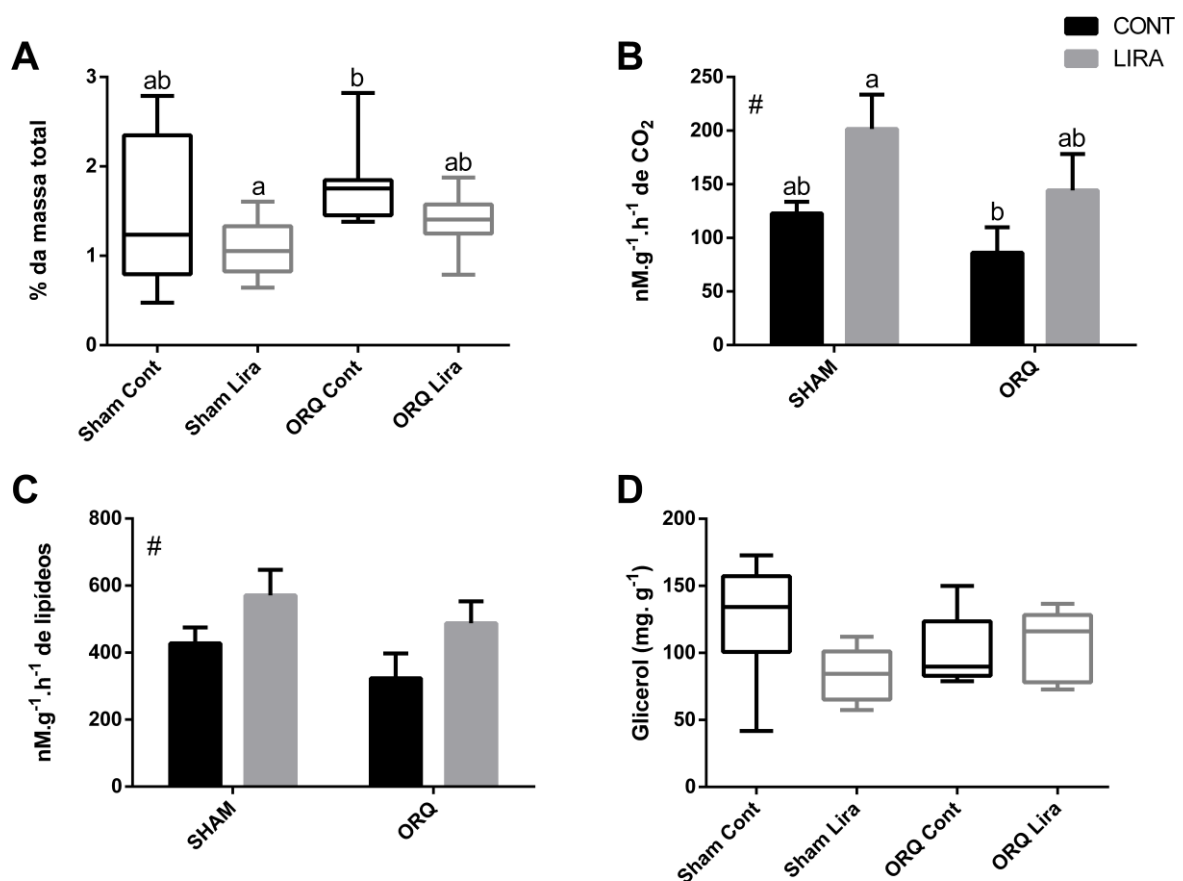


### 3.5 TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL – MACHOS

A massa percentual do TABrt foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) nos animais tratados do que nos controles, já a orquiectomia não alterou este parâmetro. O percentual da massa total representado pelo TABrt foi significativamente menor ( $p$

< 0,01) nos ratos do grupo *sham* lira do que nos do grupo ORQ controle (Figura 9A). O tratamento com liraglutida aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a formação de  $^{14}\text{CO}_2$ , em relação aos animais tratados. No grupo *sham* lira foi observado maior ( $p < 0,05$ ) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  do que no grupo ORQ controle. A castração não alterou este parâmetro de forma significativa (Figura 9B). A formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com liraglutida. Não foram vistas alterações relacionadas a castração, nem diferenças entre os grupos (Figura 9C). A lipólise basal no TABrt não foi significativamente alterada pelo tratamento nem pela orquiectomia (Figura 9D), porém quando estimulado com adrenalina, apenas os tecidos dos animais tratados tiveram aumento ( $p < 0,05$ ) na liberação de glicerol (Tabela 2).

**Figura 9: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABrt).** (A) percentual do TABrt na massa total, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 7 e 8 por grupo; (C) incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, n = “n” amostral entre 8 e 11 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, n = “n” amostral entre 5 e 7 por grupo. As colunas e as barras representam a media  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos). Em “A” e “D” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartilico (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castrados e *sham*; # representa diferença entre tratados com liraglutida e os controle; as letras representam diferença entre os grupos.



**Tabela 1: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida na lipólise basal e estimulada por adrenalina em diferentes depósitos de tecido adiposo branco.** Glicerol (mg/g) liberado para o meio de incubação (“n” amostral entre 5 e 6 por grupo). \* representa diferença significativa entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos (teste t pareado) quando  $p < 0,05$ .

Tratamento	Tecido								
	Basal	TABrt Adr	<i>p</i>	Basal	TABpr Adr	<i>p</i>	Basal	TABg Adr	<i>p</i>
<b>Sham</b>									
Cont	226.16 ± 41.85	241.3 ± 43.20	0.437	309.37 ± 66.30	458.28 ± 91.36	0.072	102.4 ± 23.23	198.55 ± 29.21	0.005*
Lira	372.83 ± 90.55	431.75 ± 88.22	0.343	520.17 ± 213.76	523.84 ± 155.85	0.970	180.39 ± 41.77	253.81 ± 64.29	0.051
<b>OVR</b>									
Cont	275.89 ± 87.96	183.87 ± 69.99	0.137	470.05 ± 107.98	548.53 ± 132.01	0.144	150.48 ± 32.42	188.11 ± 36.99	0.218
Lira	242.00 ± 82.32	225.40 ± 61.00	0.714	168.31 ± 61.2	271.35 ± 54.34	0.003*	157.08 ± 51.92	302.12 ± 48.22	0.024*

**Tabela 2: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida na lipólise basal e estimulada por adrenalina em diferentes depósitos de tecido adiposo branco.** Glicerol (mg/g) liberado para o meio de incubação (“n” amostral entre 5 e 6 por grupo). \* representa diferença significativa entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos (teste t pareado) quando  $p < 0,05$ .

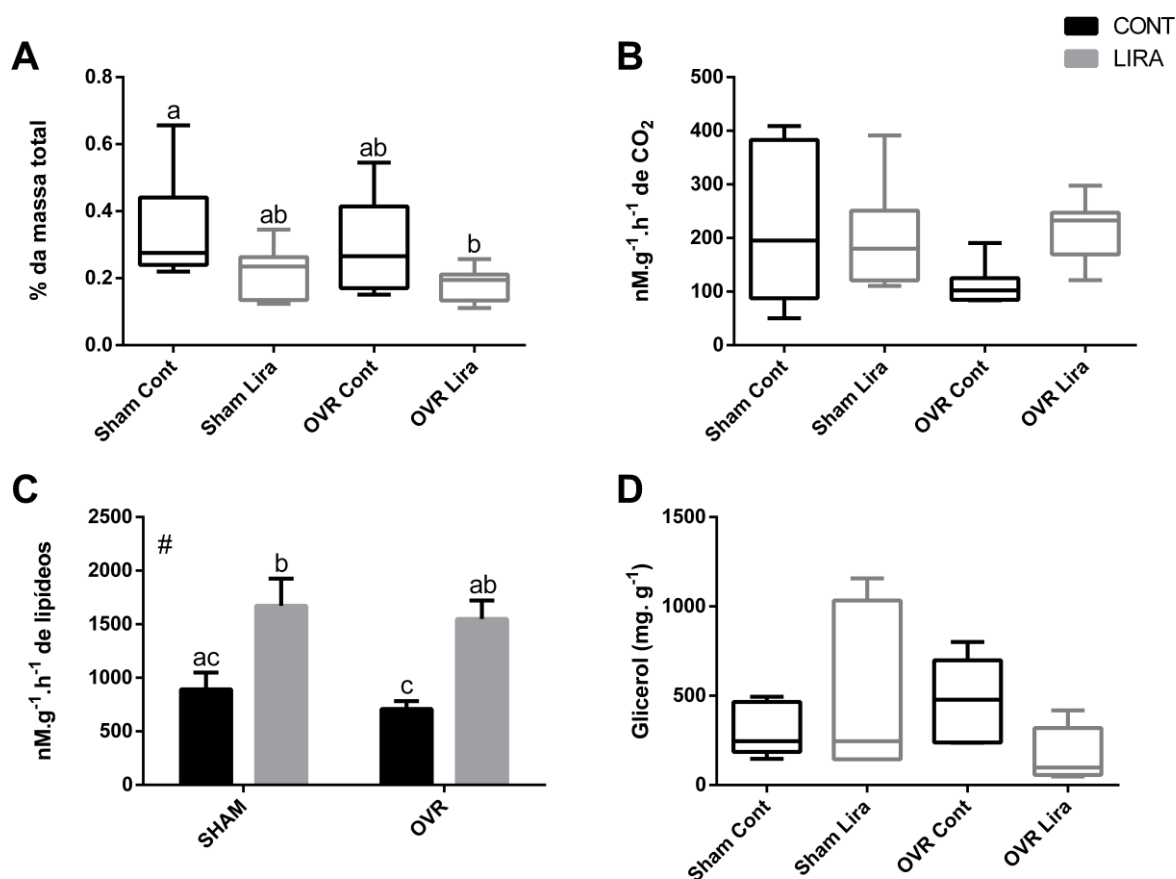
Tratamento	Tecido								
	Basal	TABrt Adr	$p$	Basal	TABpr Adr	$p$	Basal	TABg Adr	$p$
<b>Sham</b>									
Cont	121.71 ± 16.41	150.16 ± 15.64	0.147	75.24 ± 5.64	163.93 ± 18.74	0.004*	91.13 ± 5.53	96.66 ± 11.5	0.624
Lira	83.42 ± 9.08	137.92 ± 21.59	0.023*	33.43 ± 6.87	113.79 ± 12.95	0.008*	74.56 ± 7.41	98.58 ± 12.78	0.042*
<b>ORQ</b>									
Cont	100.51 ± 12.68	294.19 ± 99.69	0.137	122.93 ± 32.55	125.87 ± 9.06	0.931	117.49 ± 9.84	106.19 ± 9.81	0.047*
Lira	107.79 ± 10.54	171.63 ± 24.96	0.048*	71.8 ± 1.63	120.62 ± 11.15	0.008*	123.53 ± 15.98	102.86 ± 11.25	0.092

### 3.6 TECIDO ADIPOSEO BRANCO PERIRRENAL – FEMÊAS

O tratamento com liraglutida reduziu ( $p < 0,05$ ) a massa do TABpr, e a ovariectomia não a alterou de forma significativa. Nas ratas do grupo OVR lira a massa foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que nas do grupo *sham* controle (Figura 10A). A incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{CO}_2$  não foi modificada pela castração nem pelo tratamento, e não houve variações entre os grupos (Figura 10B). Nos animais tratados com liraglutida houve maior ( $p < 0,001$ ) formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose do que nos controles, porém a formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios não foi alterada pela ovariectomia. O grupo *sham* lira foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os dois grupos controle, enquanto o OVR lira apenas foi maior que o OVR controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C). Não houve diferença significativa entre os grupos controle *sham* e OVR. No TABpr de fêmeas tanto a castração quanto o tratamento não modificaram a lipólise basal (Figura 10D). Quando estimulados com adrenalina apenas no grupo OVR lira houve aumento ( $p < 0,01$ ) na liberação de glicerol para o meio de incubação (Tabela 1).



**Figura 10: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco perirrenal (TABpr).** (A) percentual do TABpr na massa total, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de U- $^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 6 e 7 por grupo; (C) incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 7 e 10 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, “n” amostral entre 5 e 6 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos). Em “A”, “B” e “D” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*; # representa diferença entre tratadas com liraglutida e as controle; as letras representam diferença entre os grupos.

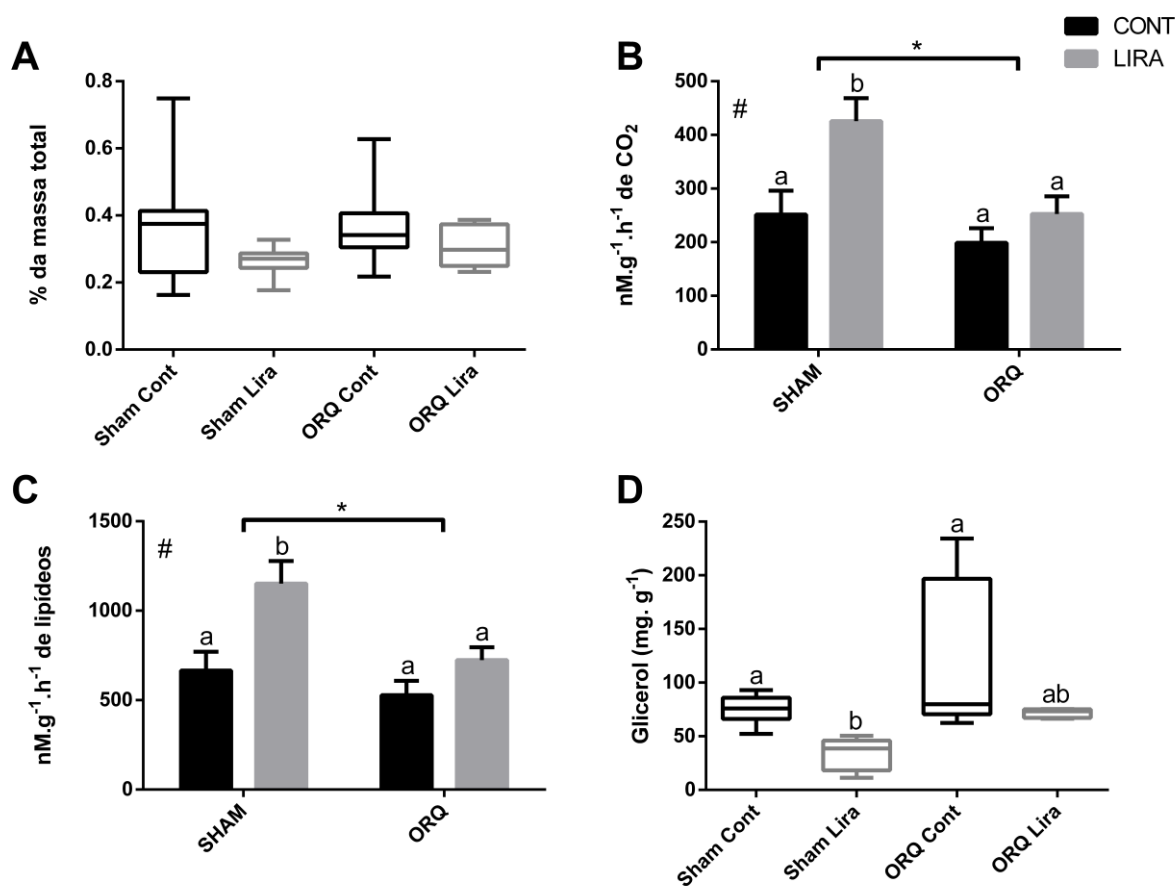


### 3.7 TECIDO ADIPOSEO BRANCO PERIRRENAL – MACHOS

O percentual que a massa do TABpr representa não foi alterado pela orquiectomia, porém foi reduzido de forma significativa pelo tratamento com

liraglutida. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 11A). A incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{CO}_2$  foi reduzida ( $p < 0,01$ ) pela castração e aumentada pelo tratamento ( $p < 0,01$ ). O grupo *sham* lira foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que todos os outros (Figura 11B). A formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose seguiu exatamente o mesmo perfil que a oxidação deste substrato. Houve aumento ( $p < 0,01$ ) induzido pelo tratamento, redução nos animais orquiectomizados, e o grupo lira *sham* também foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que os demais (Figura 11C). A orquiectomia aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a liberação de glicerol para o meio de incubação, enquanto o tratamento com liraglutida diminuiu ( $p < 0,05$ ) esta liberação (Figura 11D). De todos os grupos o único que não apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na lipólise quando incubado com adrenalina foi o ORQ controle (Tabela 2).

**Figura 11: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco perirrenal (TABpr).** (A) percentual do TABpr na massa total, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de U- $^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 7 e 8 por grupo; (C) incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, “n” amostral entre 5 e 6 por grupo. As colunas e as barras representam a media  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos). Em “A” e “D” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castrados e *sham*; # representa diferença entre tratados com liraglutida e os controle; as letras representam diferença entre os grupos.

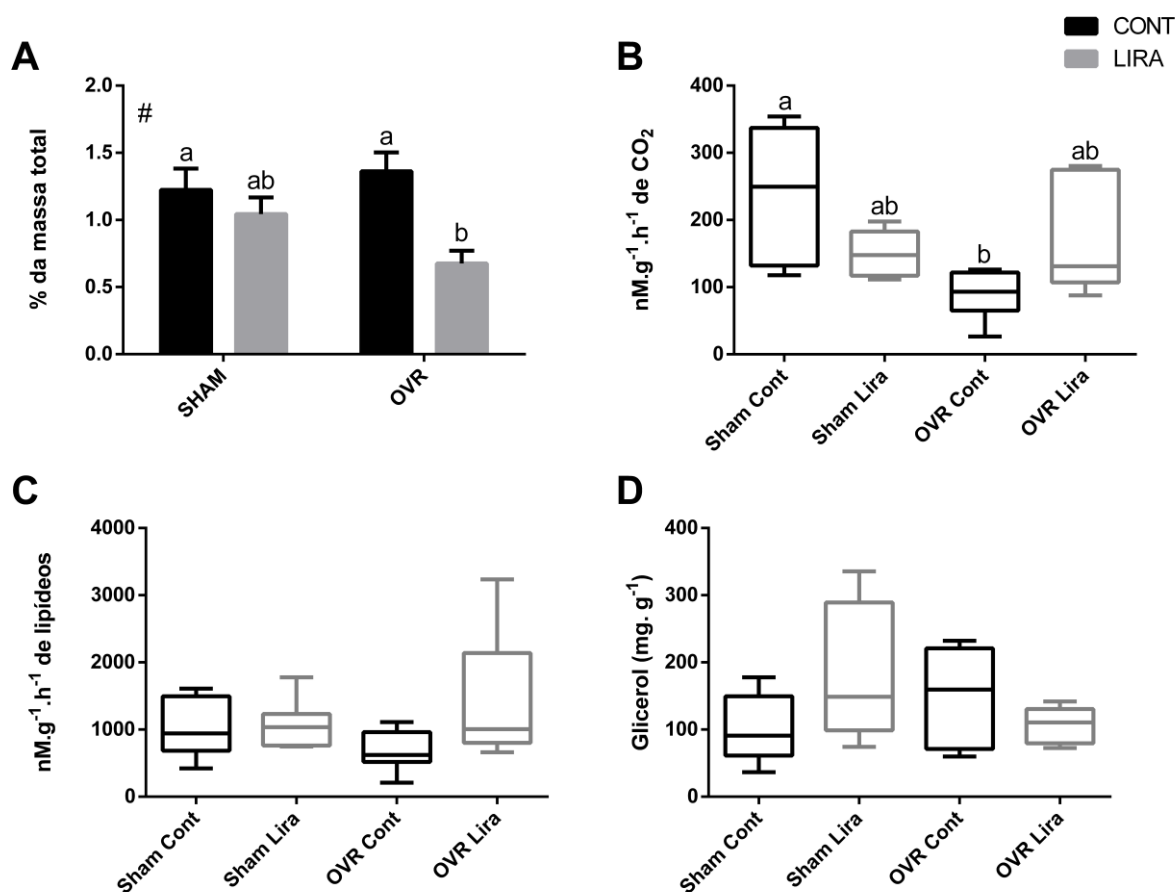


### 3.8 TECIDO ADIPOSEO BRANCO GONADAL – FÊMEAS

Nas ratas tratadas com liraglutida a massa do TABg foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) do que nas controle, enquanto a castração não induziu alterações.

Os grupos controle *sham* e OVR foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que o grupo OVR lira (Figura 12A). A formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) nas ratas castradas em relação às *sham*, mas não foi modificada pelo tratamento. Entretanto, enquanto o grupo OVR controle é significativamente menor ( $p < 0,01$ ) do que o grupo *sham* controle, o grupo OVR lira não é diferente de nenhum deles (Figura 12B). A formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir do mesmo substrato não foi modificada pela ovariectomia nem pelo tratamento, e também não variou entre os grupos (Figura 12C). A lipólise basal no TABg não foi significativamente alterada pelo tratamento nem pela ovariectomia (Figura 12D), porém quando estimulado com adrenalina, apenas os grupos *sham* controle e OVR lira tiveram aumento ( $p < 0,05$ ) de liberação de glicerol para o meio (Tabela 1).

**Figura 12: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco gonadal (TABg).** (A) percentual do TABg na massa total, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de U- $^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 6 e 7 por grupo; (C) incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, “n” amostral entre 5 e 6 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos). Em “B”, “C” e “D” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*; # representa diferença entre tratadas com liraglutida e as controle; as letras representam diferença entre os grupos.

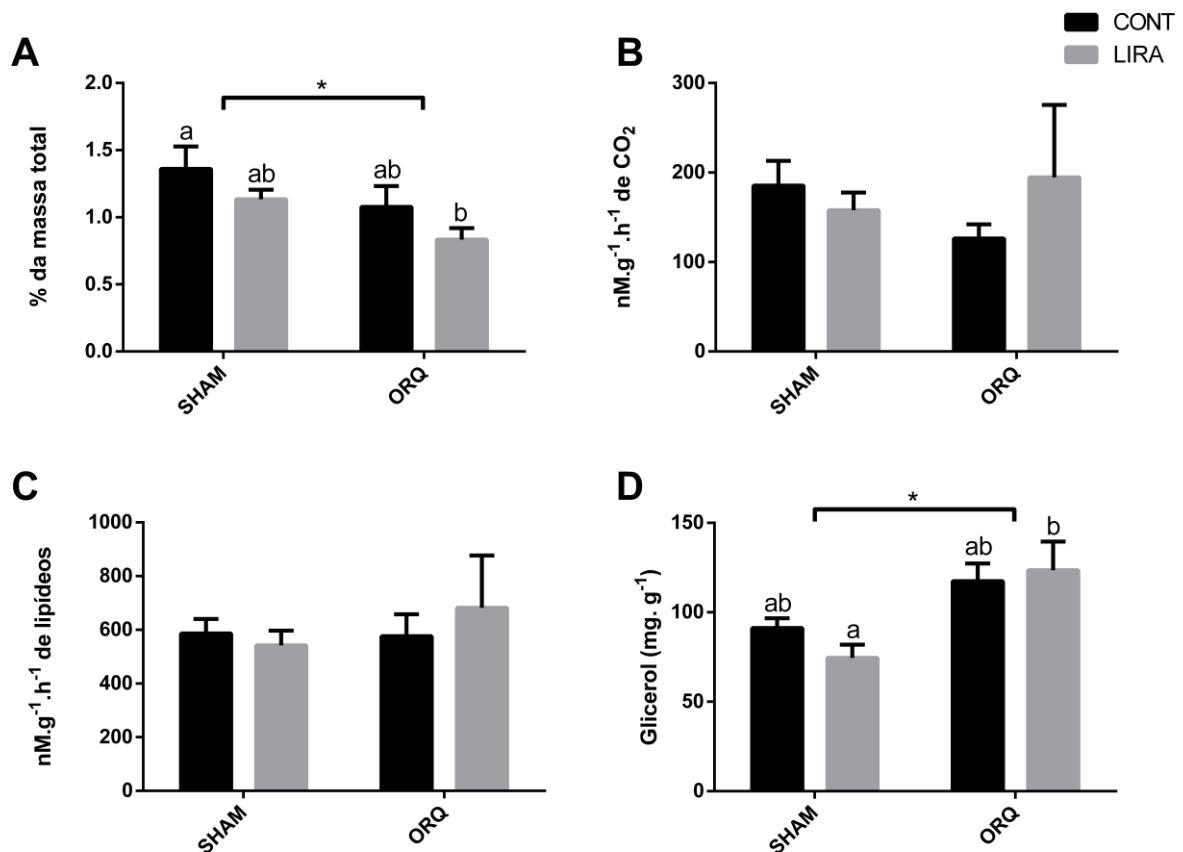


### 3.9 TECIDO ADIPOSEO BRANCO GONADAL – MACHOS

A massa do TABg dos ratos castrados foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que dos *sham*, mas o tratamento liraglutida não modificou-a. Porém enquanto o

grupo OVR controle é igual os grupos *sham*, o OVR lira é significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o grupo *sham* controle (Figura 13A). Tanto a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  quanto de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose não foram modificadas nem pela orquiectomia nem pelo tratamento, assim como não houve diferença entre os grupos (Figura 13B e 13C). A lipólise basal foi maior nos animais castrados do que nos *sham* ( $p < 0,01$ ) e o grupo ORQ lira foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que *sham* lira (Figura 13D). A incubação na presença de adrenalina causou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na liberação de glicerol no grupo *sham* lira e redução ( $p < 0,05$ ) no grupo ORQ controle (Tabela 2).

**Figura 13: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo branco gonadal (TABg).** (A) percentual do TABg na massa total, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de U- $^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 7 e 8 por grupo; (C) incorporação de U- $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (D) glicerol liberado para o meio de incubação, “n” amostral entre 5 e 7 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castrados e *sham*; # representa diferença entre tratados com liraglutida e os controle; as letras representam diferença entre os grupos.



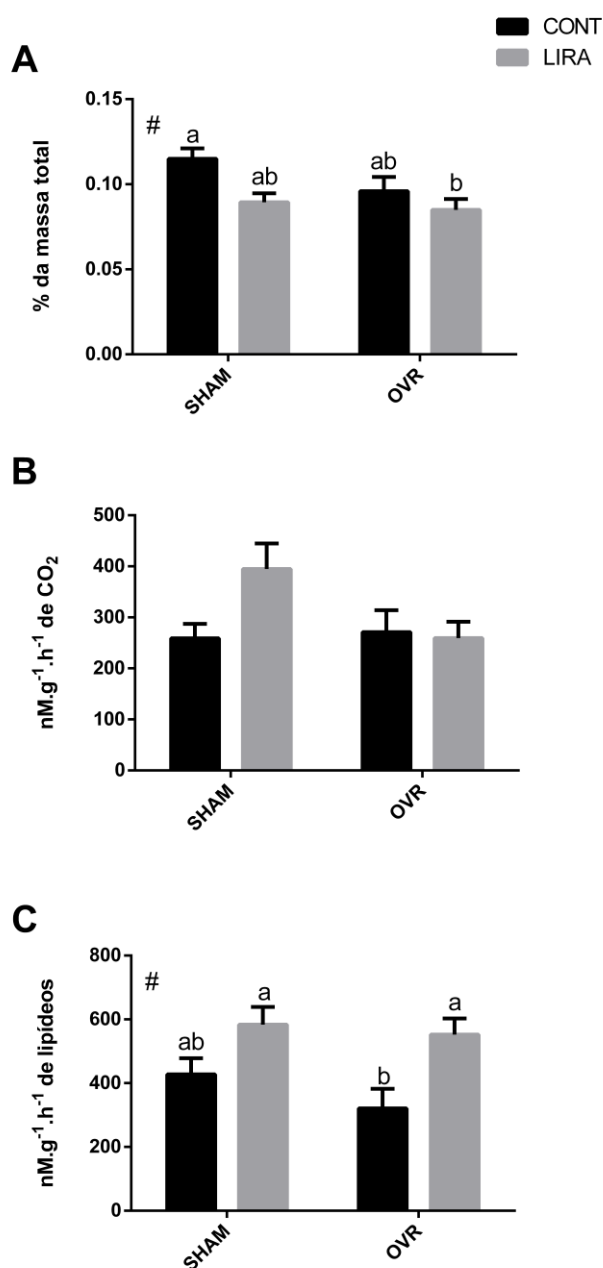
### 3.10. TECIDO ADIPOSEO MARROM – FEMÊAS

A ovariectomia não alterou de forma significativa a massa percentual do TAM nas fêmeas, porém nas ratas tratadas com liraglutida houve redução deste parâmetro ( $p < 0,05$ ). A massa do TAM nos animais do grupo OVR lira foi

significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que no grupo *sham* controle (Figura 14A). A formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose não foi alterada pela castração nem pelo tratamento (Figura 14B). A síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídeos aumentou ( $p < 0,01$ ) nas ratas tratadas em relação às controle, embora não tenha sido alterada pela ovariectomia (Figura 14C).



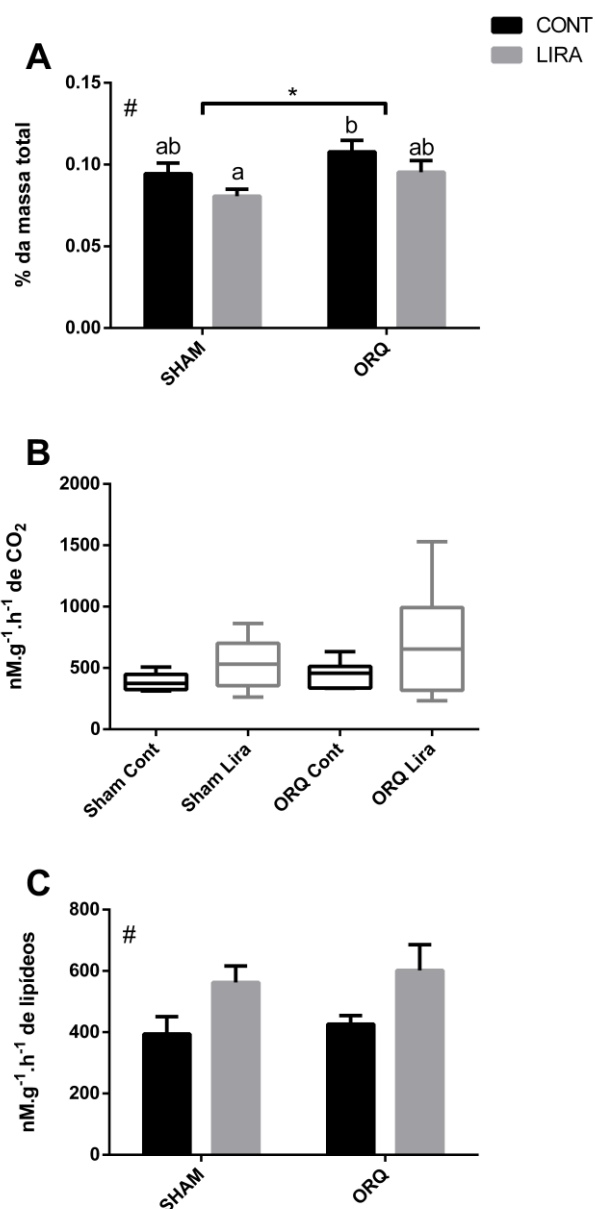
**Figura 14: Efeito da ovariectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM).** (A) percentual do TAM na massa total, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 6 e 7 por grupo; (C) incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 8 e 10 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castradas e *sham*; # representa diferença entre tratadas com liraglutida e as controle; as letras representam diferença entre os grupos.



### 3.11. TECIDO ADIPOSEO MARROM – MACHOS

A castração nos machos aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a massa percentual do TAM, enquanto o tratamento com liraglutida diminuiu-a ( $p < 0,05$ ). O grupo ORQ controle foi significativamente maior que o grupo *sham* tratado ( $p < 0,05$ ) (Figura 15A). As incorporações de  $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{CO}_2$  (Figura 15B) e em  $^{14}\text{C}$ -lipídios (Figura 15C) não foram afetadas pela orquiectomia, porém o tratamento fez com que apenas a lipogênese aumentasse ( $p < 0,01$ ).

**Figura 15: Efeito da orquiectomia e do tratamento com liraglutida no metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM).** (A) percentual do TAM na massa total, “n” amostral entre 9 e 11 por grupo; (B) formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose, “n” amostral entre 7 e 8 por grupo; (C) incorporação de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{C}$ -lipídeos, “n” amostral entre 9 e 10 por grupo. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  o erro padrão (resultados homogêneos). Em “B” os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartílico (resultados não homogêneos). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . \* representa diferença entre castrados e *sham*; # representa diferença entre tratados com liraglutida e os controle; as letras representam diferença entre os grupos.



#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo foram confirmados resultados de trabalhos anteriores demonstrando que o tratamento com análogos do GLP1 (aqui a liraglutida), reduz o ganho de massa dos animais sem alterar a glicemia de indivíduos normoglicêmicos (LOCKIE et al., 2012; TOMAS et al., 2015). Estes resultados podem ser explicados por efeitos do GLP1 que já estão muito bem caracterizados. Diversos estudos já demonstraram que a administração de agonistas do GLP1R (ou inibidores da enzima que o degrada, a DPP4), causam redução no consumo alimentar, explicando facilmente a redução no ganho de massa dos animais (GELONEZE; DE LIMA-JÚNIOR; VELLOSO, 2017; NOGUEIRAS et al., 2009; SECHER et al., 2014). É importante ser ressaltado que este efeito pode ser obtido tanto por administração intra-cérebro-ventricular, como subcutânea (NADKARNI; CHEPURNY; GEORGE G. HOLZ, 2014; SECHER et al., 2014).

A ação do GLP1 que está melhor descrita, é o estímulo a liberação de insulina induzida pela glicose nas células  $\beta$  pancreáticas (JONES et al., 2018). Nestas células a ativação do GLP1R (um receptor acoplado a proteína G excitatória) desencadeia uma série de reações que levam ao aumento da concentração intracelular de AMPc e a ativação da PKA. Esta por sua vez age no canal de  $K^+$  dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ) facilitando seu fechamento. Com isso promove o aumento da concentração intracelular de  $Ca^{++}$  e a liberação de insulina (JONES et al., 2018). Contudo se a concentração de ATP (dependente da captação de glicose) for baixa, não ocorre o fechamento do  $K_{ATP}$ , assim o GLP1 depende da glicose para estimular a liberação de insulina (NADKARNI; CHEPURNY; GEORGE G. HOLZ, 2014). Em função desta característica o GLP1 tem efeito hipoglicemiante apenas em indivíduos hiperglicêmicos (NAUCK; MEIER, 2017). Isto torna-o, e seus análogos, bastante seguros no tratamento da DM2, especialmente quando comparado à medicamentos mais difundidos, que apresentam mais riscos, podendo causar hipoglicemia (BODMER et al., 2008).

O efeito da castração nas fêmeas também foi similar ao que é descrito na literatura (LEENERS et al., 2017; XU; ANDE; MISHRA, 2018). Foi encontrada uma redução muito grande na massa do útero de todas as ratas submetidas a ovariectomia, o que confirma a efetividade da técnica realizada. O ganho de massa total destes animais foi superior aos da ratas *sham*, o que já era esperado (XU;

ANDE; MISHRA, 2018). Entretanto, diferente do que normalmente é encontrado, os machos castrados tiveram um ganho de massa inferior aqueles que não foram submetidos a orquiectomia. Este dado é bastante interessante, pois a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura relata o aumento na massa dos animais castrados (LAMM; CHIDAKEL; BANSAL, 2016; XU; ANDE; MISHRA, 2018). Neste estudo este resultado não apenas não foi confirmado, como ocorreu o inverso, estes animais tiveram um menor ganho de massa. Todavia é importante notar que embora a massa total dos ratos tenha sido menor, não houve redução no percentual representado pelos depósitos de tecido adiposo avaliados, um indicio de que não houve aumento real de perda de gordura. Por outro lado, os andrógenos tem notoriamente um efeito anabólico sobre a musculatura esquelética (LAURETTA et al., 2018). A perda destes hormônios após a castração pode ter influenciado de forma relevante o desenvolvimento da musculatura dos animais, levando ao menor ganho de massa observado. Wang et al. (2017a) em um trabalho com suínos castrados, observaram que estes animais possuem menor concentração sérica de hormônio do crescimento (GH). Este fato, caso também ocorra em ratos, ajudaria a explicar o resultado encontrado neste estudo.

Em relação aos lipídeos plasmáticos a concentração de colesterol total foi maior nos animais castrados, tanto machos quanto fêmeas, o que está de acordo com estudos anteriores (LEE; KANG; KIM, 2008; WANG; ZHU, 2017). O tratamento com liraglutida não alterou a colesterolemia, assim como já relatado anteriormente (DECARA et al., 2016; PANJWANI et al., 2012). Já a concentração de triglicerídeos não foi afetada pela castração, porém o tratamento reduziu a trigliceridemia nos machos e nas fêmeas. Este resultado também está de acordo com o encontrado em trabalhos anteriores (DECARA et al., 2016; NAUCK; MEIER, 2017). O aumento na secreção de insulina induzido pelo GLP1 pode explicar esta redução. Entre os efeitos descritos da insulina estão o aumento da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo. Esta enzima hidrolisa triglicerídeos de lipoproteínas circulantes, liberando ácidos graxos livres. A insulina promove também a captação destes ácidos graxos livres e sua estocagem no tecido adiposo (BJORNSTAD; ECKEL, 2018). O aumento da lipogênese em animais tratados, visto em depósitos de tecido adiposo perirrenal e retroperitoneal neste trabalho, corrobora esta hipótese.

Em sua revisão bibliográfica sobre os diferentes depósitos de tecido adiposo, FRIED; LEE e KARASTERGIU, (2015) descrevem as novas evidências demonstrando que os depósitos de TAB em diferentes regiões do corpo possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas distintas. E que os diferentes depósitos ainda apresentam diferenças em relação aos sexos. A castração aumentou a massa percentual do TABrt em machos e em fêmeas, o que está de acordo com o esperado levando-se em conta as alterações no ganho de massa total destes animais e os relatos presentes na literatura (CHEN et al., 2017; COLIN et al., 2016). O tratamento com liraglutida diminuiu a massa de TABrt em fêmeas castradas e em machos *sham*, sugerindo diferenças sexuais no efeito do liraglutida. Em camundongos, uma semana após a ovariectomia, os níveis plasmáticos de insulina e GLP1 diminuem enquanto os de glucagon aumentam (HANDGRAAF et al., 2018). Nesse mesmo trabalho, a concentração de insulina e GLP1 aumentou e a de glucagon diminuiu em células  $\alpha$  e  $\beta$  pancreáticas. O tratamento com estradiol (E2), reverteu esses efeitos pois aumentou a secreção de GLP1 tanto pelas células  $\alpha$  pancreáticas como pelas células L intestinais (HANDGRAAF et al., 2018). Os efeitos do E2 nas células L intestinais estão relacionados aos receptores ER $\beta$  enquanto nas células  $\beta$  pancreáticas, os efeitos do E2 foram mediados pelos três tipos de ER (ER $\beta$ , ER $\alpha$  e GPER) (HANDGRAAF et al., 2018).

A incorporação de glicose em CO<sub>2</sub> e em lipídeos no TABrt foi inibida pela castração e estimulada pelo tratamento em ambos os sexos. Considerando que a insulina estimula a oxidação de glicose e a lipogênese, esses resultados podem estar relacionados à resistência à insulina causada pela castração, já descrita na literatura. Assim, ao elevar os níveis de insulina, o tratamento com GLP1 parece reverter os efeitos da castração sobre o metabolismo de glicose nesse tecido. Embora uma possível redução no consumo alimentar (efeito do GLP1 muito bem caracterizado) possa explicar a redução de depósitos de tecido adiposo, o aumento na oxidação de glicose no TABrt visto neste estudo indica um provável aumento no consumo energético neste tecido. Este aumento ajuda a explicar a depleção de reserva energética, mesmo em uma situação em que a síntese de lipídeos a partir de glicose está aumentada, sendo que, este aumento provavelmente seja devido a maior liberação de insulina que possivelmente ocorreu nestes animais.

Apesar de a insulina ser um importante agente anti-lipolítico (CHAKRABARTI; V. KANDROR, 2011), a lipólise basal no TABrt não foi alterada pela castração nem pelo tratamento com liraglutida tanto em machos como em fêmeas. A administração de adrenalina, clássico agente lipolítico (COZER et al., 2016; RUOHONEN et al., 2018), aumentou a lipólise em machos *sham* e ORV tratados com liraglutida mas não alterou a lipólise em fêmeas, sugerindo uma interação entre os efeitos da adrenalina e do liraglutida nos machos. Além da presença de hormônios que possam estimular ou inibir a lipólise, a população de receptores hormonais, especialmente receptores adrenérgicos, na membrana celular é fundamental para o controle da lipólise (RUOHONEN et al., 2018). Enquanto a ativação de receptores  $\beta$  adrenérgicos aumenta os níveis de AMPc e estimula a lipólise, a ativação dos  $\alpha$  tem efeito oposto (RUOHONEN et al., 2018). Os diferentes depósitos de tecido adiposo apresentam diferentes populações de receptores adrenérgicos e não respondem da mesma forma aos mesmos estímulos (FRIED; LEE; KARASTERGIU, 2015). Por sua via de sinalização culminar no aumento da concentração de AMPc e ativação da PKA é plausível esperar-se que a ativação do GLP1R estimule a lipólise, algo que não foi visto neste trabalho, e aparece de forma contraditória na literatura (EL BEKAY et al., 2016; SÖRHEDE WINZELL; AHRÉN, 2004; VENDRELL et al., 2011). Portanto, a interação entre GLP1 e adrenalina parece promover um aumento mais efetivo nos níveis de AMPc, favorecendo a lipólise. O tratamento com liraglutida e CL316243 (agonista  $\beta$ 3 adrenérgico) em ratos machos promoveu alterações tecido-específicas favoráveis ao tratamento da obesidade (DECARA et al., 2018).

O ganho de massa do TABpr não variou com a castração em nenhum dos sexos. O tratamento com liraglutida reduziu este ganho apenas nas fêmeas. Já a oxidação de glicose não variou nas fêmeas, porém foi reduzida pela castração e estimulada pelo tratamento nos machos. A lipogênese aumentou nos animais tratados, tanto machos quanto fêmeas, enquanto a castração reduziu este parâmetro apenas nos machos. A lipólise basal não foi alterada nas fêmeas, porém nos machos ela foi menor no grupo *sham* lira em relação aos controles. O estímulo com adrenalina causou aumento na liberação de glicerol apenas no grupo OVR lira nas fêmeas, enquanto nos machos este aumento ocorreu em todos os grupos menos no ORQ controle. Isto indica que apesar de o tratamento com liraglutida inibir

a lipólise basal em machos *sham*, ele parece facilitar a resposta do tecido ao estímulo adrenérgico, ao menos no TABpr.

Um aspecto interessante ao avaliar os resultados encontrados nos machos, é que tanto a oxidação, como a lipogênese e também a lipólise basal foram significativamente diferentes nos animais *sham* tratado do que nos *sham* controle, porém não houve diferença entre os ORQ tratados e controle. Estes achados confirmam resultados de um estudo anterior, de Navarro et al. (2016), onde os autores demonstraram que a ativação do AR nas células  $\beta$  aumenta a liberação de insulina induzida pelo GLP1.

O ganho de massa do TABg diminuiu com o tratamento em ambos os sexos e não foi alterado pela ovariectomia ou orquiectomia. Nas fêmeas castradas houve redução da oxidação de glicose e o tratamento reverteu esta alteração. Não foram encontradas mudanças na síntese de lipídeos nem na lipólise basal em fêmeas. O estímulo com adrenalina aumentou a liberação de glicose nas fêmeas *sham* controle e OVR lira. Nos machos não houveram mudanças na oxidação de glicose nem na lipogênese, porém a lipólise basal foi maior nos animais castrados do que nos *sham* e aumentou ainda mais nos animais castrados tratados com liraglutida. Quanto a lipólise estimulada, houve aumento na liberação de glicerol no grupo *sham* lira, porém no grupo ORQ controle a incubação com adrenalina causou redução na liberação de glicerol. Embora a adrenalina seja considerada um hormônio estimulador da lipólise, este efeito depende de que receptor ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) é predominantemente ativado (RUOHONEN et al., 2018). Diferentes estudos já demonstraram que a testosterona participa da regulação da expressão e da atividade destes receptores (AGRAWAL et al., 2018; GONG; JOHNSON; PETTINGER, 1995; LÓPEZ-CANALES et al., 2018), embora ainda não haja dados desta participação no tecido adiposo.

A castração aumentou a massa do TAM dos machos, porém não teve o mesmo efeito nas fêmeas. Já o tratamento com liraglutida reduziu a massa percentual deste tecido em machos e fêmeas controle e castrados. Em camundongos *knockout* para GLP1R (*Glp1r-*), a massa percentual do TAM aumentou (LOCKIE et al., 2012). Portanto, é possível que exista uma relação inversa entre GLP1 e massa do TAM. A castração diminuiu a síntese de lipídeos a partir de glicose nas fêmeas, mas não alterou a lipogênese em machos. A liraglutida



aumentou a síntese de lipídeos em animais *sham* e castrados machos e fêmeas. A oxidação da glicose no TAM não foi alterada pela castração nem pelo tratamento tanto em machos como em fêmeas. Já foi demonstrado que o TAM possui plena capacidade de oxidar glicose, e que quando estimulado pelo frio, a captação dela aumenta de forma expressiva (TOWNSEND; TSENG, 2014). Na membrana plasmática do TAM, a expressão do GLUT1 é controlada pela estimulação adrenérgica (DALLNER et al., 2006), enquanto a expressão e a translocação do GLUT4 é controlada pela insulina (TERUEL et al., 1996), sendo esses dois hormônios os principais reguladores da captação de glicose. Além do frio, o jejum também pode aumentar a captação de glicose, porém reduz a sua oxidação e a formação de lipídeos (SARAPIO et al., 2019). O presente estudo foi realizado em animais alimentados e em temperatura padrão de biotério, condições em que a síntese de triglicerídeos é favorecida a fim de armazenar energia necessária em situações de jejum ou frio. Neste sentido, a C<sup>14</sup>-glicose estaria sendo utilizada preferencialmente para a síntese de gliceraldeído-3-P e glicerol-P, que por sua vez seria utilizado na síntese de triglicerídeos. Em ratos machos alimentados com dieta balanceada, a administração de liraglutida aumentou a expressão gênica de UCP1, sugerindo uma ação termogênica (DECARA et al., 2018). A administração de GLP1, ou de seus análogos, induz aumento da termogênese no TAM (BEIROA et al., 2014; CHEN et al., 2017; KOOIJMAN et al., 2015; LOCKIE et al., 2012). Entretanto, o efeito termogênico do GLP1 é mais efetivo quando administrado via ICV do que IP, dependendo da ativação da inervação simpática do TAM (LOCKIE et al., 2012) ou em animais expostos ao frio (BEIROA et al., 2014). O tratamento com Liraglutida, ou CL316243 (agonista  $\beta$ 3-AR) ou a terapia combinada entre eles, reduziu a expressão de genes lipogênicos (*Acaca* e *Fasn*) assim como de genes da  $\beta$ -oxidação (*Cptb1b* e *Acox1*), sugerindo uma ação cooperativa entre a sinalização de GLP1R e  $\beta$ 3-AR no TAM (DECARA et al., 2018). Uma possível explicação para que ocorra aumento da lipogênese e redução da massa do tecido mesmo sem alteração na oxidação é o uso de <sup>14</sup>C-glicose como traçador. Mesmo estando apto a utilizar glicose, o substrato preferencial do TAM para a produção de calor são os ácidos graxos (TOWNSEND; TSENG, 2014). O aumento na liberação de insulina estimulado pelo tratamento com liraglutida pode causar a redução do conteúdo plasmático de triglicerídeos, aumentando sua degradação a ácidos graxos e promovendo a captação destes no

TAM. Nos adipócitos estes ácidos graxos podem tanto entrar na rota lipogênica como na oxidativa. Um possível aumento na captação e oxidação de ácidos graxos, já proposto por Colin et al. (2016) e por Decara et al. (2018), poderia explicar a redução da massa do TAM mesmo com aumento da incorporação de glicose em lipídeos. Portanto, a avaliação da expressão gênica de UCP1 assim como na oxidação de C<sup>14</sup>- ácido palmítico são necessárias para esclarecer a ação do GLP1 no TAM em nosso modelo experimental.

O GLP1 atua por ao menos três diferentes vias, agindo no hipotálamo, nas células  $\beta$  do pâncreas e diretamente em tecidos fundamentais para a regulação do metabolismo, como o tecido adiposo, fígado e músculo esquelético (ROWLANDS et al., 2018). Isto torna bastante difícil afirmar de que forma exata o tratamento causa cada alteração. Entretanto, apesar de existirem diferenças nas respostas de cada depósito de tecido adiposo à castração e ao tratamento com liraglutida, é possível identificar um padrão de respostas. Em diferentes depósitos o tratamento estimulou o aumento da oxidação de glicose, a lipogênese, a lipólise basal e estimulada pela epinefrina, sendo que, de forma geral o tratamento parece ser mais efetivo nas fêmeas do que nos machos.

Estudos recentes demonstraram que tanto os estrógenos como os andrógenos são estímulos para a síntese, liberação e ação do GLP1. Handgraaf et al., (2018) demonstraram que o E2 age tanto nas células L intestinais quanto nas células  $\alpha$  do pâncreas estimulando a síntese e liberação do GLP1. Isto demonstra que ao menos parte das alterações provocadas pela ovariectomia podem ser devidas a menor concentração do GLP1. De forma semelhante Navarro et al., (2016) demonstraram que na ausência de T as células  $\beta$  liberam menos insulina em resposta ao estímulo do GLP1. Ainda que as alterações decorrentes da perda dos esteroides sexuais envolvam mais do que a perda do estímulo ao GLP1, a administração de um análogo deste hormônio reverteu a maioria efeitos da castração

## **5. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos neste trabalho concluímos que a administração de liraglutida foi benéfica para animais castrados. Embora nem todas alterações causadas pela gonadectomia tenham sido revertidas, o tratamento foi

capaz de reverter a grande maioria delas sem causar alterações extras que fossem prejudiciais ao indivíduo. Também encontramos resultados que apontam para uma provável interação entre o GLP1 e os esteroides sexuais, confirmando o que recentemente vem sendo descrito por outros grupos.

Novos estudos serão necessários para elucidar por completo a forma como o GLP1 (ou seus análogos) agem em diferentes tecidos. Assim será possível entender que parte dos efeitos da sua administração se deve à ação no SNC, na liberação de insulina e no próprio tecido adiposo. Embora ainda existam questões em aberto, os resultados encontrados até agora indicam a administração de análogos do GLP1 como um promissor tratamento para indivíduos com alterações metabólicas decorrentes de baixas concentrações de esteroides sexuais.

## 6. REFERENCIAS

ABDELHAMED, A. et al. Testosterone replacement alters the cell size in visceral fat but not in subcutaneous fat in hypogonadal aged male rats as a late-onset hypogonadism animal model. **Research and Reports in Urology**, v. 7, p. 35–40, 2015.

AGRAWAL, J. et al. Chronic Testosterone Increases Impulsivity and Influences the Transcriptional Activity of the Alpha-2A Adrenergic Receptor Signaling Pathway in Rat Brain. **Molecular Neurobiology**, 27 set. 2018.

AHMADI, S. S. et al. Effect of liraglutide on waist circumference, sagittal abdominal diameter and adiponectin levels in people with type 2 diabetes treated with multiple daily insulin injections. Evaluations from a randomized trial (MDI liraglutide study 5). **Obesity Science & Practice**, 19 dez. 2018.

ANDREOZZI, F. et al. The GLP-1 receptor agonists exenatide and liraglutide activate Glucose transport by an AMPK-dependent mechanism. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.

ARORA, T. et al. Microbially produced glucagon-like peptide 1 improves glucose tolerance in mice. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 725–730, 2016.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP.

**Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131–2157, 2007.

BARNEDA, D. et al. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the “browning” of white adipose tissues. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 5, p. 924–933, 2013.

BARROS, R. P. A. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ER . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1605–1608, 2006.

BEIROA, D. et al. GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning Through Hypothalamic AMPK. **Diabetes**, v. 63, n. 10, p. 3346–3358, 1 out. 2014.

BJORNSTAD, P.; ECKEL, R. H. Pathogenesis of Lipid Disorders in Insulin Resistance: a Brief Review. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 12, 2018.

BODMER, M. et al. Antidiabetes Drugs and the Risk of Lactic Acidosis or Hypoglycemia. **Diabetes Care**, v. 31, n. 11, p. p2086-91, 2008.

BROWN, E. T. et al. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 615–8, 2005.

BRYZGALOVA, G. et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 4, p. E904–E912, 2008.

BUENO, D.; AZZOLIN, I. R.; PERRY, L. . Ontogenetic study of glucose and lactate utilization by rat cerebellum slices. **Med Sci Res**, v. 22, p. 631–633, 1994.

CAO, X. et al. Estrogens stimulate serotonin neurons to inhibit binge-like eating in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4351–4362, 2014.

CHAKRABARTI, P.; V. KANDROR, K. Adipose Triglyceride Lipase: A New Target in the Regulation of Lipolysis by Insulin. **Current Diabetes Reviews**, v. 7, n. 4, p. 270–277, 2011.

CHEN, J. et al. GLP-1/GLP-1R Signaling in Regulation of Adipocyte Differentiation and Lipogenesis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 1165–1176, 2017.

CLAVIJO, R. I.; WAYLAND HSIAO. Update on male reproductive endocrinology. v.

7, n. Suppl 3, p. 367–372, 2018.

COLIN, I. M. et al. Extrapancreatic effects of incretin hormones: evidence for weight-independent changes in morphological aspects and oxidative status in insulin-sensitive organs of the obese nondiabetic Zucker rat (ZFR). **Physiological Reports**, v. 4, n. 15, p. 1–13, 2016.

COZER, A. G. et al. Stanniocalcin 1 Enhances Carbon Flux from Glucose to Lipids in White Retroperitoneal Adipose Tissue in the Fed Rat. **Lipids**, v. 51, n. 11, p. 1303–1307, 2016.

D'EON, T. M. et al. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 43, p. 35983–35991, 2005.

DALLNER, O. S. et al.  $\beta$  3 -Adrenergic Receptors Stimulate Glucose Uptake in Brown Adipocytes by Two Mechanisms Independently of Glucose Transporter 4 Translocation. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5730–5739, dez. 2006.

DE GODOY, M. R. C.; SWANSON, K. S. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Nutrigenomics: Using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2949–2964, 2013.

DECARA, J. et al. Antiobesity efficacy of GLP-1 receptor agonist liraglutide is associated with peripheral tissue-specific modulation of lipid metabolic regulators. **BioFactors**, v. 42, n. 6, p. 600–611, 2016.

DECARA, J. et al. Cooperative role of the glucagon-like peptide-1 receptor and  $\beta$ 3-adrenergic-mediated signalling on fat mass reduction through the downregulation of PKA/AKT/AMPK signalling in the adipose tissue and muscle of rats. **Acta Physiologica**, v. 222, n. 4, p. 1–20, 2018.

DOS SANTOS FAGUNDES, I. Glycine, Serine, and Leucine Metabolism in Different Regions of Rat Central Nervous System. **Neurochem Res**, v. 26, n. 3, p. 245–9, 2001.

EL BEKAY, R. et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on the differentiation and metabolism of human adipocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 11, p. 1820–1834, 2016.

FAN, W. Q. et al. Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity

caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 1000–1008, 2005.

FINAN, B. et al. Targeted estrogen delivery reverses the metabolic syndrome. v. 18, n. 12, p. 1847–1856, 2012.

FRIED, S. K.; LEE, M.-J.; KARASTERGIOU, K. Shaping fat distribution: New insights into the molecular determinants of depot- and sex-dependent adipose biology. **Obesity**, v. 23, n. 7, p. 1345–1352, jul. 2015.

GELONEZE, B.; DE LIMA-JÚNIOR, J. C.; VELLOSO, L. A. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists (GLP-1RAs) in the Brain–Adipocyte Axis. **Drugs**, v. 77, n. 5, p. 493–503, 2017.

GONG, G.; JOHNSON, M. L.; PETTINGER, W. A. Testosterone Regulation of Renal  $\alpha$  2B -Adrenergic Receptor mRNA Levels. **Hypertension**, v. 25, n. 3, p. 350–355, mar. 1995.

GREEN, C. J. et al. Glucagon Like Peptide-1-Induced Glucose Metabolism in Differentiated Human Muscle Satellite Cells Is Attenuated by Hyperglycemia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

HALDAR, K. et al. Laparoscopic salpingo-oophorectomy for ovarian ablation in women with hormone-sensitive breast cancer. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 113, n. 3, p. 222–224, 2011.

HANDGRAAF, S. et al. 17- $\beta$  Estradiol regulates proglucagon-derived peptide secretion in mouse and human  $\alpha$ - and L cells. **JCI Insight**, v. 3, n. 7, 2018.

HANSEN, F. M.; FAHMY, N.; NIELSEN, J. H. The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. **Acta Endocrinologica**, v. 95, n. 4, p. 566–570, 1980.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.

HARRISON, J. “Talking about my generation”: A state-of-the-art review of health information for men in the andropause. **Health Information and Libraries Journal**, v. 28, n. 3, p. 161–170, 2011.

- HE, Q. et al. GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 476, n. 4, p. 196–203, ago. 2016.
- HERTZEL, A. V et al. Chapter 10 - Lipid metabolism in adipose tissue. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)**, p. 277–304, 2008.
- HUANG, C.-K. et al. Androgen receptor (AR) in cardiovascular diseases. **Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 1, p. R1–R16, abr. 2016.
- IDRIS, A. I. Ovariectomy/Orchidectomy in Rodents. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 531p. 545–551.
- IKEZAWA, Y. et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits glucagon-induced glycogenolysis in perivenous hepatocytes specifically. **Regulatory Peptides**, v. 111, n. 1–3, p. 207–210, 2003.
- IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 33, 24 dez. 2017.
- JENSTERLE, M. et al. Effects of liraglutide on obesity-associated functional hypogonadism in men. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 3, p. 195–202, mar. 2019.
- JONES, B. et al. Control of insulin secretion by GLP-1. **Peptides**, v. 100, n. December 2017, p. 75–84, 2018.
- KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M.; SEALE, P. Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 546–559, 2015.
- KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850, 2015.
- KIM, J. H.; CHO, H. T.; KIM, Y. J. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine journal**, v. 61, n. 11, p. 1055–67, 2014.
- KOOIJMAN, S. et al. Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. **Diabetologia**, v. 58, n. 11, p. 2637–2646, 2015.
- LAMM, S.; CHIDAKEL, A.; BANSAL, R. Obesity and Hypogonadism. **Urologic**

**Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 239–245, 2016.

LAPID, K. et al. Oestrogen signalling in white adipose progenitor cells inhibits differentiation into brown adipose and smooth muscle cells. **Nature communications**, v. 5, p. 5196, 2014.

LAURETTA, R. et al. Gender in endocrine diseases: Role of sex gonadal hormones. **International Journal of Endocrinology**, v. 2018, 2018.

LEE, C. E.; KANG, J. S.; KIM, K. IL. Effects of gender, gonadectomy and sex hormones on growth and plasma cholesterol level in rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 53, n. 1, p. 1–5, 2008.

LEENERS, B. et al. Ovarian hormones and obesity. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 3, p. 300–321, 2017.

LIN, H.-Y. et al. Insulin and Leptin Resistance With Hyperleptinemia in Mice Lacking Androgen Receptor. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1717–1725, 2005.

LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. **Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause** *BioMed Research International* Hindawi Publishing Corporation, , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734243>>. Acesso em: 5 fev. 2017

LO, E. M. et al. Alternatives to Testosterone Therapy: A Review. **Sexual Medicine Reviews**, v. 6, n. 1, p. 106–113, 2018.

LOCKIE, S. H. et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2753–2762, 2012.

LÓPEZ-CANALES, O. et al. Androgens mediate b-adrenergic vasorelaxation impairment using adenylyl cyclase. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 147–154, 2018.

LÓPEZ, M.; TENA-SEMPERE, M. Estrogens and the control of energy homeostasis: A brain perspective. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 8, p. 411–421, 2015.

LUNDHOLM, L. et al. Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. 44–48, 2008.



LYNCH, L. et al. iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 510–519, 2016.

MAHER, A. C. et al. Women have higher protein content of  $\beta$ -oxidation enzymes in skeletal muscle than men. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1–7, 2010.

MASKE, C. B. et al. Estradiol modulates the anorexic response to central glucagon-like peptide 1. **Hormones and Behavior**, v. 93, p. 109–117, 2017.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309–338, 2013.

MCHENRY, J. et al. Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 42–57, jan. 2014.

MOLINA- VEGA, M. et al. Circulating tumor cells and their role in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, n. January, p. 531–538, 2017.

MOORADIAN, A. D.; MORLEY, J. E.; KORENMAN, S. G. Biological actions of androgens. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–28, 1987.

NADKARNI, P.; CHEPURNY, O. G.; GEORGE G. HOLZ. **Regulation of Glucose Homeostasis by GLP-1**. [s.l: s.n.]. v. 121

NAUCK, M. A.; MEIER, J. J. Incretin hormones: Their role in health and disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. October 2017, p. 5–21, 2017.

NAVARRO, G. et al. The role of androgens in metabolism, obesity and diabetes in males and females. v. 23, n. 4, p. 713–719, 2015.

NAVARRO, G. et al. Extranuclear Actions of the Androgen Receptor Enhance Glucose-Stimulated Insulin Secretion in the Male. **Cell Metabolism**, 2016.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 293, p. 444–452, 2007.

NOGUEIRAS, R. et al. Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the**

**Society for Neuroscience**, v. 29, n. 18, p. 5916–5925, 2009.

OUTEIRIÑO-IGLESIAS, V. et al. GLP-1 increases preovulatory LH source and the number of mature follicles, as well as synchronizing the onset of puberty in female rats. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4226–4237, 2015.

PANJWANI, N. et al. GLP-1 Receptor Activation Indirectly Reduces Hepatic Lipid Accumulation But Does Not Attenuate Development of Atherosclerosis in Diabetic Male ApoE  $-/-$  Mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 127–139, 2012.

RAVASSA, S.; ZUDAIRE, A.; DIEZ, J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 2, p. 316–323, 1 maio 2012.

REDONDO, A. et al. Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 204, n. 1–2, p. 43–50, 2003.

ROWLANDS, J. et al. Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. November, p. 1–23, 2018.

RUOHONEN, S. T. et al. Increased Energy Expenditure, Lipolysis and Hyperinsulinemia Confer Resistance to Central Obesity and Type 2 Diabetes in Mice Lacking Alpha2 $\alpha$ -Adrenoceptors. **Neuroendocrinology**, v. 107, n. 4, p. 324–339, 2018.

SAELY, C. H.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. **Gerontology**, v. 58, n. 1, p. 15–23, 2011.

SAHA, J. K. et al. Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. **BioMed**, v. 230, p. 777–784, 2005.

SARAPIO, E. et al. Effects of stanniocalcin hormones on rat brown adipose tissue metabolism under fed and fasted conditions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 485, p. 81–87, abr. 2019.

SECHER, A. et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4473–4488, 1 out. 2014.

SESSA, F. et al. Anabolic Androgenic Steroids: Searching New Molecular

Biomarkers. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. November, p. 1321, 2018.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 225–230, 2003.

SÖRHEDE WINZELL, M.; AHRÉN, B. Glucagon-like peptide-1 and islet lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 11–12, p. 795–803, 2004.

STICH, V. et al. Adipose tissue lipolysis and hormone-sensitive lipase expression during very-low-calorie diet in obese female identical twins. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 3, p. 739–744, 1997.

SYMONDS, M. E.; POPE, M.; BUDGE, H. The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. **Annual Review of Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 295–320, 2015.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 3, p. 521–534, 2015.

TERUEL, T. et al. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 2, p. 627–632, 1996.

TOMAS, E. et al. GLP-1(32-36)amide pentapeptide increases basal energy expenditure and inhibits weight gain in obese mice. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2409–2419, 2015.

TORRES, I. L. S. et al. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 111–116, 2001.

TOWNSEND, K. L.; TSENG, Y. H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 168–177, 2014.

VANGOITSENHOVEN, R.; MATHIEU, C.; VAN DER SCHUEREN, B. GLP1 and cancer: Friend or foe? **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 5, p. 77–88, 2012.

VENDRELL, J. et al. Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4072–4079, 2011.

WANG, J. et al. Effects of exenatide combined with clomifene citrate on insulin resistance and angiotensin II/Angiotensin-(1-7) in peripheral blood in patients with

polycystic ovary syndrome. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 19, p. 8406–8411, 2017a.

WANG, J. et al. Castration-induced changes in the expression profiles and promoter methylation of the GHR gene in Huainan male pigs. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 8, p. 1113–1119, 2017b.

WANG, P.; ZHU, B. T. Unique effect of 4-hydroxyestradiol and its methylation metabolites on lipid and cholesterol profiles in ovariectomized female rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 800, n. February, p. 107–117, 2017.

WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

WONG, W. P. S. et al. Extranuclear estrogen receptor- stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 29, p. 13057–13062, 2010.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes and Development**, v. 27, n. 3, p. 234–250, 2013.

XU, Y. X. Z.; ANDE, S. R.; MISHRA, S. Gonadectomy in Mito-Ob mice revealed a sex-dimorphic relationship between prohibitin and sex steroids in adipose tissue biology and glucose homeostasis. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2018.

YANG, M. et al. Duodenal GLP-1 signaling regulates hepatic glucose production through a PKC- $\delta$ -dependent neurocircuitry. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 2, p. e2609-11, 2017.

YEGNASUBRAMANIAN, S. et al. Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. **European Urology**, v. 75, n. 1, p. 88–99, 2018.

ZHANG, Q. et al. Liraglutide protects cardiac function in diabetic rats through the PPAR $\alpha$  pathway. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. BSR20180059, 27 abr. 2018.

ZHANG, Y. et al. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature*, 1994.